

Untersuchungen zur
funktionellen Bedeutung der
Proteolyse des Kv7.1

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Anne Strigli
Kiel, 2015

Erster Gutachter: _____ Prof. Dr. Paul Saftig _____

Zweiter Gutachter: _____ Prof. Dr. Thomas Roeder _____

Tag der mündlichen Prüfung: _____ 08.12.2015 _____

Zum Druck genehmigt: Kiel, der _____ 08.12.2015 _____

Prof. Dr. Natascha Oppelt, die Dekanin

Es bleibt spannend.

(Prof. Dr. med. Stefan Schulz)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Biologische Membranen	1
1.2. Ruhe- und Aktionspotential	1
1.3. Ionenkanäle	3
1.4. Spannungsabhängige Kaliumkanäle	4
1.5. Die Familie der Kv7-Kanäle	5
1.6. Kv7.1	7
1.6.1. Struktur von Kv7.1	7
1.6.2. KCNE-Proteine als Interaktionspartner von Kv7.1	8
1.6.3. Weitere Regulatoren/Interaktionspartner von Kv7.1	10
1.6.4. Funktionen von Kv7.1	13
1.7. Apoptose	13
1.7.1. Funktion von Apoptose	13
1.7.2. Caspasen	14
1.7.3. Die Familie der B-Zell Lymphoma-2 (BCL-2)-Proteine	16
1.7.4. Signalwege, die zu Apoptose führen	18
1.7.5. <i>Amino-Terminal Enhancer of Split</i> (AES)	21
1.8. Proteolyse	22
2. FRAGESTELLUNG	24
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. Material	25
3.1.1. Chemikalien	25
3.1.2. Zelllinien und Bakterienstämme	25
3.1.3. Vektoren und Plasmide	25
3.1.4. Verwendete Kits	28
3.1.5. Verwendete Puffer	28
3.2. Methoden	30
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1.1. cDNA-Konstrukte	30

3.2.1.2.	Polymerasenkettenreaktion (PCR).....	30
3.2.1.3.	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.1.4.	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	32
3.2.1.5.	Restriktionsverdau	32
3.2.1.6.	Dephosphorylierung von DNA.....	33
3.2.1.7.	Ligation.....	33
3.2.1.8.	Vermessung von Nukleinsäuren	33
3.2.1.9.	Herstellung von chemisch kompetenten Zellen.....	33
3.2.1.10.	Transformation von chemisch kompetenten Zellen	34
3.2.1.11.	Aufreinigung von Plasmiden	34
3.2.1.12.	Minipräparation	35
3.2.1.13.	Midipräparation	35
3.2.1.14.	Sequenzierung.....	35
3.2.1.15.	RNA-Isolierung	36
3.2.1.16.	Umschreiben von cDNA in mRNA.....	36
3.2.1.17.	Umschreiben von mRNA in cDNA.....	37
3.2.1.18.	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	37
3.2.2.	Zellbiologische und biochemische Methoden.....	38
3.2.2.1.	Kultivierung von Zelllinien	38
3.2.2.2.	Passagieren von Zelllinien.....	39
3.2.2.3.	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien.....	39
3.2.2.4.	Transfektion von Zellen.....	39
3.2.2.5.	Herstellung von stabilen Zelllinien.....	39
3.2.2.6.	Behandlung von Zellen.....	40
3.2.2.7.	Herstellung von Zelllysaten.....	40
3.2.2.8.	Proteinkonzentrationsbestimmung	40
3.2.2.9.	Trennung von zytoplasmatischen – und Kernproteinen	41
3.2.2.10.	Ko-Immunopräzipitation	41
3.2.2.11.	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page).....	42
3.2.2.12.	Western Blot und Immunodetektion.....	42
3.2.2.13.	Strippen von Blotmembranen	43
3.2.2.14.	Immunofluoreszenzfärbung den Zellen.....	44
3.2.2.15.	Immunofluoreszenzfärbung von apoptotischen Zellen	45
3.2.2.16.	Durchflusszytometrie.....	45
3.2.2.17.	Färbung von reaktiven Sauerstoffspezies	45
3.2.3.	Elektrophysiologie	46
3.2.3.1.	Mikroinjektion von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	46
3.2.3.2.	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	46
3.2.3.3.	Datenanalyse der Spannungsklemme	47
4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	Kv7.1 wird durch verschiedene Caspasen zum CTF2 prozessiert.....	48
4.2.	Eine Rolle der Proteolyse von Kv7.1 in Entzündungsprozessen?	50
4.3.	Eine Rolle von Kv7.1 während der Apoptose.....	52
4.3.1.	Die Kanalaktivität von Kv7.1 treibt Zellen in die Apoptose.....	52
4.3.2.	Untersuchung zum Einfluss des CTF2 von Kv7.1 auf Apoptose	57

4.3.3. Mechanistische Untersuchungen zur potentiellen anti-apoptischen Funktion des CTF2.....	60
4.4. Kv7.1 wird in gealterten Zellen stärker zum CTF2 prozessiert.....	61
4.5. Natürlich vorkommende Mutationen von Kv7.1 mit veränderter Prozessierung des Kv7.1	64
4.6. Einfluss der Proteolyse zum CTF2 auf die Kanalaktivität von Kv7.1.....	69
4.6.1. Die Calmodulinbindung ist nach Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2 vermindert	69
4.6.2. Einfluss von Phosphorylierungen an Kv7.1 auf die Proteolyse von Kv7.1 ...	71
4.7. <i>Amino-Terminal Enhancer of Split</i> (AES) als neuer Interaktionspartner von Kv7.1.....	74
4.7.1. Validierung der Interaktion von Kv7.1 und AES.....	74
4.7.2. Funktionelle Analyse der Interaktion von AES und Kv7.1	82
4.8. Prozessierung von Kv7.1 zum CTF1	83
4.8.1. Ein GSGF-Motiv in Kv7.1 könnte für die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF1 kritisch sein	83
4.8.2. Die Proteolyse von Kv7.1 zum CTF1 inaktiviert Kv7.1.....	86
5. DISKUSSION	89
5.1. Kv7.1 wird von mehreren Caspasen zum CTF2 prozessiert.....	89
5.2. <i>In vivo</i> Prozesse, bei denen die Proteolyse von Kv7.1 wichtig sein könnte.	90
5.2.1. Entzündungsreaktionen und die Proteolyse von Kv7.1	91
5.2.2. Mögliche, veränderte Prozessierung von Kv7.1 im Alter.....	92
5.2.3. Kv7.1 könnte über seine Prozessierung zum CTF2 Herzarrhythmien auslösen	93
5.2.4. Einfluss von Kv7.1 auf Apoptose	94
5.3. Die genregulatorische Funktion des CTF2 von Kv7.1	97
5.4. <i>Amino-Terminal Enhancer of Split</i> (AES) als neuer Interaktionspartner des Kv7.1?.....	98
5.5. Prozessierung von Kv7.1 zum CTF1	100
5.6. Zusammenhang der Proteolyse und Kanalaktivität von Kv7.1.....	103
5.7. Einfluss von Phosphorylierung auf die Proteolyse von Kv7.1	106
5.8. Ausblick	108

6. ZUSAMMENFASSUNG	109
7. SUMMARY	111
8. LITERATURVERZEICHNIS	113
9. ANHANG	135
9.1. Abkürzungsverzeichnis	135
9.2. Abbildungsverzeichnis	138
9.3. Tabellenverzeichnis.....	141
10. LEBENSLAUF	142
11. DANKSAGUNG	143
12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	144

1. EINLEITUNG

1.1. Biologische Membranen

Die Zelle gilt als die kleinste räumliche und funktionelle Einheit des Lebens. Ein kritischer Schritt in der zellulären Evolution war die Entwicklung eines Lipidfilmes, welche die Zelle räumlich abschloss (Hille, 2001). Heute bezeichnen wir diesen Lipidfilm als Zellmembran, dessen Aufbau seit 1972 mittels des *Fluid-Mosaik-Modells* beschrieben wird (Singer, Nicolson, 1972). Mit der Entwicklung der Biomembran konnten vitale Zellorganellen, welche selber von einer Membran umgeben sind, geschützt werden. Gleichzeitig musste auch nach der Bildung der Biomembran die Versorgung mit lebensnotwendigen Substanzen sichergestellt werden (Ashcroft, 2006; Hille, 2001). Da eine lipophile Membran entstand, war diese für hydrophile Substanzen, wie Ionen, nicht mehr durchlässig. Somit mussten sich Transportsysteme entwickeln, die die Versorgung mit Nährstoffen garantierten. Dabei entstanden der aktive und passive Transport.

Der passive Transport verbraucht keine Energie, da er entlang des Konzentrationsgradienten transportiert (Ashcroft, 2006; Hille, 2001). Dies ist bei der einfachen Diffusion von kleinen lipophilen Molekülen, wie Kohlenstoffdioxid, durch die Plasmamembran möglich. Weiterhin gibt es durch Proteine gebildete, wassergefüllte Poren, die, analog eines Kanals oder Tunnels, geeignete Substanzen, wie Natriumionen, in die Zelle hineinlassen.

Der aktive Transport dagegen ist Energie verbrauchend, da er Substanzen entgegen des Konzentrationsgradienten transportieren kann (Ashcroft, 2006; Hille, 2001). Dies wird einerseits durch *Carrier*-Proteine ermöglicht, welche ihre zu transportierenden Substanzen binden und dann nur unter Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse in das Zellinnere bzw. Zelläußere abgeben können. Andererseits gibt es auch Ionenporen, welche ATP verbrauchen, um Ionen in oder aus der Zelle zu schleusen.

1.2. Ruhe- und Aktionspotential

Der räumliche Abschluss von Zellen führt zu verschiedenen Ionenkonzentrationen im Zellinneren sowie Zelläußeren, wodurch ein Konzentrationsgradient der verschiedenen Ionen im Inneren sowie Äußeren der Zelle entsteht (Tab. 1) (Hille, 2001). Da Ionen aber auch Ladungsträger sind, ergibt sich so nicht nur ein Konzentrationsgradient, sondern auch

ein elektrischer Gradient. Ladungsträger sind bestrebt, möglichst ein Gleichgewicht aus dem Konzentrationsgradienten und dem elektrischen Gradienten herzustellen. Dieses Gleichgewicht hat in der Regel ein Potential ungleich Null und wird mit dem Gleichgewichtspotential eines Ions angegeben (Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Ionen und ihrer Konzentrationen im intrazellulären und extrazellulären Raum sowie Gleichgewichtspotentiale. Die extrazellulären Ionenkonzentrationen sind in humanem Blut vermessen worden, während die intrazellulären Ionenkonzentrationen aus typischen Säugetierzellen gewonnen wurden. Adaptiert nach (Hille, 2001).

Ion	extrazelluläre Konzentration [mM]	intrazelluläre Konzentration [mM]	Gleichgewichtspotential [mV]
Natrium	145	12	+ 67
Kalium	4	155	- 98
Calcium	1,5	0,0001	+129

Kaliumionen akkumulieren innerhalb der Zelle, während außerhalb der Zelle Natriumionen zu finden sind (Hille, 2001). Öffnet sich die Biomembran, so verlässt Kalium die Zelle, während Natrium in die Zelle strömt. Das Potential des Zellinneren richtet sich nach dem Gleichgewichtspotential aller in der Zelle vorhandenen Ionen und wird als Ruhepotential bezeichnet. Dieses liegt bei den meisten Zellen bei -70 mV (Ashcroft, 2006).

Erregbare Zellen, wie Kardiomyozyten oder Neuronen, können ihr Potential als Reaktion auf Stimuli verändern (Abb. 1) (Grant, 2009; Nattel, Carlsson, 2006; Yensen et al., 2002).

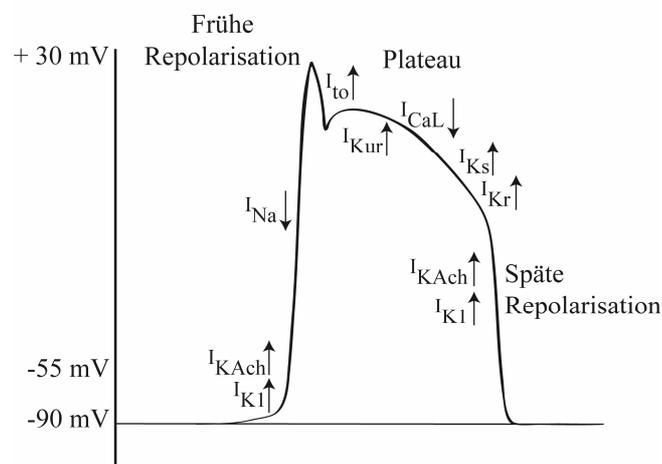


Abbildung 1: Aktionspotential eines Kardiomyozyten. Nach Stimulation öffnen sich zunächst langsame Kaliumkanäle, welche das Potential der Zelle in positivere Bereiche anheben. Anschließend öffnen sich ab circa -55 mV spannungsabhängige Natriumkanäle, welche von spannungsabhängigen Kaliumkanälen gefolgt werden. Die Kaliumkanäle vermindern das Potential der Kardiomyozyte, wodurch die Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle eine Plateauphase vermittelt, in welcher die Zelle kontrahiert. Folgend fließen über transiente und sehr schnelle Kaliumkanäle Kaliumionen aus der Zelle. Daraufhin folgen auch langsame und rapide Kaliumströme, welche die Repolarisation weiter vorantreiben, bis das Ruhepotential wieder erreicht wird. I_{KAch} : Kir3.1 + Kir3.4; I_{KI} : Kir2.1; I_{Na} : Nav1.5; I_{to} : Kv4.3 + KChIP2.2; I_{CaL} : Cav1.2; I_{Kur} : Kv1.5; I_{KS} : Kv7.1 + KCNE1; I_{Kr} : Kv11.1 + KCNE2. Pfeil nach oben: Ausfluss von Ionen aus der Zelle. Pfeil nach unten: Einfluss von Ionen in die Zelle. Adaptiert nach (Grant, 2009; Nattel, Carlsson, 2006).

Wird ein Kardiomyozyt erregt, so öffnen sich transiente und ultra-schnelle Kaliumkanäle (Abb. 1), welche das Potential leicht ansteigen lassen (Grant, 2009; Nattel, Carlsson, 2006;

Yensen et al., 2002). Ab einem Potential von circa -55 mV öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle, welche zu einem schnellen Einstrom von Natriumionen führen. Dadurch schießt das Potential der Zelle in positivere Bereiche, was als Depolarisation bezeichnet wird. Ab circa $0 - 30$ mV schließen sich diese Natriumkanäle wieder, wodurch die Depolarisation beendet wird (Aktories K., 2009). Damit beginnt die Repolarisation, in der das Potential wieder in den Ausgangszustand zurückgeführt wird. Die Repolarisationsphase einer Kardiomyozyte wird in frühe und späte Repolarisation unterteilt. In der frühen Phase kommt es mittels transientem und ultraschnellem KaliumEinstromes zu einer leichten schnellen Verminderung des Potentials. Dadurch kann die Plateauphase ausgelöst werden, in der Kalziumionen aus dem extrazellulären Milieu einströmen und die Kontraktion des Herzmuskels ermöglichen (Grant, 2009). Daraufhin folgt die späte Repolarisation, in der wieder vermehrt spannungsabhängige Kaliumkanäle geöffnet werden, die das Potential wieder auf das Niveau des Ruhepotentials zurückführen. Alle Ionenströme, die das Aktionspotential eines Kardiomyozyten beeinflussen, setzen sich aus verschiedenen Proteinen zusammen, die in Abbildung 1 für die verschiedenen Ionenströme angegeben sind (Nattel, Carlsson, 2006).

1.3. Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Proteine, die mehrfach die Membran durchspannen und dabei eine Wasser-gefüllte Pore bilden (Abbott, Goldstein, 2001; Ashcroft, 2006; Hille et al., 1999; Hille, 2001; Zhou, McCammon, 2010). Durch diese Pore können passiv hydrophile Ionen die lipophile Zellmembran passieren. Die Familie der Ionenkanäle ist sehr heterogen, da mehr als 340 Gene für verschiedene Familienmitglieder kodieren (Ashcroft, 2006; Hille et al., 1999; Hille, 2001). Ionenkanäle unterteilt man nach den Ionen, für die sie die höchste Spezifität aufweisen, wie Natrium-, Kalium- oder Calciumkanäle (Grant, 2009; Hille, 2001). Es gibt aber auch Ionenkanäle, die *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle, die unspezifisch für bestimmte Ionen sind (Nilius et al., 2007). Diese sind für mono- sowie bivalente Ionen durchlässig und scheinen eine wichtige Rolle in der Kalziumhomöostase zu spielen.

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit der Ionenkanäle richtet sich nach der Art und Weise, wie sie aktiviert werden (Grant, 2009; Hille, 2001; Nattel, Carlsson, 2006; Zhou, McCammon, 2010). Die Aktivierung von Ionenkanälen, die im Grundzustand der Zelle

geschlossen sind, kann durch Bindung eines Liganden erfolgen (Ligand-gesteuerte Kanäle). Alternativ führen auch Veränderungen in der Spannung (spannungsabhängige Kanäle) oder Stimulationen mit äußeren Reizen, wie mechanische Reize, Veränderung der pH-Werte, der Lichteinstrahlung oder der Temperatur (Grant, 2009; Hille, 2001; Nattel, Carlsson, 2006; Zhou, McCammon, 2010), zu einem Öffnen von Ionenkanälen. Dennoch gibt es auch Kalium- und Natriumkanäle, die im Grundzustand der Zelle einen Ionenfluss ermöglichen (*leak channels*) (Enyedi, Czirjak, 2010; Goldstein et al., 2001; Mantegazza et al., 2010; Ren, 2011; Schroeder et al., 2000). Diese *leak channels* sind zur Erhaltung des Ruhepotentials von kritischer Bedeutung (s. 1.2.).

Die spannungsabhängigen Ionenkanäle reagieren auf Veränderungen im Ruhepotential und werden demnach in erregbaren Zellen aktiviert (Hille, 2001; Hodgkin, Huxley, 1952; Yensen et al., 2002). Dabei öffnen sie sich nur wenige Millisekunden und lassen währenddessen $10^6 - 10^7$ Ionen pro Sekunde die Pore passieren. Demnach fließen während der Öffnung eines spannungsabhängigen Ionenkanals über 100.000 Ionen durch die Kanalpore. Spannungsabhängige Ionenkanäle werden weiterhin nach der Selektivität für das entsprechende Ion in Natrium-, Kalium-, Kalzium- oder Chloridkanäle unterteilt. Die dabei am besten untersuchte Gruppe sind die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Yu et al., 2005).

1.4. Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind die größte Gruppe der spannungsabhängigen Ionenkanäle (Yu et al., 2005). Diese Gruppe besteht aus 11 verschiedenen Familien, die alle sechs Transmembrandomänen besitzen. Weiterhin bestehen spannungsabhängige Kaliumkanäle aus einer *voltage-sensing domain*, die auf Potentialänderungen reagiert, und einer *pore domain*, durch welche die Ionen fließen können. Zusätzlich dazu gibt es zytoplasmatische N- und C-Termini (Moreau et al., 2014; Yu et al., 2005).

Die *voltage-sensing domain* besteht aus den vier Transmembrandomänen S1 – S4. Dabei enthalten die ersten drei Membran-spannenden Helices (S1 – S3) negativ geladene Aminosäuren und sind demnach negativ geladen. Die letzte Transmembrandomäne (S4) der *voltage-sensing domain* dagegen ist durch vermehrt vorkommende Arginine und Lysine gekennzeichnet und hat demnach eine positive Ladung (Hille et al., 1999). Die *pore domain* besteht aus zwei Transmembrandomänen (S5 und S6), welche über eine kleine

extrazelluläre Schleife miteinander verbunden sind (Moreau et al., 2014; Yu et al., 2005). Je vier Untereinheiten (N- und C-Terminus, *voltage sensing domain* und *pore domain*) finden in der Membran zusammen (α -Untereinheit) und bilden eine mit Wasser gefüllte Fass-ähnliche Struktur, den eigentlichen Kanal (Ashcroft, 2006; MacKinnon, 1991).

1.5. Die Familie der Kv7-Kanäle

Diese Familie besteht aus fünf Mitgliedern (Tab. 2), welche stets in der Lage sind, Tetramere bilden zu können (Abb. 2, rechts) (Jentsch, 2000). Gleichzeitig sind aber auch verschiedene Familienmitglieder in der Lage, miteinander Heteromere zu formen.

Tabelle 2: Übersicht der fünf Kv7-Familienmitglieder. Zusätzlich zum kodierenden Gen, Protein und möglichen Interaktionspartnern sind Krankheiten genannt, die durch Mutationen im jeweiligen Gen auftreten können. LQT-S: *long QT-Syndrome*; BFNC: *benigne familiar neonatal convulsions*; DFNA2: *autosomal dominant nonsyndromic deafness type 2*. Adaptiert nach (Gutman et al., 2005; Jentsch, 2000).

Gen	Protein	Expression	Interaktionspartner	Krankheit	Literatur
KCNQ1	Kv7.1	Herz, Niere, Ohr, Rektum, Plazenta, Darm, Lunge, Magen, Gehirn	KCNE1 – 5	LQT-S	(Abbott et al., 2014; Angelo et al., 2002; Barhanin et al., 1996; Grunnet et al., 2002; Preston et al., 2010; Roepke et al., 2006; Roepke et al., 2010; Roepke et al., 2011a; Sanguinetti et al., 1996; Schroeder et al., 2000; Tinel et al., 2000a),
KCNQ2	Kv7.2	Gehirn, Lunge,	Kv7.2	BFNC	(Biervert et al., 1998; Hessler et al., 2015; Robbins, 2001; Tinel et al., 2000b)
KCNQ3	Kv7.3	Hoden, Herz, Plazenta, Darm, Auge	Kv7.3 Kv7.5 KCNE1 KCNE2 BACE1		
KCNQ4	Kv7.4	Inneres Ohr, Nukleus des Hirnstammes, Plazenta	Kv7.3 Kv7.5 KCNE1 – 5	DFNA2	(Chadha et al., 2014; Strutz-Seebohm et al., 2006)
KCNQ5	Kv7.5	Gehirn, Skelettmuskulatur	Kv7.1 Kv7.3 KCNE1 KCNE3	Nicht bekannt	(Oliveras et al., 2014; Roura-Ferrer et al., 2012)

Wie Tabelle 2 zu entnehmen, sind Kv7.2 und Kv7.3 eng in ihrer Funktion miteinander verbunden. Kv7.2 und Kv7.3 werden zusammen im Gehirn exprimiert, wo sie für den M-Strom verantwortlich sind (Wang et al., 1998a). Der M-Strom kann durch muskarinerge Rezeptoren gehemmt werden, weswegen dieser Strom als M-Strom bezeichnet wird (Brown, Adams, 1980). Er ist schon bei neuronalem Ruhepotential aktiv und lässt Kalium aus der Zelle hinaus (Marrion, 1997). Damit fördert der M-Strom die

Repolarisation. Dadurch wird über die Inaktivierung von Kv7.2 und Kv7.3 ein Auslösen eines Aktionspotentials gefördert. Mutationen in Kv7.2 und Kv7.3 sind bekannt dafür, neonatale Epilepsien auszulösen (Tab. 2) (Biervert et al., 1998). Es wird unter anderem angenommen, dass Mutationen in Kv7.2 oder Kv7.3 zu einer fehlenden Assemblierung der Homo- oder Heteromere von Kv7.2 und Kv7.3 führen. Diese Mutationen in Kv7.2 und Kv7.3 bedingen zum Beispiel einen fehlgeleiteten Transport von Kv7.2 und Kv7.3 zur Zellmembran, was die Pathophysiologie der von Kv7.2 und Kv7.3 abhängigen Epilepsien erklären könnte.

Gleichzeitig ist aber auch Kv7.5 in der Lage, den M-Strom zu beeinflussen, da er in den gleichen Hirnregionen wie Kv7.2 und Kv7.3 exprimiert wird und auch in der Lage ist, mit Kv7.3 zu assemblieren (Jentsch, 2000). Eine Splicevariante (verkürzter C-Terminus) von Kv7.5 konnte in der Skelettmuskulatur gefunden werden, wobei die Funktion dieser Splicevariante noch zu klären ist. Zusätzlich sind mittlerweile auch Mutationen von Kv7.5 beschrieben wurden (Arcangeli et al., 2009; Sjoblom et al., 2006). Dennoch scheinen diese Mutationen nicht mit Krankheitsbildern zu assoziieren. Neueste Daten deuten Kv7.5 als Tumorsuppressorgen an, da Mutationen in Kv7.5 in verschiedensten Krebsarten gefunden wurden (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013).

Kv7.4 ist im Ohr und in manchen Bereichen des Hirnstammes zu finden, wo er für die Weiterleitung und Vermittlung des Hörens mitverantwortlich ist (Jentsch, 2000). Weiterhin ist er auch in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (Chadha et al., 2012).

Die Kv7.-Familie besteht wie alle spannungsabhängigen Kaliumkanäle aus sechs Transmembrandomänen (Abb. 2). Zusätzlich liegen N- und C-Terminus intrazellulär vor, wobei im C-Terminus vier homologe Helices (Helix A – D) zu finden sind (Abb. 2) (Hernandez et al., 2008; Jentsch, 2000; Schwake et al., 2006). Helix A und Helix B ermöglichen die Calmodulin- und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)-Bindung und sind demnach für den Transport zur Zellmembran, die korrekten Faltung und die Aktivierung der Kv7-Kanäle von Bedeutung (Haitin, Attali, 2008; Roden, 2006; Suh, Hille, 2007; Zaydman, Cui, 2014). Die zytoplasmatischen Helix A und Helix B nehmen dabei eine antiparallele *Coiled-coil* Struktur ein, bei der eine Helix A und eine Helix B des jeweiligen Proteins miteinander interagieren (Sachyani et al., 2014). Die C-terminale Helix C und Helix D zeichnen sich durch ihre hohe Wahrscheinlichkeit aus, ebenfalls *Coiled-coil* Domänen zu bilden (Kanki et al., 2004; Schwake et al., 2006; Wiener et al., 2008). Schwake und Kollegen konnten zeigen, dass die Helix C und Helix D für die Homo- und

Heteromerbildung der Kv7-Kanäle relevant (Schwake et al., 2003; Schwake et al., 2006). Da in dieser Arbeit vor allem mit Kv7.1 gearbeitet wurde, soll auf diesen Kaliumkanal genauer eingegangen werden.

1.6. Kv7.1

1.6.1. Struktur von Kv7.1

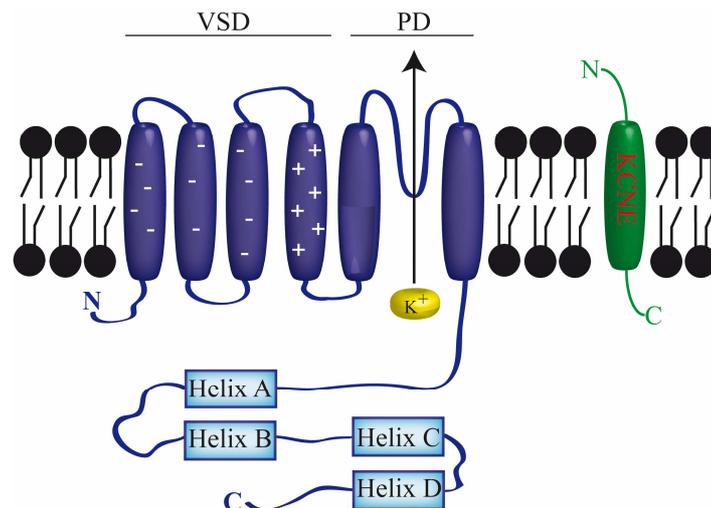


Abbildung 2: Aufbau von Kv7.1. Die sechs Transmembrandomänen mit ihren Ladungen sind gezeigt. Zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne liegt die Kaliumpore, wobei vier Untereinheiten assemblieren müssen, damit ein funktioneller Kanal entsteht. Der lange C-Terminus ist mit seinen vier Helices hervorgehoben, wobei die intrazelluläre Helix A und Helix B sowie zytoplasmatische Helix C und Helix D jeweils miteinander interagieren. Die KCNE-Proteine können als β -Untereinheiten in den von Kv7.1 gebildeten Komplex integriert werden und sind repräsentativ mit einem Beispiel in grün gezeigt.

Die *voltage-sensing domain* und *pore domain* sind analog der spannungsabhängigen Kaliumkanäle angeordnet, wobei Kv7.1 an der Zellmembran tetramerisiert vorliegt (Abb. 2) (Hernandez et al., 2008). Der C-Terminus von Kv7.1 beinhaltet vier Helices (Helix A – D), welche für die Bindung an Interaktionspartnern, Assemblierung und Kanalfunktion von Kv7.1 von zentraler Bedeutung sind (Abb. 2). Kv7.1 ist das einzige Familienmitglied, das nicht mit den anderen Kv7-Kanälen tetramerisiert (Tab. 2). Stattdessen bildet Kv7.1 stets Heteromere mit der Familie der KCNE-Proteine (Abb. 2) (Abbott, Goldstein, 2001; Abbott, 2012, 2014). Diese β -Untereinheiten assemblieren mit ihren respektiven α -Untereinheiten (Kv7.1) (s. 1.5.), sodass Kv7.1 vermutlich stets an Interaktionspartner gebunden ist.

1.6.2. KCNE-Proteine als Interaktionspartner von Kv7.1

Die Familie der KCNE-Proteine besteht aus fünf Familienmitgliedern (KCNE1 – 5), welche alle in der Lage sind, mit Kv7.1 zu assemblieren (Angelo et al., 2002; Barhanin et al., 1996; Grunnet et al., 2002; Sanguinetti et al., 1996; Schroeder et al., 2000; Tinel et al., 2000a). Sie sind Typ 1 Transmembranproteine und haben einen extrazellulären N-Terminus, eine Transmembrandomäne und einen intrazellulär lokalisierten C-Terminus. Alle scheinen an der *voltage-sensing domain* und der *pore domain* von Kv7.1 binden zu können (Liu et al., 2007; Lundby et al., 2010; Nakajo, Kubo, 2014; Zheng et al., 2010). Weiterhin ist auch gezeigt worden, dass die KCNE-Proteine mit der zytoplasmatischen Helix A und Helix C interagieren (Dvir et al., 2014; Haitin et al., 2009; Zheng et al., 2010). Vier α -Untereinheiten von Kv7.1 assemblieren mit je zwei KCNE-Proteinen (Kobertz, 2014; Plant et al., 2014). Die Assemblierung von KCNE-Proteinen an Kv7.1 verändert die elektrophysiologischen Eigenschaften sowie die Reaktion auf pharmakologisch wirksame Substanzen von Kv7.1 (Abbott, Goldstein, 2001; Abbott, 2012, 2014). Gleichzeitig führt die Assemblierung von Kv7.1 und KCNE-Proteinen zu einem vermehrten Transport beider Proteine zur Zellmembran und einer stabileren Expression des jeweils anderen (Abbott, Goldstein, 2001; Abbott, 2012, 2014).

Als Gründungsmitglied dieser Familie ist KCNE1 bekannt, welches zunächst als *minimal inward potassium rectifier* (Mink) beschrieben wurde (Takumi et al., 1988). 1996 wurde in zwei zeitgleich erschienenen Publikationen die Assemblierung von KCNE1 mit Kv7.1 beschrieben (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). Dabei wurde in beiden Arbeiten festgestellt, dass Kv7.1 und KCNE1 im Herzen den *slow rectifier* Strom (I_{ks}) darstellen, womit beide für die späte Repolarisierungsphase des kardialen Aktionspotentials relevant sind (Abb. 1). Mutationen in Kv7.1 und KCNE1 können zu mitunter tödlichen Arrhythmien führen, bei denen die QT-Phase im Elektrokardiogramm (EKG) verlängert ist (*Long QT*-Syndrom, LQT-S, Tab. 2, Abb. 3) (Abbott, Goldstein, 2001; Abbott, 2012, 2014).

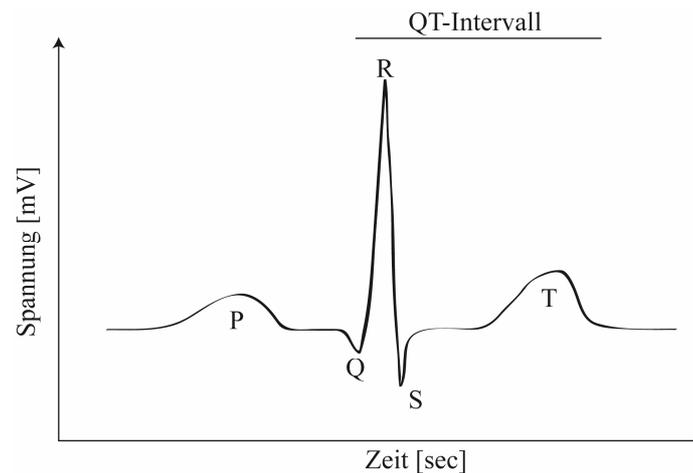


Abbildung 3: Beispiel eines Elektrokardiogramms (EKG). Ein typisches EKG beginnt mit der P-Welle, geht in den QRS-Komplex über und endet mit der T-Welle. Verändert sich das EKG, so spricht man von einer Arrhythmie. Die Zeitspanne von Beginn des QRS-Komplexes bis zum Ende der T-Welle wird als QT-Intervall bezeichnet. Ist das QT-Intervall verlängert, so spricht man von einem *Long QT*-Syndrom. Adaptiert nach (Aktories K., 2009).

Treten Mutationen in Kv7.1 dominant auf, so spricht man vom Romano-Wardo-Syndrom (RWS) (Jentsch, 2000). Patienten, die vom Jervell und Lange-Nielsen Syndrom betroffen sind, tragen Genveränderungen in Kv7.1, die rezessiv übertragen werden. Dadurch leiden die betroffenen Patienten nicht nur unter Arrhythmien sondern auch unter Taubheit. Demnach konnte auf eine Funktion von Kv7.1 im Ohr geschlossen werden. In weiterführenden Analysen an Kv7.1 und KCNE1-*knock-out* Tieren konnte festgestellt werden, dass Kv7.1 und KCNE1 wichtig für die Bildung der Endolymphe im inneren Ohr sind (Rivas, Francis, 2005). Eine falsche Zusammensetzung dieses Elektrolyts verursacht eine fehlerhafte Entwicklung des Ohres, was zu einem Hörverlust führt. KCNE1 verändert die Kanalfunktion von Kv7.1, in dem es die Aktivierung von Kv7.1 stark verlangsamt. Dennoch kommt es über Assemblierung von Kv7.1 und KCNE1 zu einem vermehrten Kaliumausstrom (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996).

Assembliert KCNE2 mit Kv7.1 entsteht ein stetig offener Kanal (Tinel et al., 2000a). Heteromere von Kv7.1 und KCNE2 findet man einerseits im Herzen, wo KCNE2 einen weiteren Regulator des I_{Ks}-Stromes (Kv7.1 und KCNE1) darstellt (Jiang et al., 2009). Vermehrte Tetramere von Kv7.1 und KCNE2 sind aber auch im Magen, Schilddrüse und Gehirn zu finden (Roepke et al., 2006; Roepke et al., 2009; Roepke et al., 2010; Roepke et al., 2011a). Im Magen sind Kv7.1 und KCNE2 für den Kaliumausgleich in den Becherzellen verantwortlich, sodass eine Defizienz in beiden Proteinen zu einer gestörten Sekretion der Magensäure führt (Roepke et al., 2006; Roepke et al., 2010). KCNE2-defiziente Mäuse zeigten zusätzlich eine Funktion von Kv7.1 in der Schilddrüse, bei der Kv7.1 und KCNE2 wichtig für die Erhaltung der Kaliumhomöostase in den Thyreozyten

sind (Roepke et al., 2009). Ohne einen korrekten Kaliumhaushalt in den Schilddrüsenzellen kommt es zu keiner Akkumulation von Iodidionen in dieser Drüse, wodurch die Hormonbildung von Triiodthyronin und Thyroxin gestört wird. Weiterhin wurde die Funktion von Kv7.1 im Gehirn über Untersuchungen an KCNE2-defizienten Mäusen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Kv7.1 und KCNE2 im *Plexus choroideus* im Gehirn vorkommen, wo sie für die Bildung der Spinalflüssigkeit notwendig sind (Abbott et al., 2014; Roepke et al., 2011a).

KCNE3 hat auf die Kanalfunktion von Kv7.1 den gleichen Effekt wie KCNE2 und führt zu einem stetig offenen Kaliumkanal (Schroeder et al., 2000). KCNE3 ist mit Kv7.1 im Magen, Darm und Lunge ko-exprimiert, wo sie zusammen den Kaliumhaushalt regulieren (Preston et al., 2010; Roepke et al., 2011b).

KCNE4 inhibiert die Kanalfunktion von Kv7.1, während KCNE5 die Aktivierung von Kv7.1 verlangsamt und gleichzeitig die Inaktivierung von Kv7.1 beschleunigt (Angelo et al., 2002; Grunnet et al., 2002; Manderfield et al., 2009). Die genaue Funktion der Heteromere aus Kv7.1 und KCNE4 beziehungsweise KCNE5 ist noch nicht geklärt. Patientenmutationen in KCNE4 oder KCNE5 zeigen, dass KCNE4 oder KCNE5 für allergische Rhinitis, arterielle Fibrillation und für das Brugada-Syndrom (eine weitere Form der kardialen Arrhythmie) bedeutend sind (Freidin et al., 2013; Mao et al., 2013; Ohno et al., 2011; Palmer et al., 2012; Ravn et al., 2005; Ravn et al., 2008).

1.6.3. Weitere Regulatoren/Interaktionspartner von Kv7.1

KCNE-Proteine sind aber nicht die einzigen Interaktionspartner von Kv7.1. Andere Interaktionspartner binden Kv7.1 vermehrt am C-Terminus und können dessen Funktion beeinflussen (Abb. 4).

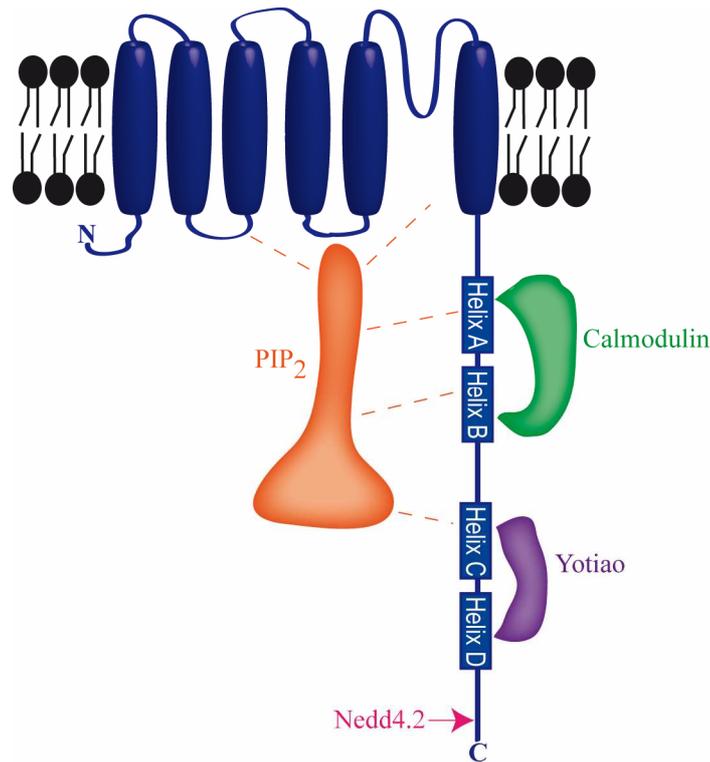


Abbildung 4: Vereinfachte Übersicht der verschiedenen Interaktionspartner von Kv7.1. Kv7.1 mit seinen sechs Transmembrandomänen und seinem langem C-Terminus mit den vier intrazellulären Helices ist in blau gezeigt. Calmodulin, das schematische Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), Yotiao und *neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like* (Nedd4.2) sind in den verschiedenen Farben markiert. PIP_2 hat verschiedene Bindungsstellen, die mit den gestrichelten Linien nur exemplarisch hervorgehoben wurden. Adaptiert nach (Haitin, Attali, 2008).

Calmodulin ist ein wichtiger Regulator von Kv7.1 (Etxeberria et al., 2008; Gamper, Shapiro, 2003; Roden, 2006; Sachyani et al., 2014; Shamgar et al., 2006; Wen, Levitan, 2002; Wiener et al., 2008; Yus-Najera et al., 2002). Es ist ein Calcium-bindendes Protein, welches in der Lage ist, Ziel-Proteine zu binden und deren Funktion zu modulieren (Ghosh et al., 2006; Wen, Levitan, 2002). Dabei ist es für manche Proteine von Bedeutung, ob Calmodulin dabei Kalziumionen gebunden hat oder nicht. Kv7.1 bindet konstitutiv beide Formen von Calmodulin (Haitin, Attali, 2008; Wen, Levitan, 2002). Assemblieren Kalzium gebundenes Calmodulin und Kv7.1, so wird die Kanalaktivität von Kv7.1 verstärkt (Bai et al., 2005; Gamper, Shapiro, 2003; Haitin, Attali, 2008). Die Bindung von Calmodulin an Kv7.1 beeinflusst die Faltung, Aktivität und den Transport von Kv7.1. Eine Calmodulin-Bindestelle (IQ-Motiv) wurde in der intrazellulären Helix A von Kv7.1 beschrieben (Abb. 4), wobei aber die Bindung von Calmodulin an Kv7.1 an der zytoplasmatischen Helix A und Helix B stattfindet (Gamper, Shapiro, 2003; Ghosh et al., 2006; Shamgar et al., 2006; Wen, Levitan, 2002; Yus-Najera et al., 2002). Dabei bindet je ein Calmodulin an ein Kv7.1-Protein (Sachyani et al., 2014).

Ein weiterer Regulator der Kanalfunktion von Kv7.1 ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), welches alle Familienmitglieder der Kv7-Familie bindet (Suh, Hille, 2007; Woodcock et al., 2009; Zaydman, Cui, 2014; Zhang et al., 2003). Die Bindung von PIP₂ ist für die Kanalaktivität aller Kv7-Kanäle unerlässlich, da PIP₂ zur Stabilisierung der offenen Form der Kv7-Kanäle beiträgt (Haitin, Attali, 2008; Loussouarn et al., 2003; Zhang et al., 2003). An Kv7.1 kann PIP₂ analog zu Calmodulin an die intrazelluläre Helix A und Helix B binden (Abb. 4) (Hernandez et al., 2008; Thomas et al., 2011). Da die Interaktionsstellen von Calmodulin und PIP₂ an Kv7.1 sehr ähnlich sind (Abb. 4), kommt es zu einer konkurrierenden Bindung von Calmodulin und PIP₂ an Kv7.1. Kommt es zur Phospholipase C-Aktivierung und PIP₂-Depletion, so bindet Calmodulin anstelle von PIP₂ an Kv7.1. Dadurch wird die Kanalaktivität von Kv7.1 nicht verändert (Loussouarn et al., 2003). Bindestellen für PIP₂ an Kv7.1 sind zusätzlich an der *voltage-sensing domain*, der *pore domain* und intrazellulären Helix C in Kv7.1 beschrieben worden (Abb. 4) (Dvir et al., 2014; Kasimova et al., 2015; Park et al., 2005).

Weiterhin ist gezeigt worden, dass Phosphorylierungen des Kv7.1 wichtige Regulatoren der Kanalaktivität von Kv7.1 sind (Kurokawa et al., 2004). Dabei bindet im C-Terminus an der Helix C und Helix D von Kv7.1 das *A-Kinase Anchoring Protein 9* (AKAP9 oder Yotiao) (Abb. 4) (Haitin, Attali, 2008; Kinoshita et al., 2014; Kurokawa et al., 2004; Kurokawa et al., 2009; Marx et al., 2002). Die Bindung von Yotiao an Kv7.1 führt zu einer Phosphorylierung des Kv7.1 über die Proteinkinase A und/oder Proteinkinase C, während die Proteinphosphatase 1 diese Phosphatgruppen spalten kann (Kathofer et al., 2000; Kathofer et al., 2003; Kurokawa et al., 2009; Marx et al., 2002). Über die Phosphorylierung des Kv7.1 wird dessen Aktivität gesteigert. Phosphorylierungen von Kv7.1 finden in Kardiomyozyten statt, wo über β -adrenerge Rezeptoren die Proteinkinase A aktiviert werden kann. Dies ist bei der Adrenalinausschüttung der Fall, wobei dann der I_{Ks}-Strom (Kv7.1 und KCNE1), als Konsequenz auf den erhöhten Herzschlag, durch Phosphorylierungen angepasst werden kann.

Als weiterer Regulator von Kv7.1 ist auch *neuronal precursor cell expressed developmentally gene 4-like* (Nedd4.2) bekannt. Als E3 Ligase ist Nedd4.2 in der Lage, Kv7.1 zu ubiquitinylieren und somit dessen Abbau zu beschleunigen (Abb. 4) (Haitin, Attali, 2008; Jespersen et al., 2007).

1.6.4. Funktionen von Kv7.1

Die Funktionen von Kv7.1 sind auch durch die Untersuchungen der KCNE-Untereinheiten erschlossen worden. Somit weiß man heute, dass Kv7.1 für die Funktion des Herzens, bei der Sekretion der Magensäure und bei der Aufrechterhaltung der Kaliumkonzentrationen in der Schilddrüse, Ohr, Darm und Lunge wichtig ist (Abbott et al., 2014; Barhanin et al., 1996; Drici et al., 1998; Preston et al., 2010; Roepke et al., 2006; Roepke et al., 2008; Roepke et al., 2009; Roepke et al., 2010; Roepke et al., 2011a; Sanguinetti et al., 1996). Weiterhin wurde Kv7.1 durch genetische Studien in den letzten Jahren als relevant für die Tumorbildung und Insulinsekretion beschrieben (March et al., 2011; Starr et al., 2009; Than et al., 2014; Unoki et al., 2008). Zusätzlich gibt es auch Studien, die Kv7.1 in Proliferationsprozessen und Apoptose beschreiben (Duranton et al., 2010; Morokuma et al., 2008a; Morokuma et al., 2008b; Zhang et al., 2013).

1.7. Apoptose

1.7.1. Funktion von Apoptose

Apoptose ist der programmierte Zelltod, der in der Entwicklung von multizellulären Organismen von zentraler Bedeutung ist (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Apoptose ist zur Erhaltung der Homöostase von Geweben und Organen entscheidend und wird ausgelöst, wenn eine Zelle nicht mehr in der Lage ist, ihrer vorgegebenen Funktion nachzugehen oder nicht mehr gebraucht wird. Um während der Apoptose sicherzustellen, dass keine Nachbarzellen geschädigt oder beeinflusst werden, muss die Integrität der Zellmembran im Verlauf der Apoptose erhalten bleiben. Dafür schrumpft die Zelle zunächst (apoptotische Volumenreduktion), was für die Auslösung des Zelltodes von entscheidender Bedeutung ist (Wang, 2004). Um die apoptotischen Volumenreduktion zu vermitteln, fließen Kalium- und Chloridionen aus der Zelle. Dieser Ausfluss an Ionen bewirkt weiterführend einen Wasserverlust, durch welchen die Zelle schlussendlich ihr Volumen verkleinert. Nachdem die Zelle Apoptose durchlaufen hat, werden kleine Vesikel abgeschnürt, die dann schnell von mononukleären Phagozyten aufgenommen werden können (Erwig, Henson, 2008; Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Als Signal zur Phagozytose gilt dabei unter anderem die Exposition von Phosphatidylserin in den extrazellulären Bereich der Zelle (Burlacu, 2003). Dysregulationen von Apoptose können zu Krebs, Asthma, Neurodegenerationen,

Autoimmunerkrankungen oder kardialen Erkrankungen führen. Apoptose wird durch die Cystein abhängigen Aspartat vermittelten Proteasen (Caspasen) und Mitgliedern der B-Zell Lymphoma-2 (BCL-2)-Familie beeinflusst.

1.7.2. Caspasen

Caspasen sind Cysteinproteasen, die typischerweise ihre Peptidsubstrate hinter einem Aspartatrest hydrolysieren (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Nicholson, 1999). Caspasen werden unter anderem während des programmierten Zelltodes aktiviert und sind für die Ausführung von Apoptose mit verantwortlich. Deswegen spricht man bei Apoptose unter anderem auch vom Caspase-abhängigen Zelltod. Insgesamt wurden mittlerweile 14 Caspasen identifiziert, die sich in ihrer Struktur ähneln. Alle Caspasen bestehen aus einer Prodomäne, sowie einer α -Kette (großer Untereinheit) und einer β -Kette (kleine Untereinheit) (Abb. 6). Kommt es zur Aktivierung von Apoptose, so wird die Prodomäne der Caspase abgespalten. Gleichzeitig kommt es zur proteolytischen Spaltung zwischen der großen und kleinen Untereinheit der Caspasen, wobei zwei kleine und zwei große Untereinheiten der gleichen Caspasen den aktiven Komplex ausbilden (Abb. 5).

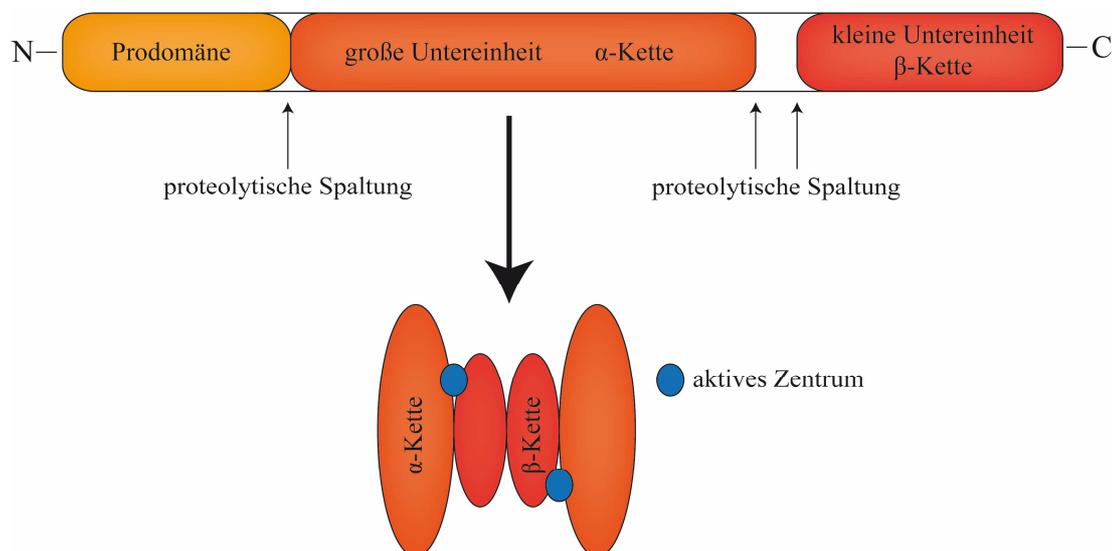


Abbildung 5: Aufbau der Caspasen. Jede Caspase besteht aus einer Prodomäne sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit. Zur Aktivierung der Caspasen wird die Prodomäne abgespalten und gleichzeitig die zwei Untereinheiten proteolytisch voneinander getrennt. Zwei so proteolytierte Caspasen dimerisieren dann zu einem aktiven Heteromer. Das aktive Zentrum ist blau hervorgehoben. N: N-Terminus. C: C-Terminus. Adaptiert nach (Grutter, 2000).

Eingeteilt werden Caspasen dabei nach verschiedenen Klassifikationen (Tab. 3) (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Einerseits werden Caspasen nach der Funktion, die sie übernehmen, unterteilt. Entweder spalten diese Caspasen Substrate in der Zelle, was den Tod der Zellen verursacht. Diese Caspasen nennt man Effektorcaspasen,

wie Caspase-3 oder -7, da sie den eigentlichen Zelltod über Proteolyse von Zielproteinen vermitteln. Caspase-8, -9 und -10 dagegen aktivieren genau diese Effektorcaspasen, weswegen man Caspase-8, -9 und -10 als Initiatorcaspasen bezeichnet. Weiterhin gibt es auch Caspasen, die in Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen, weshalb man bei Caspase-1, -4 und -13 von Entzündungscaspasen spricht (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011; Wang et al., 1998b). In den letzten Jahren ist eine weitere Klasse von Caspasen identifiziert worden, die bei übermäßigem Stress im Endoplasmatischen Retikulum aktiviert werden. Dies ist für die Caspase-12 gezeigt worden (Nakagawa et al., 2000).

Eine andere Einteilungsmöglichkeit der Caspasen richtet sich nach der Substratspezifität der jeweiligen Caspasen (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Dabei stellte man drei verschiedene Gruppen bezüglich der Substratspezifität fest. Die erste Gruppe der Caspasen schneidet bevorzugt an einer WEHD-Schnittstelle, wobei stets nach dem Aspartat geschnitten wird. Die zweite Gruppe bevorzugt DEXD-Motive, während die letzte Gruppe der Caspasen vermehrt nach (I/V/L)EXD-Motive schneidet. Die Struktur der Caspase bedingt ihre Präferenz für die jeweilige Schnittstelle und letztendlich auch die Funktion der jeweiligen Caspase. Somit haben alle Entzündungscaspasen eine Präferenz für WEHD-Motive in ihren Substraten, während Effektorcaspasen eher nach einem DEXD-Motiv schneiden. Initiatorcaspasen dagegen bevorzugen eine (I/V/L)EXD-Schnittstelle. Die meisten Substrate der Caspasen enthalten auch nur eine Schnittstelle. Es ist aber auch möglich, dass zwei Caspaseschnittstellen in einem Protein direkt hintereinander liegen (geklusterte Schnittstellen) oder aber ein Substrat mehrere Proteolysestellen für Caspasen enthält (Grutter, 2000). Die genannten Klassifikationen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Einteilung ausgewählter Caspasen nach Funktion und Substratspezifität. Die Struktur der Caspase bedingt die Substratspezifität und Funktion der jeweiligen Protease. Caspase-2 kann als Effektor- und Initiatorcaspase agieren. Auf Grund der Substratspezifität ist Caspase-2 in dieser Einteilung nur als Effektorcaspase gekennzeichnet. Adaptiert nach (Grutter, 2000).

Funktion	Caspase	Substratspezifität
Entzündung	Caspase-1	WEHD
	Caspase-4	
	Caspase-5	
	Caspase-13	
Effektor	(Caspase-2)	DEXD
	Caspase-3	
	Caspase-7	
Initiator	Caspase-6	(I/V/L)EXD
	Caspase-8	
	Caspase-9	
	Caspase-10	

1.7.3. Die Familie der B-Zell Lymphoma-2 (BCL-2)-Proteine

Wie zuvor erwähnt, übernimmt die Familie der B-Zell Lymphoma-2 (BCL-2)-Proteine eine kritische Rolle in der Apoptose (Burlacu, 2003; Chipuk et al., 2010; Czabotar et al., 2014; Danial, 2007; Dewson, 2010; Gross et al., 1999; Tsujimoto, 2002). Als Gründungsmitglied dieser Familie wurde 1987 B-Zell Lymphoma-2 (BCL-2) beschrieben (Tsujimoto, 1987), auch wenn erst Jahre später die Rolle von BCL-2 in der Apoptose entdeckt wurde. Über Sequenzvergleiche von BCL-2 mit anderen Proteinen charakterisierte man 17 Familienmitglieder (Burlacu, 2003; Chipuk et al., 2010; Czabotar et al., 2014; Danial, 2007; Dewson, 2010; Gross et al., 1999; Tsujimoto, 2002) und beschrieb vier homologe Domänen dieser Familienmitglieder, die BCL-2-Homologiedomänen (BH-Domänen). Es wurden vier verschiedene BCL-2-Homologiedomänen (BH1, BH2, BH3 und BH4) benannt, wobei die BH1-Domäne, BH2-Domäne und BH4-Domäne eine anti-apoptotische Funktion einnehmen. Die BH3-Domäne vermittelt dagegen pro-apoptotische Interaktionen. Alle BCL-2-Familienmitglieder enthalten eine C-terminale Transmembrandomäne, welche für den Transport zum Mitochondrium sowie für die Integrierung in die äußere Mitochondrienmembran unabdinglich ist. Durch Strukturvergleiche der Mitglieder teilt man die BCL-2-Familie mittlerweile in drei verschiedene Gruppen ein (Abb. 6). Insgesamt zeichnet sich diese Proteinfamilie durch ihre Fähigkeit aus, Homo- sowie Heterodimere zu bilden und damit Apoptose beeinflussen zu können.

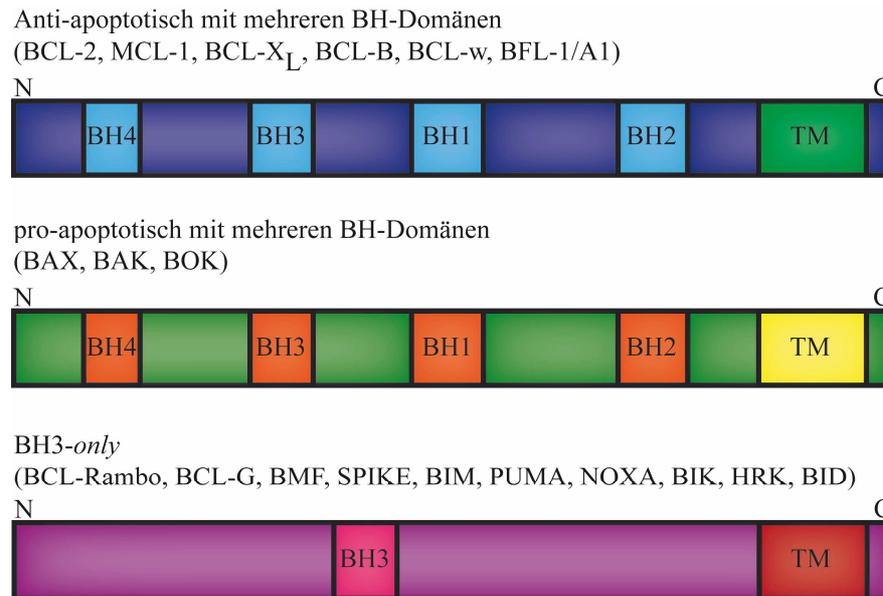


Abbildung 6: Übersicht der BCL-2-Proteinfamilie. Alle drei Familien, anti-apoptotisch multiple BH-Domänen, pro-apoptotisch multiple BH-Domänen und BH3-only Proteine sind in ihrer Struktur gezeigt. BH: BCL-2-Homologiedomäne. C: C-Terminus. N: N-Terminus. TM: Transmembrandomäne. Adaptiert nach (Danial, 2007; Dewson, 2010; Gross et al., 1999).

Die erste Gruppe der BCL-2-Familie beinhaltet anti-apoptotische Proteine, die alle vier BH-Domänen tragen (Burlacu, 2003; Chipuk et al., 2010; Czabotar et al., 2014; Danial, 2007; Dewson, 2010; Gross et al., 1999; Tsujimoto, 2002). Als bekanntestes Mitglied zählt dabei BCL-2, welches im Mitochondrium an Cytochrom C gebunden ist. Gleichzeitig kann BCL-2 aber auch das *BCL-2 associated X protein* (BAX) und *BCL-2 homologous antagonist killer* (BAK) binden und die pro-apoptotische Funktion von BAX und BAK unterbinden. Alle anti-apoptotischen Mitglieder sind im Mitochondrium, in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und/oder in der nukleären Membran zu finden.

In der zweiten Gruppe der BCL-2-Familie befinden sich nur pro-apoptotische Mitglieder, welche vier BH-Domänen enthalten, analog zur ersten Gruppe der BCL-2-Familie (Burlacu, 2003; Chipuk et al., 2010; Czabotar et al., 2014; Danial, 2007; Dewson, 2010; Gross et al., 1999; Tsujimoto, 2002). BAX und BAK sind die am besten beschriebenen Vertreter dieser Gruppe und deren Funktion wird unter 1.7.4. diskutiert.

Die dritte Gruppe der BCL-2-Familie setzt sich aus pro-apoptotische Proteinen zusammen, die alle jeweils nur die BH3-Domäne enthalten. Demnach werden diese Proteine auch BH3-only genannt (Burlacu, 2003; Chipuk et al., 2010; Czabotar et al., 2014; Danial, 2007; Dewson, 2010; Gross et al., 1999; Tsujimoto, 2002). Diese Proteine sind als Modulatoren der anderen Familienmitglieder bekannt, indem sie die Aktivität und Lokalisation der jeweiligen Bindungspartner beeinflussen. Die BH3-only Proteine binden an anti-apoptotische Familienmitglieder, wodurch deren Einfluss auf BAX und BAK

aufgehoben werden kann. Andererseits sind BH3-*only* Proteine in der Lage, an BAX und BAK zu binden und stehen damit in Bindungskonkurrenz zu den anti-apoptotischen Familienmitgliedern. Die Bindung von BH3-*only* Proteinen an BAX und BAK hat stets eine Konformationsänderung von BAX und BAK zur Folge, welche die Dimerisierung von beiden Proteinen begünstigt.

Insgesamt lässt sich erkennen, dass die BCL-2-Proteinfamilie eine zentrale Rolle in der Modulation der Apoptose einnimmt (Burlacu, 2003; Chipuk et al., 2010; Czabotar et al., 2014; Danial, 2007; Dewson, 2010; Gross et al., 1999; Tsujimoto, 2002). Um das Zusammenspiel verschiedener BCL-2-Familienmitglieder zu gewährleisten, haben die jeweiligen Familienmitglieder die Fähigkeit sich gegenseitig zu binden und darüber ihre Aktivität zu verändern beziehungsweise ihren Transport oder Lokalisation zu beeinflussen. Wenn nun aber die Expression von anti-apoptotischen Familienmitgliedern, wie BCL-2, verändert wird, so kann damit das Zellschicksal beeinflusst werden. Gerade das Verhältnis von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Proteinen (BAX und BAK *versus* BCL-2) ist dabei kritisch und in vielen Erkrankungen verändert, was deren Pathophysiologie stark beeinflusst. Zum Teil wird das Verhältnis aus BAX und BCL-2 oder BAK und BCL-2 sogar als klinischer Marker für akute myeloid Leukämie verwendet (Del Poeta et al., 2003).

1.7.4. Signalwege, die zu Apoptose führen

Um den programmierten Zelltod in einer Zelle auszulösen, bedarf es eines geeigneten Stimulus (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Apoptose kann dabei durch die Bindung von extrazellulären Signalmolekülen, wie den *tumor necrosis factor α* (TNF- α) oder den FAS-Liganden (CD95L), an ihre Rezeptoren ausgelöst werden. Alternativ kann es über intrazelluläre Signale zur Auslösung von Apoptose kommen. Dabei ist vor allem die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies im Zellinneren oder eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration als intrazellulärer Auslöser von Apoptose bekannt. Demnach unterscheidet man zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg, wobei beide Signalwege zu Apoptose führen.

Kommt es zu einem extrazellulären Apoptose-auslösenden Stimulus, so spricht man vom extrinsischen Signalweg der Apoptose (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Bei diesem Signalweg werden über die Bindung von extrazellulären

Signalmolekülen, wie dem *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) oder dem FAS-Liganden (CD95L), Todesrezeptoren aktiviert (Ashkenazi, Dixit, 1998; Medema et al., 1997; Yang et al., 1998). Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren werden Caspasen proteolytisch aktiviert (Nicholson, 1999), welche dann den eigentlichen Zelltod vermitteln können.

Da in dieser Arbeit BAX, BAK und BCL-2 im Fokus standen, wird genauer auf den intrinsischen Signalweg der Apoptose eingegangen (Abb. 7). Kommt es zur Akkumulation eines intrazellulären Stresssignals, so durchläuft die Zellen den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Dabei kommt es zunächst zu einer Translokation des pro-apoptischen BAX vom Zytosol zum Mitochondrium. Im Mitochondrium bildet BAX einen Multiproteinkomplex mit BAK, welches auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist. Durch den aus BAX und BAK gebildeten Multikomplex entsteht eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, die einerseits die Integrität der äußeren mitochondrialen Membran aufhebt und andererseits auch das mitochondriale Potential vermindert. Dies wiederum hebt die ATP-Synthese in diesem Zellorganell auf. Somit fehlt der Zelle der wichtigste Energielieferant. Gleichzeitig wird die Bindung von BCL-2 an Cytochrom C aufgehoben, wodurch Cytochrom C durch die BAX/BAK-gebildete Pore zusammen mit dem *apoptosis inducing factor* (AIF), der Endonuklease G, dem *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1), Diablo und der HtrA Serinprotease-2 in das Zytosol gelangen. Apaf-1 und Cytochrom C bilden dann im Zytosol zusammen mit der Proform der Caspase-9 das Apoptosom, in welchem die Caspase-9 aktiviert wird (Abb. 7) (Nicholson, 1999). Daraufhin kann Caspase-9 wiederum Caspase-3 und -7 aktivieren (Li et al., 1997; Nicholson, 1999; Srinivasula et al., 1998). Caspase-3 und -7 zerstören durch Degradation der zum Zytoskelett zugehörigen Proteine das Zellgerüst, wobei die HtrA Serinprotease-2 unterstützend wirkt (Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Gleichzeitig aktivieren Caspase-3 und -7 aber die Caspase-aktivierte DNase (CAD), die zum DNA-Abbau während der Apoptose benötigt wird (Meiss, 2010). Zusätzlich translozieren aber auch AIF und die Endonuklease G in den Zellkern, um dort DNA zu degradieren. Die Aktivierung der Caspase-3, -7 und -9 wird durch Diablo und der HtrA Serinprotease-2 verstärkt, da Diablo und die HtrA Serinprotease-2 den *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) inhibieren. Dieser ist dann nicht mehr in der Lage ist, Caspasen zu inhibieren (Deveraux et al., 1998). Diablo ist ein mitochondrial lokalisiertes Protein, von welchem während der Apoptose die Prodomäne abgeschnitten wird. Dadurch verlässt das mature Protein das Mitochondrium, um XIAP im Zytosol zu hemmen (de Almagro, Vucic, 2012; Shiozaki, Shi, 2004; Vaux, Silke, 2003).

Schlussendlich kommt es über die Aktivierung verschiedener Caspasen, wie zum Beispiel Caspase-3 oder -7, zum Zelltod.

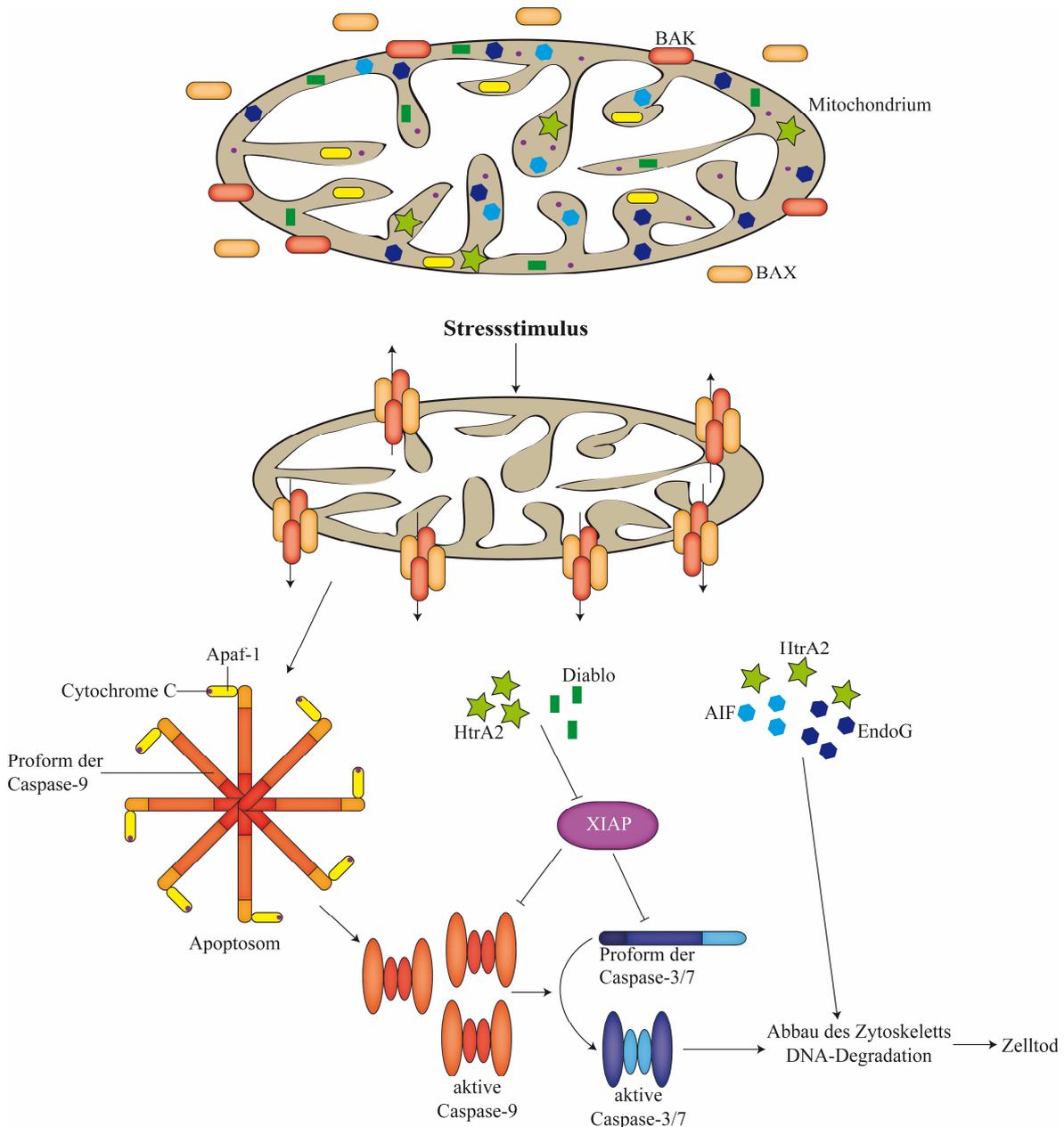


Abbildung 7: Vereinfacht dargestellter Signalweg der intrinsischen Apoptose. Nach einem intrazellulären Stressstimulus transloziert das *BCL-2-associated X Protein* (BAX) zum Mitochondrium und bildet Komplexe mit dem mitochondrial lokalisiertem *BCL-2 homologous antagonist killer* (BAK). Dadurch wird die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran so gestört, dass es über den aus BAK und BAX gebildeten Multiproteinkomplex zur Freisetzung von Cytochrom C, *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1), Diablo, HtrA Serinprotease-2 (HtrA2), *apoptosis inducing factor* (AIF) und Endonuklease G (EndoG) kommt. Cytochrom C, Apaf-1 und die Proform der Caspase-9 bilden einen weiteren Komplex, das Apoptosom. Im Apoptosom wird Caspase-9 proteolytisch aktiviert, wodurch Caspase-9 dann wiederum Caspase-3 und -7 aktivieren kann. Gleichzeitig wird die Inhibition von Caspasen über den *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) durch Diablo und HtrA2 aufgehoben, was die Aktivität der Caspasen verstärkt. Somit kommt es über Caspase-3 und -7 zum Abbau des Zytoskeletts. Bei Abbau des Zellgerüsts werden Caspase-3 und -7 durch HtrA2 unterstützt. Die DNA-Degradierung wird zusätzlich durch AIF und EndoG weiter vorangetrieben. Adaptiert nach (de Almagro, Vucic, 2012; Galluzzi et al., 2012; Vucic et al., 2011).

1.7.5. Amino-Terminal Enhancer of Split (AES)

Amino-Terminal Enhancer of Split (AES) wurde als neuer Interaktionspartner von Kv7.1 in dieser Arbeit untersucht. AES gehört zur im Menschen aus vier Mitgliedern bestehenden Familie der *Transducin like Enhancer of Split* (TLE)-Proteine (Beagle, Johnson, 2010; Gasperowicz, Otto, 2005; Jennings, Ish-Horowicz, 2008). Diese Familie wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* beschrieben und die Mitglieder der Familie sind als Ko-Repressoren der Translation bekannt. *Transducin like Enhancer of Split*-Proteine binden selber keine DNA, gehen aber Protein-Protein Interaktionen ein. Dabei binden diese Proteine vor allem solche Proteine, die im Komplex der Translationsmaschinerie wichtig sind, wie Histondeacetylasen oder Transkriptionsfaktoren, deren Funktionen von diesen Familienmitgliedern moduliert werden können.

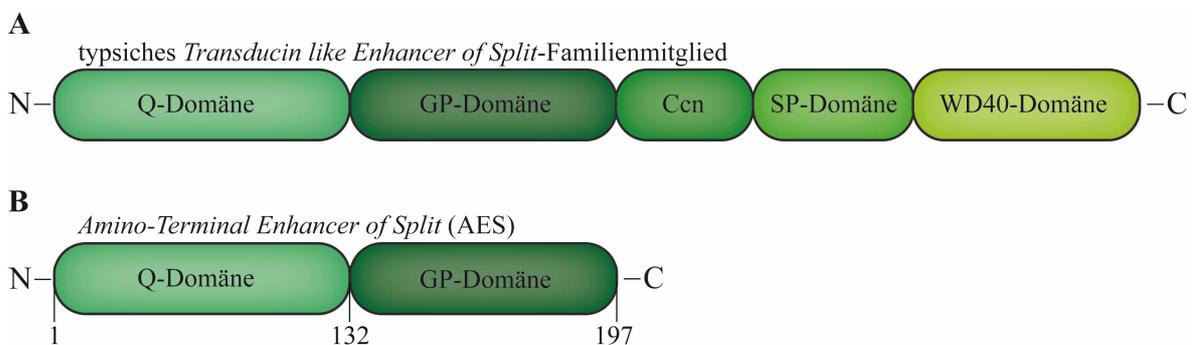


Abbildung 8: Schematische Struktur der *Transducin like Enhancer of Split* (TLE)-Familie. (A) Ein typisches *Transducin like Enhancer of Split*-Familienmitglied. (B) *Amino-Terminal Enhancer of Split* (AES) Die Zahlen geben die jeweiligen Aminosäuren von AES an. Q: Glutamin. G: Glycin. P: Prolin. S: Serin. Ccn: nukleäre Lokalisationsequenz. Adaptiert nach (Beagle, Johnson, 2010; Gasperowicz, Otto, 2005).

AES nimmt in dieser Familie eine Sonderstellung ein, da AES nur aus einer Glutamin reichen (Q)-Domäne und einer Glycin und Prolin reichen (GP)-Domäne besteht (Abb. 8) (Beagle, Johnson, 2010; Gasperowicz, Otto, 2005; Jennings, Ish-Horowicz, 2008). Weiterhin ist AES nicht in der Lage, mit Histondeacetylasen zu interagieren, bindet aber vermehrt andere Familienmitglieder, damit AES deren Funktion unterstützen kann. Im Gegensatz zu anderen *Transducin like Enhancer of Split*-Proteinen kann AES auch Signalwege, wie Apoptose, stimulieren, weswegen es eher als Ko-Modulator gesehen wird. AES hat seine höchste Expression im Säuger im Herzen, Muskeln und Gehirn.

Funktionen von AES sind im Zusammenhang mit Interaktionsstudien entdeckt worden (Tab. 4).

Tabelle 4: Ausgewählte Interaktionspartner von AES und die Funktion dieser Interaktion. Adaptiert nach (Beagle, Johnson, 2010; Gasperowicz, Otto, 2005).

Transkriptionsfaktor	Gewebe/Prozess, wo die Interaktion bedeutend ist
<i>Runt-related transcription factor 2</i> (Runx2)	Entwickelnder Knochen
T-Zell Faktor-4 (TCF-4)	Entwicklung der Hypophyse
Androgenrezeptor	Aktivitätsverminderung des Androgenrezeptors
Transkriptionsfaktor II E (TFII E)	Transkriptionsmaschinerie
p65 Untereinheit von <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i> (NFκB)	Apoptose?
<i>Homeobox protein 3</i> (Six3)	Entwicklung des Auges
<i>Homeobox protein 6</i> (Six6)	
<i>BCL-2 inhibitor of transcription 1</i> (Bit1)	Apoptose

Dabei ist die Bindung von AES an *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) besonders gut beschrieben. Es wurde gezeigt, dass AES-defiziente Mäuse ein retardiertes Körperwachstum zeigen (Wang et al., 2004; Wang et al., 2002b), was über die Interaktion von AES mit *Runt-related transcription factor 2* erklärt werden konnte. Durch die fehlende Bindung von AES kann *Runt-related transcription factor 2* das Körperwachstum nicht angemessen stimulieren. Gleichzeitig hat AES einen Einfluss auf den Notch-Signalweg, welchen AES auf ungeklärte Weise inhibieren kann (Christofori, 2011; Sonoshita et al., 2011). Die Inhibition des Notch-Signalweges wurde *in vivo* mit AES-defizienten Mäusen validiert, wobei festgestellt wurde, dass AES die Metastasierung von Darmkrebs vermindern kann. Weiterhin wird durch die Bindung von AES an *BCL-2 inhibitor of transcription 1* (Bit1) die pro-apoptotische Funktion von Bit1 verstärkt (Jan et al., 2004).

1.8. Proteolyse

Wie schon im Abschnitt über Apoptose beschrieben, kann die Prozessierung/Proteolyse von Proteinen ein bedeutender Schritt zur Modulation der Proteinfunktion sein (Puente, Lopez-Otin, 2004; Puente et al., 2005). Proteolyse selber ist dabei nur die Hydrolyse von Peptidbindungen, wie sie zur Aktivierung der Caspasen in dieser Arbeit beschrieben worden ist. Die posttranslationale Modifikation von Proteinen über Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Anbringen von Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankern, Proteolyse oder Ubiquitynlierungen sind bekannt dafür, die Funktionen von Proteinen beeinflussen zu können (Wang et al., 2014). Die Proteolyse ist dabei besonders, da sie unwiderrufflich ist (Puente, Lopez-Otin, 2004; Puente et al., 2005). Als Substrate für Proteasen sind unter anderem Transkriptionsfaktoren, Membranproteine, Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren identifiziert worden, womit die Proteolyse wichtig für DNA-Replikation, Zellzyklus, Zellproliferation, Differenzierung oder Abbau von Proteinen

ist (Puente, Lopez-Otin, 2004; Puente et al., 2005; Wang et al., 2014). Der Mensch exprimiert über 500 Proteasen, die entweder in Cystein-, Aspartat-, Metallo-, Serin- oder Threoninproteasen eingeteilt werden, je nachdem welche Aminosäure die katalytische Aktivität der jeweiligen Protease bedingt (Puente, Lopez-Otin, 2004; Puente et al., 2005; Wang et al., 2014). Als besondere Proteolyse ist dabei die Intramembranproteolyse hervorzuheben, da ein Prozess, der Wasser benötigt, in der lipophilen Umgebung der Zellmembran stattfindet (De Strooper, Annaert, 2010). Dies wird über die Struktur der Intramembranproteasen möglich, welche eine Kanal ähnliche Struktur einnehmen und somit eine Wasserpore in der Membran bilden (Li et al., 2013). Damit kann eine Proteolyse innerhalb der Zellmembran überhaupt erst möglich werden.

Für Kaliumkanäle sind bis jetzt wenige proteolytische Schnitte bekannt. Es ist gezeigt worden, dass das *Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1* (BACE1) sowie der γ -Sekretase-Komplex die β -Untereinheiten KCNE1 und KCNE2 schneiden können (Sachse et al., 2013). In Bezug auf andere spannungsabhängige Ionenkanäle ist die Proteolyse der β -Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 4$ der spannungsabhängigen Natriumkanäle Nav1.1 und Nav1.2 publiziert worden (Huth et al., 2009; Kim et al., 2007). Fragmente, die durch Proteolyse entstehen, können auch zum Zellkern translozieren, wo sie die Genexpression beeinflussen können (Chung, Jan, 2006). Dies ist vor allem am Beispiel des Notchrezeptors intensiv untersucht worden (Christian, 2012; Prox et al., 2012; Selkoe, Kopan, 2003). Damit gäbe es für diese Proteolyse-Substrate eine neue Funktion, welche unabhängig der ursprünglichen Proteinfunktion liegen könnte. Bis jetzt ist dies aber für Kaliumkanäle noch nicht gezeigt worden.

2. FRAGESTELLUNG

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv7.1 zu zwei C-terminalen Fragmenten, CTF1 und CTF2, prozessiert wird. Weiterhin war bekannt, dass das CTF2 durch eine Caspasen-vermittelte Prozessierung von Kv7.1 entsteht.

Zunächst sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Caspase/n für die Proteolyse von Kv7.1 verantwortlich ist/sind.

Da Caspasen besonders während der Entzündung und Apoptose aktiv sind beziehungsweise aktiviert werden, sollte des Weiteren die Frage beantwortet werden, inwieweit die proteolytische Prozessierung von Kv7.1 während Entzündungsprozessen und Apoptose von Bedeutung sein könnte.

Weiterhin sollte die Funktion des CTF2 von Kv7.1 näher untersucht werden. Durch Vorarbeiten war bekannt, dass das CTF2-Fragment in der Lage ist, in den Zellkern zu translozieren. Demnach sollte analysiert werden, ob das CTF2-Fragment von Kv7.1 die Expression von Genen regulieren und damit vielleicht Prozesse, wie Apoptose, beeinflussen kann.

Zusätzlich sollte die Bindung des *Amino-Terminal Enhancer of Splits* an Kv7.1, welcher als neuer Interaktionspartner des Kv7.1 identifiziert wurde, weiter charakterisiert werden. Eine funktionelle Analyse der Interaktion sollte auch durchgeführt werden.

Neben der Charakterisierung der Funktion des CTF2 sollte ebenfalls die Entstehung des größeren CTF1 von Kv7.1 untersucht werden und welche Bedeutung die Prozessierung zum CTF1 auf die Kanalaktivität von Kv7.1 ausübt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Reagenzien wurden entweder bei Carl Roth (Karlsruhe, D), Thermo Fischer (*Waltham*, USA), Invitrogen (Karlsruhe, D), Merck Millipore (Darmstadt, D) oder Sigma-Aldrich (*St. Louis*, USA) im Reinheitsgrad *per Analysis* bezogen. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls zur Sterilisation autoklaviert (Tecnorma Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D).

3.1.2. Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien und deren Referenzen.

Name	Herkunft	Referenz
Cos-7	Niere der grünen Meerkatze	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ), Braunschweig
Hek 293 T	Humanes embryonales Nierenzellkarzinom	Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg
HeLa	Humanes Cervixkarzinom	DMSZ, Braunschweig
HL-1	Murine kardiale Tumorlinie	(Claycomb et al., 1998)
SW707	Humanes Kolonkarzinom	canSAR, London (Bulusu et al., 2014)

Als Bakterienstamm wurde stets *Escherichia coli* *XL-1 blue* der Firma Agilent Technologies (*Santa Clara*, USA) verwendet.

3.1.3. Vektoren und Plasmide

Tabelle 6: Auflistung aller verwendeten Vektoren sowie deren Resistenzgene.

Name	Bakterielles Resistenzgen	Resistenzgen für Säugetierzellen
pcDNA3.1-Hygro(+)	Ampicillin	Hygromycin B
peGFP	Kanamycin	Neomycin (G418)
pFrog3	Ampicillin	Neomycin (G418)

Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Konstrukte. N-X: N-terminaler Tag. C-X: C-terminaler Tag

Vektor	Konstrukt	Tag
pFrog3	A372D	C-myc
pFrog3	AES	C-Ha, -myc
pFrog3	AES- Δ CCN	C-Ha
pFrog3	AES- Δ GP	C-Ha
pFrog3	CTF1	C-myc
pFrog3	CTF2	C-myc
pFrog3	CTF2-L559P	C-myc
pFrog3	CTF2-L559P-L602P	C-myc
pFrog3	CTF2-L602P	C-myc
pFrog3	D317A	C-eGFP
pFrog3	D459A	C-eGFP, -myc
peGFP	eGFP	
peGFP	eGFP-Progerin	N-eGFP
pFrog3	F351A	C-myc
pFrog3	F351S	C-myc
pFrog3	G348A	C-myc
pFrog3	G350A	C-myc
pFrog3	G350R	C-myc
pFrog3	G460E	C-myc
pFrog3	G460S	C-myc
pFrog3	G460X	C-myc
pFrog3	KCNE1	C-myc
pFrog3	Kv7.1	C-eGFP, -HA, -myc
pFrog3	Kv7.5	C-Ha
pFrog3	Limp-2	C-myc
peGFP	NLS-eGFP	C-eGFP
pFrog3	NTF	C-myc
pFrog3	S349A	C-myc
pFrog3	S349P	C-myc
pFrog3	S349W	C-myc
pFrog3	S464E	C-myc
pFrog3	S468E	C-myc
pFrog3	Y461E	C-myc
pFrog3	Δ ALKVQ	C-myc
pFrog3	Δ G-KVQ	C-myc
pFrog3	Δ GSGF	C-myc
pFrog3	Δ I-STW	C-myc
pFrog3	Δ K-SHT	C-myc
pFrog3	Δ LxxLL	C-myc
pFrog3	Δ Q-ASL	C-myc

Tabelle 8: Auflistung aller verwendeten Primer zur Herstellung der angegebenen Konstrukte. Die Sequenz ist stets in 5' → 3' Richtung angezeigt.

Primer	Sequenz	Konstrukt	Länge (bp)
A372D_fw A372D_rv	tccccggcggcagactcactcatt aatgagtgagtctgccgccgggga	Kv7.1-A372D	24 24
AES-ΔCCN_rv	ggatcccagaggaggccggtgcc	AES-ΔCCN	24
AES-ΔGP_fw AES-ΔGP_rv	caagcccaccagctgtccgcgtgggt ggaaccacagcgcggacagctggtgggc	AES-ΔGP	27 27
CTF2-L559P_fw CTF2-L559P_rv	atcaaggagccgcagaggagg cctcctctcggctccttgat	Kv7.1-CTF2-L559P	21 21
CTF2-L602P_fw CTF2-L602P_rv	gagacgcagccggaccagagg cctctggtccggtcgtcac	Kv7.1-CTF2-L602P	21 21
F351A_fw F351A_rv	ggctcaggagctgcaactgaag cttcagtgcagctcctgagcc	Kv7.1-F351A	21 21
F351S_fw F351S_rv	ggctcggggtctgccctgaag cttcaggcagaccccagacc	Kv7.1-F351S	21 21
G348A_fw G348A_rv	gggattctgcctcggggttt aaaccccagggcaagaatccc	Kv7.1-G348A	21 21
G350A_fw G350A_rv	ctggctcggcgtttgccctg cagggcaaacgccagccaag	Kv7.1-G350A	21 21
G350R_fw G350R_rv	ctggctcggcgtttgccctg cagggcaaacctcagccaag	Kv7.1-G350R	21 21
S349A_fw S349A_rv	attcttggcgcggggtttgcc ggcaaaccccgcccaagaat	Kv7.1-S349A	21 21
S349P_fw S349P_rv	attcttggccccggggtttgcc ggcaaaccccggccaagaat	Kv7.1-S349P	21 21
S349W_fw S349W_rv	attcttggctggggtttgcc ggcaaaccccagccaagaat	Kv7.1-S349W	21 21
ΔALKVQ_fw ΔALKVQ_rv	attcttggctcggggtttcagaagcag cttctgcctctgcttctgaaccccga	Kv7.1-ΔALKVQ	27 27
ΔG-KVQ_fw ΔG-KVQ_rv	ctcccagcgggattcttcagaagcag cttctgcctctgcttctgaagaatccc	Kv7.1-ΔG-KVQ	27 27
ΔGSGF_fw ΔGSGF_rv	ctcccagcgggattcttcacctgaag ctgctgcacctcagggaagaatccc	Kv7.1-ΔGSGF	27 27
ΔI-STW_fw ΔI-STW_rv	gcggcagcctcactcaagatctacatccgg ccgatgtagatcttgagtgaggctgccgc	Kv7.1-ΔI-STW	30 30
ΔK-SHT_fw ΔK-SHT_rv	cccgactcctcacctggctgctgca ggggctgggtgacagcagccaggtgga	Kv7.1-ΔK-SHT	27 27
ΔQ-ASL_fw ΔQ-ASL_rv	gcctgaaggtgcagattcagaccgcatgg ccatgcggctgtaactcgcacctcagggc	Kv7.1-ΔQ-ASL	30 30

3.1.4. Verwendete Kits

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Kits und ihrer Hersteller.

Kit	Hersteller
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit	Life Technologies
NucleoSpin RNA Kit Plus	Machery-Nagel
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
TMA-6	Baden Biotek

3.1.5. Verwendete Puffer

Tabelle 10: Alle verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
1x Lämmli	0,2 M Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris) 17,2 % Glycin 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) 100 mM Dithiothreitol (DTT) Bromphenolblau zum Anfärben
5x Lämmli	1 M Tris 86 % Glycin 10 % SDS 500 mM DTT Bromphenolblau zum Anfärben
Amminopersulfat (APS)-Lösung	10 % APS in H ₂ O lösen
Kalziumchloridlösung	0,1 M CaCl ₂ * 6 H ₂ O 5 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O pH = 7,0 und autoklavieren
Kalziumchlorid-Glycerol-Lösung	1 : 4 Kalziumchlorid zu 86 % Glycerol (steril filtriert)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) und autoklavieren
EBC-Puffer	120 mM NaCl 50 mM Tris 0,5 % NP-40
Elektrophoresepuffer	0,192 M Glycin 25 mM Tris 3,5 mM SDS
Detektionslösung A	0,1 M Tris 0,025 % Luminol pH = 8,6
Detektionslösung B	0,11 % p-Coumarnsäure (in Dimethylsulfoxid (DMSO)) 2% fetales Kälberserum (FKS)
<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (FACS)-Puffer	0,1 % NaN ₃ 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH = 7,4
<i>Lysogeny Broth</i> (LB)-Medium	10 g/l Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt pH = 7,0 und autoklavieren
LB-Platten	LB-Medium 1 % Agar Autoklavieren

Mowiol/Dapi/DABCO	25 % Mowiol 3 % Glycerin 2 % 1,4-Diazabicyclo(2,2,2,-)Oktan-Triethylendiamin (DABCO) 1 µg/ml DAPI
ND-96	96 mM NaCl 2 mM KCl 1,8 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 50 µg/ml G418 pH = 7,4
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH = 7,4
Puffer A	10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES) 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) 1 mM DTT
Puffer C	20 mM Hepes 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT
Sammelgel	0,5 M Tris 0,4 % SDS pH = 6,8
Stripping Puffer	2 % SDS 62,5 mM Tris 73 µl β-Mercaptoethanol auf 10 ml
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	0,04 M Tris 5,5 % Essigsäure 1 mM EDTA
TANK	25 mM Tris 200 mM Glycin pH = 8,3
<i>Tris Buffered Saline (TBS)</i>	0,1 M NaCl 5 mM Tris 5 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O pH = 7,0 und autoklavieren
TBS-Tween (TBS-T)	20 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween-20
Trenngel	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH = 8,8

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. cDNA-Konstrukte

Zur Herstellung der Konstrukte wurde die kodierende DNA-Sequenz des entsprechenden Proteins in den pFrog3-Expressionsvektor kloniert (Gunther et al., 1998) (Tab. 6), welcher sich zur Proteinexpression in Bakterien, Säugetierzellen und *Xenopus laevis* Oozyten eignet. Der pFrog3-Vektor ist ein Hybrid aus dem pcDNA3.1- (Invitrogen) und dem Oozyten-Expressionsvektor pTLN (Lorenz et al., 1996) (Abb. 9). Oozyten-Expressionsvektoren zeichnen sich darüber aus, dass sie zur Expression von Proteinen in Säugetierzellen und *Xenopus laevis* Oozyten geeignet sind. Dafür tragen diese Oozyten-Expressionsvektoren zwei Promotorbereiche. Einen Promotorbereich, um die Expression in Säugetierzellen zu ermöglichen und einen weiteren Promotorbereich, der die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten ermöglicht.

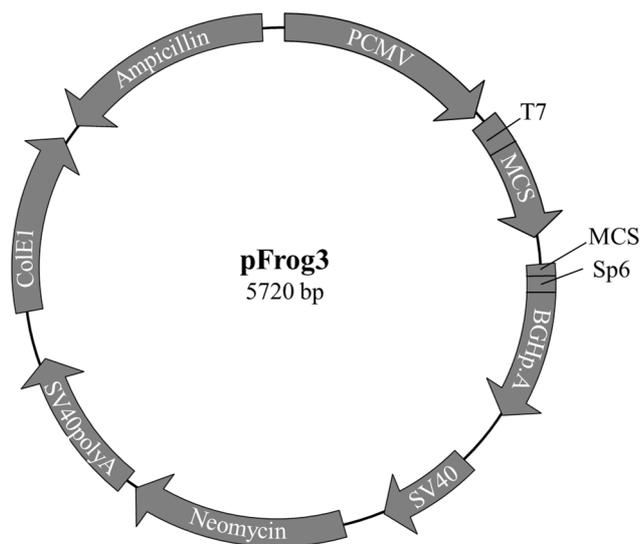


Abbildung 9: Schematische Darstellung des pFrog3-Vektors. Die wichtigsten Bereiche des Vektors sind dargestellt. Der T7-Promoter ist für die Expression in Säugetierzellen von Bedeutung, während der BGHpA-Bereich die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten sichert. MCS: multiple cloning site

Alle verwendeten Vektoren und Konstrukte sind in Tabelle 6 und 7 aufgelistet.

3.2.1.2. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Um Punktmutationen, Deletionen und veränderte Markierungen (Tag) einzufügen, wurde die 1983 erfundene Methode der Polymerasenkettenreaktion (PCR) angewendet (Saiki et al., 1988). Dafür wurde das zwei-stufige System der Fusions-PCR verwendet, in dem mit

verschiedenen Oligonukleotiden (Primer) die Mutation beziehungsweise Deletion eingebracht wird (Abb. 10).

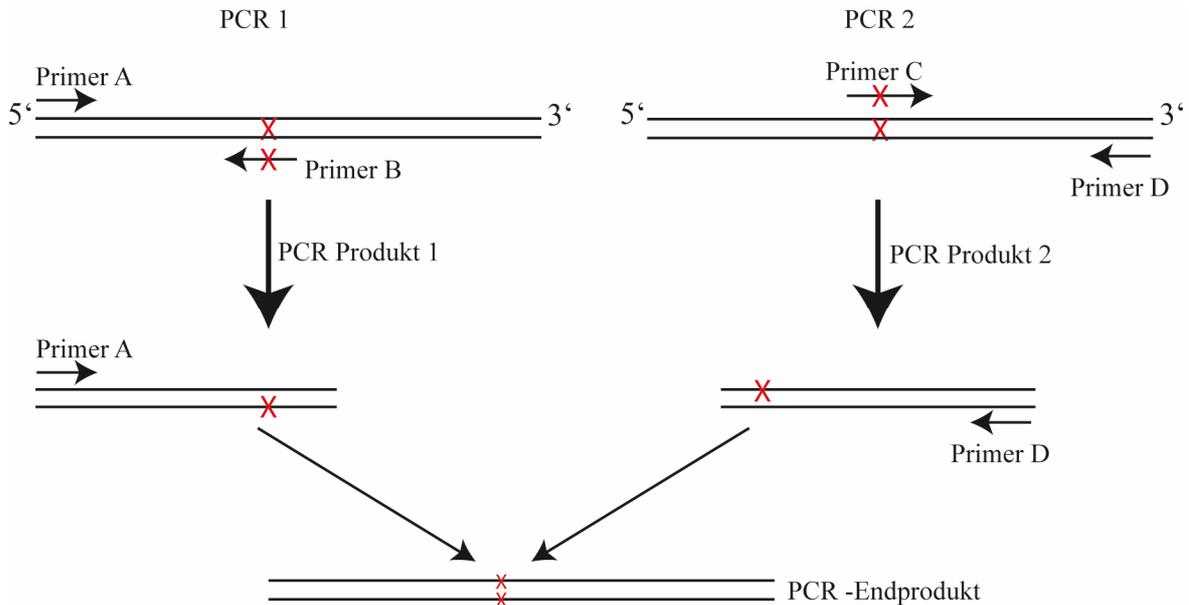


Abbildung 10: Übersicht der Fusions-PCR. Die in dem Beispiel einzufügende Mutation ist mit X gekennzeichnet und ist in den Primern B und C enthalten, während die flankierenden Primer A und D keine Veränderung gegenüber der Matrize bildenden DNA tragen. Über zwei Stufen der PCR kann dann die Mutation in beiden Strängen der DNA eingearbeitet werden.

In der ersten PCR wird je ein flankierender (A und D) und ein Mutations-tragender Primer (B und C) mit dem in Tabelle 11 aufgeführten Protokoll verwendet, welche die Veränderung jeweils in einem DNA-Strang einführen.

Tabelle 11: Zusammensetzung der PCR. Das unten angegebene Protokoll wurde für alle PCRs eingesetzt.

Substanz	Hersteller	Menge [μ l]
bidestilliertes Wasser	-	30,5
DMSO	Carl Roth	2,5
dNTPs [2mM]	ThermoScientific	4
10x Pfu-Puffer	ThermoScientific	5
Template [10 ng/ μ l]	-	5
Primer [20 mM]	SigmaAldrich	je 1
Pfu-DNA-Polymerase	ThermoScientific	1

Um die Mutation in Sense- und Antisensestrang einzubauen, wird eine weitere PCR aus den beiden überlappenden PCR-Produkten mit den jeweils flankierenden Primern (A und D) durchgeführt (Abb. 11). Als PCR-Protokoll wurde stets das in Tabelle 12 gelistete Protokoll verwendet.

Tabelle 12: Übersicht des PCR-Protokolls. min: Minuten. sec: Sekunden

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit
Denaturierung	95	5 min
Denaturierung	95	30 sec
Annealing	50 – 70	30 sec 45x
Elongation	70	30 sec – 3 min
Elongation	70	5 min
Kühlung	10	∞

Die *Annealing*-Temperatur und Länge der Elongation richtete sich nach dem jeweils verwendeten Primerpaar und DNA-Matrize. Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt.

3.2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurde diese mit Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und auf ein horizontales 1,5 – 2 %iges Agarosegel geladen. Um dieses herzustellen, wurden entsprechende Mengen Agarose in 300 ml TAE-Puffer (Tab. 10) unter Hitzeeinwirkung gelöst. Nachdem die erwärmte Lösung mit 10 µl der zur Visualisierung notwendigen Ethidiumbromidlösung versetzt wurde und erstarrte, wurde das Gel beladen und die Proben bei 120 – 130 V für 20 – 25 Minuten in TAE-Puffer durch die Porendichte des Gels aufgetrennt. Unter UV-Strahlung wurden die DNA-Banden sichtbar und gegebenenfalls zur weiteren Aufreinigung ausgeschnitten.

3.2.1.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Ein ausgeschnittenes Gelstück wurde mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt. Dafür wurde das ausgeschnittene Gelstück mit 300 µl *Binding Solution* versetzt und bei 60 °C so lange erhitzt, bis das Gelstück vollständig gelöst war. Daraufhin wurde 150 µl Isopropanol hinzugegeben, vermischt und alles auf eine DNA-bindende Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 Minute bei 13.000 rpm wurde die Säule zuerst mit 500 µl und dann mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und dazwischen je 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde dann in 50 µl Wasser eluiert und vermessen.

3.2.1.5. Restriktionsverdau

Um mutierte DNA-Stücke mit einem geeigneten Vektorsystem, wie den pFrog3, zu verbinden oder um einen Vektor zu linearisieren, wurden Restriktionsenzyme (ThermoScientific) eingesetzt. Diese schneiden DNA an spezifischen Stellen und ermöglichen nach Aufreinigung (s. 2.2.1.4.) ein Verbinden von mehreren DNA-Fragmenten. Zur Durchführung wurden jeweils 1 µg DNA mit 1 µl Restriktionsenzym und mit dem Enzym entsprechenden Puffer (1x konzentriert) in ein Gesamtvolumen von 20 µl für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei Verdau mit mehr als einem Enzym wurden die

Reaktionspuffer und Enzymmengen entsprechend der Herstellerangaben (Thermo Scientific) angepasst. PCRs wurden direkt mit Restriktionsenzym und Restriktionspuffer versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.6. Dephosphorylierung von DNA

Um eine DNA-Fragmente effizienter zusammenfügen zu können, wurden die 5'-Enden der DNA mit FastAP™ (ThermoFischer) dephosphoryliert. Dafür wurden die DNA für 10 Minuten mit 1 µl der FastAP™ bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.7. Ligation

Um mehrere DNA-Fragmente, wie zum Beispiel linearisierten Vektor und Transgen, zu verbinden, wurden diese mit unten stehendem Protokoll mittels der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) zusammengefügt.

7 µl Transgen
1 µl linearisierter Vektor
1 µl 10x T4-Ligase-Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase

Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 17 °C und wurde danach bei 65 °C für 5 Minuten abgestoppt. Zur Kontrolle wurde stets eine Wasserprobe mitgeführt, bei der anstelle von Transgen 7 µl Wasser eingesetzt wurden.

3.2.1.8. Vermessung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und DNA wurde mit dem Synergy HT (BioTek) photometrisch gemessen. Da DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm hat, wurde stets das Verhältnis von 260/280 nm bestimmt. Wenn eine Verunreinigung mit RNA vorliegt, liegt der Wert bei circa 2,0. Liegt eine Proteinkontamination vor, so liegt das Verhältnis unter 1,8.

3.2.1.9. Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, DNA nach Hitzeschock aufnehmen zu können. Dafür nutzt man einen Gradienten aus

Kalzium- und Natriumchlorid, der die Biomembran für die Aufnahme vorbereitet. Zur Herstellung impfte man mit 20 µg/ml Tetrazyklin versetztes *Lysogeny Broth* (LB)-Medium mit den Bakterien an und ließ sie über Nacht bei 37 °C wachsen. Anschließend erhöhte man das Volumen des Wachstumsmediums um das 500-fache und ließ die Bakterien bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubieren (OD600 bei 0,4 – 0,6). Nachdem die Zellen 20 Minuten auf Eis geruht haben, zentrifugierte man sie bei 4.000 rpm für 15 Minuten ab und wusch die Bakterien in eiskaltem TBS (Tab. 10). Nach erneutem Abzentrifugieren für 10 Minuten bei 4.000 rpm wurden die *Escherichia coli* in Kalziumchloridlösung (Tab. 10) für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Auf ein erneutes Abzentrifugieren bei 4.000 rpm für 10 Minuten folgte die Resuspendierung der Bakterien in Kalziumchloridlösung. Nach einer erneuten einstündigen Inkubationszeit wurde 86 % Glycerol (Tab. 10) zu den Bakterien gegeben, diese aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.10. Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Um DNA in größeren Maßstäben zu erhalten, wurde diese in aufnahmefähige *Escherichia coli XLI blue* Zellen transformiert. Dafür wurden 3 µl DNA zu den Bakterien pipettiert und nach 20 min auf Eis für 45 Sekunden bei 42 °C transformiert. Nach 3 Minuten auf Eis wurden die Zellen in 300 µl LB-Medium (Tab. 10) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und wuchsen danach entweder auf LB-Platten (Tab. 10) oder in entsprechenden Mengen LB-Medium über Nacht bei 37 °C. In allen Fällen wurde der geeignete Selektionsmarker entsprechend des verwendeten Plasmids hinzugegeben (Tab. 6). Ampicillin wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml und Kanamycin in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

3.2.1.11. Aufreinigung von Plasmiden

Um größere Mengen DNA zu erhalten, wurden chemisch kompetente Zellen (s. 2.2.1.9 und 2.2.1.10) transformiert und entweder in 3 ml (Minipräparation) oder 100 ml (Midipräparation) LB-Medium angeimpft. Nachdem die Bakterien über Nacht bei 37 °C wuchsen, wurden sie mittels dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) für Minipräparationen oder dem PureYield Plasmid Midiprep System (Promega) für Midipräparationen aufgeschlossen und die DNA aufgereinigt.

3.2.1.12. Minipräparation

Für die Minipräparation wurden die Zellen zunächst bei 8000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert, bevor sie in 250 µl Resuspendierungspuffer (versetzt mit RNase) aufgenommen werden. Die Lyse erfolgte daraufhin mit 250 µl Lysispuffer, woraufhin mit 350 µl Neutralisationslösung die Fällung des SDS erfolgte. Um dieses abzutrennen, wurde das Lysat für 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand danach auf eine DNA-bindende Säule gegeben. Die DNA-Bindung erfolgte dann für 1 Minute bei 13.000 rpm. Restliche Überstände wurde zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die Säule für 1 Minute bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die DNA wurde daraufhin mit 50 µl Wasser eluiert und vermessen (s. 2.2.1.8.).

3.2.1.13. Midipräparation

Für die Midipräparationen wurden die Bakterien bei 4000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach Dekantation wurden die Bakterien in 5 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und daraufhin mit 3 ml Lysispuffer aufgeschlossen. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde das SDS mit 5 ml Neutralisationspuffer gefällt und bei 15.000 rpm für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand wurde über eine *Clearing* Säule auf die DNA-Binding Säule geben und mittels Vakuum durchgezogen. Nachdem Endotoxine mit 5 ml Endotoxin Removal Buffer entfernt wurden, wurde mit 20 ml Waschlösung die DNA-Säule gewaschen. Eluiert wurde die DNA mit 500 µl Wasser und die DNA daraufhin vermessen (s. 2.2.1.8.).

3.2.1.14. Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mit dem Service der Firma GATC gemäß deren Angaben vorgenommen. Dafür wurden 5 µl von 80 – 100 ng/µl DNA eingesetzt. Diese wurden mit 5 µl Primern (5 µM) (Tab. 13) vermischt und zur Sequenzierung nach Konstanz verschickt.

Tabelle 13: Auflistung aller verwendeten Sequenzierprimer. Alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung gezeigt.

Name	Sequenz	Länge (bp)
pFrog_hin	gagaaccactgcttactggc	21
pFrog_rück	gagactccattcgggtgtca	21
KCNQ1_3	cagatcctgaggatgctacac	21
KCNQ1_sid	catcgggccaccattaaggt	20

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm DNASTAR Lasergene 8 (Madison, USA).

3.2.1.15. RNA-Isolierung

Um RNA aus Zellen zu isolieren, wurde das NucleoSpin RNA Plus Kit (Machery-Nagel) verwendet. Dafür wurden die entsprechenden Zellen mit 350 µl Lysispuffer versetzt und auf die *Clearing* Säule gegeben. Nach der Zentrifugation für 30 Sekunden bei 11.000 rpm wurde der Durchfluss mit 100 µl *Binding Solution* versetzt und auf die RNA-bindende Säule gegeben. Diese wurde für 15 Sekunden bei 11.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde daraufhin mit 200 µl Waschpuffer 1 gewaschen und wieder bei 11.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule daraufhin erst mit 600 µl und dann mit 300 µl Waschpuffer 2 gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte beim ersten Waschen für 15 Sekunden bei 11.000 rpm und beim zweiten Waschen für 2 Minuten bei 11.000 rpm, um die Säule vollständig zu trocknen. Die RNA wurde dann mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und vermessen (s. 2.2.1.8.).

3.2.1.16. Umschreiben von cDNA in mRNA

Um elektrophysiologische Ströme in *Xenopus laevis* Oozyten zu messen, müssen zunächst die DNA-Plasmide in mRNA umgeschrieben werden. Da der pFrog3-Vektor einen T7-Promoter enthält (Abb. 10), wurde dafür das T7 mRNA messenger Kit von Ambion (LifeTechnologies) genutzt. Nach Linearisierung von 9 µg des Plasmids mit HpaI (s. 2.2.1.5.) wurde der Vektor mittels dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt. Dabei wurde als Wasser stets DEPC-Wasser verwendet, um RNase effektiv abtöten zu können. Zur Aufreinigung wurde der Reaktionsansatz mit 300 µl *Binding Solution* und 150 µl Isopropanol gut vermischt. Dieses wurde dann auf eine DNA-bindende Säule gegeben und alles für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann zuerst mit 500 µl und dann mit 200 µl Waschpuffer versetzt und jeweils bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die DNA wurde dann in 50 µl DEPC-Wasser eluiert. Der Reaktionsansatz zum Umschreiben der DNA erfolgte gemäß Hersteller mit dem mMESSAGING mMACHINE® T7 Transcription Kit (Life Technologies). Dabei war mit 5 µl NTP/CAP, 3 µl linearisierter DNA, 1 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl Enzym-Mix der Ansatz stets gleich. Das Umschreiben erfolgte für mindestens 3 Stunden bei 37 °C. Die

Lithiumchloridfällung erfolgte stets über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, wofür der Reaktionsansatz mit $15\text{ }\mu\text{l}$ DEPC-Wasser und $12,5\text{ }\mu\text{l}$ Lithiumchlorid versetzt wurde. Am nächsten Tag wurde die RNA dann für 20 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und einmal mit $250\text{ }\mu\text{l}$ Ethanol gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren für 10 Minuten bei 13.000 rpm wurde die RNA in $12\text{ }\mu\text{l}$ DEPC-Wasser gelöst. Die Qualität der RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.1.3.) überprüft. Geeignete RNA wurde vermessen (s. 2.2.1.8.) und auf eine Konzentration von $0,2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.1.17. Umschreiben von mRNA in cDNA

cDNA wurde aus mRNA mittels des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) synthetisiert. Dafür wurde mRNA aus Zellen isoliert (s. 2.2.1.15.) und $500 - 2000\text{ ng}$ pro cDNA-Synthese eingesetzt. Diese wurde auf $11\text{ }\mu\text{l}$ Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt. Dazu gab man $1\text{ }\mu\text{l}$ *Random Hex* Primer und inkubierte der Ansatz für 5 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Daraufhin wurden jeweils $4\text{ }\mu\text{l}$ Reaktionspuffer, $2\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM NTPs, $1\text{ }\mu\text{l}$ *Riboblock* und $1\text{ }\mu\text{l}$ *Reverse Transkriptase* pro Probe hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde dann für 5 Minuten bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 Stunde bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ und danach für 5 Minuten bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Daraufhin wurde die cDNA entweder direkt für die qRT-PCR (s. 2.2.1.18.) eingesetzt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.1.18. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Um die Menge an mRNA von bestimmten Genen in der gesamten Menge an RNA aus Zellen zu bestimmen, wurde die Methode der qRT-PCR genutzt. Dafür wurde zuerst mRNA aus den Zellen isoliert (s. 2.2.1.15.) und dann in cDNA umgeschrieben (s. 2.2.1.17.) Für die PCR wurde das System der Firma Roche mit der TaqManProbe Library verwendet, welche UPL-Sonden enthält, die an frisch synthetisierte PCR-Produkte binden, um diese mit Fluoreszenz zu markieren. Über den Anstieg des Fluoreszenzsignals kann dann auf die relative Menge an mRNA eines Genes rückgeschlossen werden. Alle verwendeten Primer und UPL-Sonden pro Gen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Liste der verwendeten Primer und jeweiligen Sonden für die qRT-PCR. Alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung aufgeschrieben.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	UPL-Sonde
<i>BAK</i>	gttcctgattcagccaaatgc	aggataggggggtgccta	16
<i>BAX</i>	accttgactgattagtccttct	gggtcatcaatgaactgagc	1
<i>BCL-2</i>	gcacctgcacacctggat	aggccaaactgagcaga	75
<i>β-TUBULIN</i>	ccccttcaagttctagtcatgc	gcattgccaatctggacac	58

Pro Probe wurde die cDNA 1:10 mit Probe Master Mix (Roche) verdünnt und 5 µl eingesetzt. Primer wurden in einer Konzentration von 1,2 µM eingesetzt und die UPL-Sonden wurden 1:50 verdünnt. Insgesamt wurde pro Ansatz 10 µl Gesamtvolumen auf einer 384-well-Platte genutzt. Zur Bestimmung der Primer-Effizienz wurde stets eine Verdünnungsreihe mitgeführt. Die PCR erfolgte am Lightcycler 480 II (Roche) mit dem in Tabelle 15 aufgeführten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 15: PCR-Protokoll zur Durchführung der qRT-PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
Denaturierung	95	600
Denaturierung	95	15
<i>Annealing</i> /Elongation	60	60
Kühlung	10	∞

Die Analyse erfolgte mittels der Effizienz-korrigierten komparativen Quantifizierungsmethode (Stahlberg et al., 2003).

3.2.2. Zellbiologische und biochemische Methoden

3.2.2.1. Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C in einem HERACELL 150i Inkubator (Thermo Fischer) kultiviert. Hek 293 T-, Hek 293 Flp in-, HeLa- und Cos7-Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) (Biochrome), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (von hier an volles Medium), gehalten. SW707 wurden in RPMI-1640 mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zur Haltung von HL-1-Zellen (Claycomb et al., 1998) wurden die Schalen zuerst mit 5 µg/ml Fibronectin in 0,02 % Gelatine/H₂O für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur beschichtet. Als Medium der HL-1-Zellen diente Claycomp Medium versetzt mit 10 % FBS (bestimmte Chargen der Firma SigmaAldrich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,1 mM Norepinephrin und 2 mM L-Glutamat genutzt.

3.2.2.2. Passagieren von Zelllinien

Zum Passagieren von Säugetierzellen wurden diese zunächst mit sterilem PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA (SigmaAldrich) bis zur Ablösung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von vollständigem Medium (s. 2.2.2.1.) abgestoppt.

3.2.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zum Einfrieren von Säugetierzellen wurden diese zunächst durch Trypsin/EDTA (s. 2.2.2.2.) abgelöst und anschließend in vollständigem Medium aufgenommen. Nachdem die Zellen bei 600 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert wurden, wurden diese in 1 ml des entsprechenden Mediums, versetzt mit 20 % DMSO, aufgenommen und zuerst kurzfristig bei – 80 °C eingefroren. Eine langfristige Lagerung fand in flüssigem Stickstoff statt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zunächst vorsichtig im 37 °C warmen Wasserbad angetaut und in 1 ml vollständigem Medium aufgenommen. Nachdem die Zellen für 5 Minuten bei 600 rpm abzentrifugiert wurden, nahm man sie im entsprechenden vollständigen Medium zur Kultivierung auf. Gegebenenfalls wurden die Kultivierungsschalen vorher beschichtet (s. 2.2.2.1.).

3.2.2.4. Transfektion von Zellen

Um DNA-Plasmide in Säugetierzellen zu integrieren, wird die DNA mittels lipophilen Substanzen in eine Mizelle eingeschlossen, welche dann in der Lage ist, sich mit der Biomembran der Zelle zu verbinden und so das Plasmid in das Zellinnere abzugeben. Dafür wurde in dieser Arbeit ausschließlich Polyethylenimine MW 40,000 (PEI) (Polysciences) (Boussif et al., 1995; Vancha et al., 2004) genutzt. Die gewünschte Menge DNA wurde in Medium gelöst und pro µg DNA wurden 2,5 µl PEI dazugegeben. Nach 20 minütiger Inkubationszeit wurde das Gemisch vorsichtig zu den Zellen gegeben. Die Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte wie unter 2.2.2.1. beschrieben.

3.2.2.5. Herstellung von stabilen Zelllinien

Um eine durchgängige und gleichmäßige Expression von Proteinen in Säugetierzellen zu gewährleisten, wurden die Zellen wie unter 2.2.2.4. beschrieben transfiziert. Ein geringer

Anteil des transfizierten Plasmids ist in der Lage, sich in das Genom der Wirtszelle einzulagern und kann somit ständig an Tochterzellen weitergegeben werden. Die Selektion dieser Zellen erfolgt mittels Antibiotika, in dieser Arbeit ausschließlich mit G418 (100 µg/ml) (Invivogen) oder Hygromycin B (200 µg/ml) (Invivogen) (Tab. 6). 24 Stunden nach der Transfektion (s. 2.2.2.4.) wurde das Antibiotikum hinzugegeben. Die Expression wurde nach vollständiger Selektion mittels Western Blot und Immunfluoreszenz überprüft (s. 2.2.2.12 und 2.2.2.14).

3.2.2.6. Behandlung von Zellen

Chromanol 293 B inhibiert den durch Kv7.1-bedingen Kanalstrom (Bachmann et al., 2001; Sun et al., 2001). Um Zellen mit Chromanol 293 B zu behandeln, wurde dieses in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 100 µM für 2 Stunden in das Medium der Zellen gegeben. Staurosporin (Hirobe, 1994; Maeno et al., 2000; Nakagawa et al., 2000; Wang et al., 2008) wurde ebenfalls in DMSO gelöst und dann für 1 – 6 Stunden bei einer Konzentration von 1 – 2 µM ins Medium der Zellen pipettiert. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.2.1. beschrieben.

3.2.2.7. Herstellung von Zelllysaten

Um Zellen zu ernten, wurden diese zunächst mit 1x PBS gewaschen und anschließend in 1x PBS/Complete (1 Tablette pro 50 ml) (Roche) geerntet. Nachdem sie bei 5.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurden, lysierte man sie in 1x PBS/Complete, versetzt mit 1 % Triton-X, und vervollständigte den Aufschluss mittels Ultraschall. Nach einstündiger Inkubationszeit wurden sie bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend die Proteinkonzentration mit PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) ermittelt (s. 2.2.2.8.), mit 5x Lämmli (Tab. 10) eingestellt und bei 55 °C für 30 Minuten erhitzt.

3.2.2.8. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer). Dafür wurden 10 µl einer Standardkurve von 0 – 2 µg Albumin eingesetzt. Die Proben wurden stets 1:10 verdünnt und 10 µl pro Probe eingesetzt, wobei von allen Lysaten und Standardkurven stets eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Zur Ausführung der Reaktion wurden Lösung A und B 1:20 miteinander vermischt und 200 µl pro Probe eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten und wurde am Synergy HT (Biotek) bei 562 nm vermessen. Mittels der Standardkurve konnte auf die Konzentration des Lysates rückgeschlossen werden.

3.2.2.9. Trennung von zytoplasmatischen – und Kernproteinen

Um zytoplasmatische Proteine und Kernproteine voneinander zu trennen, wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und in Puffer A/Complete (1 Tablette auf 50 ml) (Tab. 10) geerntet. Ein Zehntel des Lysates wurde zur Herstellung von Totallysat abgenommen (s. 2.2.2.7.). Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde das Lysat mit 15 µl NP-40 lysiert und 2 Minuten bei 6.800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zytoplasma abgenommen und bei 13.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer A/Complete gewaschen, erneut zentrifugiert und dann für 15 Minuten bei 4 °C in Puffer C/Complete (1 Tablette auf 50 ml) (Tab. 10) geschüttelt. Anschließend wurde das Kernlysat für 5 Minuten bei 13.300 rpm zentrifugiert und von allen Proben mittels PierceTM BCA Protein Assay Kit die Proteinkonzentration bestimmt (s. 2.2.2.8.). Die Proben wurden mit 5x Lämmli eingestellt und 30 Minuten bei 55 °C erhitzt.

3.2.2.10. Ko-Immunopräzipitation

Um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wurden Ko-Immunopräzipitationsstudien durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und anschließend in 1x PBS/Complete geerntet. Nach Zentrifugation bei 5.000 rpm für 5 Minuten wurden die Zellen in EBC-Puffer/Complete (1 Tablette für 50 ml) (Tab. 10) lysiert und der Aufschluss durch Ultraschall komplettiert. Nach einstündiger Inkubationszeit wurden die Zellen bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend mit PierceTM BCA Protein Assay Kit die Proteinkonzentration bestimmt (s. 2.2.2.8.). Ca. 95 % des Lysates wurde für die Immunopräzipitation genutzt, während die restlichen 5 % als Totallysat mit 5x Lämmli eingestellt wurden (s. 2.2.2.7.). Der Immunopräzipitationsanteil inkubierte mit Ziege anti-myc Antikörper (GTX29106, GeneTex) über Nacht bei 4 °C. Dyna- oder Agarosebeads G (Pierce) wurden über Nacht bei 4 °C mit *Sea Block Blocking Buffer* blockiert. Die Präzipitation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Nach dreimaligem Waschen der *Beads* mit

EBC/Complete wurden diese in 40 μ l 1x Lämmli (Tab. 10) aufgenommen und zusammen mit dem Totallysat bei 70 °C für 15 Minuten erhitzt.

3.2.2.11. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die vertikale SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) genutzt. Dafür wurde ein SDS-Polyacrylamidgel, wie in Tabelle 16 aufgezeigt, gegossen.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgelpuffers ist in Tabelle 10 aufgeführt.

	Trenngel	Sammelgel (4,5 %)
Trenngelpuffer	2,6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,35 ml
30 % Polyacrylamid	3,3 ml (10 %)	1,75 ml
	4,2 ml (12,5 %)	
Destilliertes Wasser	4,0 ml (10 %)	3,45 ml
	3,1 ml (12,5 %)	
10 % APS	60 μ l	60 μ l
Temed	30 μ l	30 μ l

Nach Beladen der Gele mit den unter 2.2.2.7. – 2.2.2.10. hergestellten Lysaten erfolgte die Elektrophorese in Elektrophoresepuffer (Tab. 10) bei 100 V bis das Sammelgel durchlaufen war und anschließend bei 120 V bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.2.12. Western Blot und Immunodetektion

Um Proteine immunodetektieren zu können, wurde ein Western Blot gemäß dem *Semi-Dry*-Prinzip durchgeführt. Dafür wurden SDS-Polyacrylamidgele (s. 2.2.2.11.) auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) gelegt und von beiden Seiten mit je zwei in Tank-Blotpuffer (Tab. 10) getränkte *Whatmanpaper* umrandet. Anschließend wurde eine Stromstärke von 60 mA pro Blot für 2 Stunden angelegt. Die Membran wurde dann in 2 %iger Milch in TBS-T (Tab. 10) blockiert und über Nacht bei 4 °C mit primärem Antikörper, gelöst in 2 %iger Milch/TBS-T, inkubiert. Alle Primärantikörper und ihre verwendeten Konzentrationen können in Tabelle 17 nachgelesen werden.

Tabelle 17: Verwendete Primärantikörper im Western Blot.

Antikörper	erkennt	Konzentration	Herkunftsorganismus	Hersteller (Klon)
α -3F10-Peroxidase	Ha-Tag	1 : 1000	Ratte	Roche
α -9B11	myc-Tag	1 : 1000	Maus	Cell Signaling (9B11)
α -BAK	BAK	1 : 1000	Kaninchen	Cell Signaling (D4E4)
α -BAX	BAX	1 : 1000	Kaninchen	Cell Signaling (2772S)
α -BCL-2	BCL-2	1 : 1000	Kaninchen	Cell Signaling (50E3)
α -Calmodulin	Calmodulin	1 : 1000	Kaninchen	Abcam (ab45689)
α -Caspase-3	Caspase-3	1 : 1000	Kaninchen	Cell Signaling (8G10)
α -eGFP	eGFP	1 : 1000	Kaninchen	Cell Signaling (D5.1)
α -Sp-1	Sp-1	1 : 1000	Kaninchen	Merck Millipore (ABE135)
α - β -Aktin	β -Aktin	1 : 1000	Kaninchen	Sigma Aldrich (A2066)
α - β -Tubulin	β -Tubulin	1 : 1000	Maus	Abcam (ab7751)

Anschließend wurden die Primärantikörper mit Peroxidase gekoppeltem Antikörper (Sekundärantikörper) beladen. Dafür wurde die Membran dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1x TBS-T gewaschen und anschließend in Sekundärantikörper (gelöst in 2 %iger Milch/TBS-T) inkubiert. Alle Konzentrationen und verwendeten Sekundärantikörper können in Tabelle 18 nachgelesen werden.

Tabelle 18: Alle verwendeten Sekundärantikörper für den Western Blot. Alle Antikörper sind Peroxidase (POD)-gekoppelt und richten sich gegen das IgG des jeweiligen Organismus.

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Esel- α -Kaninchen	1 : 13.000	Dianova
Schaf- α -Maus	1 : 13.000	Dianova
Schaf- α -Ratte	1 : 13.000	Dianova

Die Detektion mittels Chemilumineszenz erfolgte am Image Quant LAS 400 (GE Healthcare). Dafür wurde die Membran mindestens 30 Minuten 1x TBS-T gewaschen und mit TMA-6 (Baden BioTek) benetzt. Dafür wurden 1 ml Detektionslösung A mit 50 μ l Detektionslösung B, 50 μ l Lumigen TMA-6 A, 50 μ l Lumigen TMA-6 B und 4,7 μ l H₂O₂ vermischt. Diese Mischung enthält Luminol, welches durch die Peroxidase oxidiert wird und dabei eine Chemilumineszenz freisetzt. Diese kann gemessen werden und damit die Proteine auf der Membran nachgewiesen und auch auf deren Menge rückgeschlossen werden. Zur weiteren Datenanalyse wurden Photoshop CS4 (Adobe) und ImageJ genutzt.

3.2.2.13. Strippen von Blotmembranen

Um eine Blot mit einem weiteren Primärantikörper beladen zu können, müssen die vorher aufgebrauchten Primärantikörper entfernt werden, was mittels Strippen geschieht. Dafür wird die Membran mit Stripping Puffer (Tab. 10) für 1 Stunde bei 80 °C erhitzt. Daraufhin folgt ein intensives Waschen mit 1x TBS-T, bis die Membran vollständig von β -

Mercaptoethanol befreit war. Daraufhin wird die Membran, wie unter 2.2.2.12. beschrieben, blockiert und wieder mit Primär- und Sekundärantikörper beladen.

3.2.2.14. Immunfluoreszenzfärbung den Zellen

Zur Färbung von Proteinen in Zellen werden diese auf Deckgläsern ausgesäht, zum geeigneten Zeitpunkt einmal in 1x PBS gewaschen und anschließend in 4 %igem Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert. Zur Permeabilisierung wurde für 5 Minuten 0,02 % Saponin/ PBS und für 10 Minuten 0,02 % Saponin/ 0,2 % Glycin/PBS genutzt. Anschließend folgte ein Blockierungsschritt in 10 % FBS/ 0,02 % Saponin/PBS für 30 Minuten. Die Inkubation mit Primärantikörper (Tab. 19) erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur, gelöst in 10 % FBS/ 0,02 % Saponin/PBS.

Tabelle 19: Alle verwendeten Primärantikörper in der Immunfluoreszenz.

Antikörper	erkennt	Konzentration	Hersteller
3F10	Ha-Tag	1 : 500	Roche
9B11	myc-Tag	1 : 500	Cell Signaling

Nach viermaligem Waschen in 0,02 % Saponin/PBS erfolgte die Färbung des Primärantikörpers mit Fluoreszenz-gekoppeltem Antikörper (Tab. 20) für 1 Stunde bei Raumtemperatur, gelöst in 10 % FBS/ 0,02 & Saponin/PBS.

Tabelle 20: Übersicht aller verwendeten Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz. Die jeweiligen Fluorophore sind im Namen angegeben und der Sekundärantikörper erkennt das jeweilige IgG des Organismus.

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Esel- α -Maus-488	1 : 500	Invitrogen
Esel- α -Maus-594	1 : 500	Invitrogen
Esel- α -Ratte-488	1 : 500	Invitrogen
Esel- α -Ratte-594	1 : 500	Invitrogen

Nach viermaligem Waschen in 0,02 % Saponin/PBS folgten zwei weitere Waschschrte in Wasser, bevor die Deckgläser in Mowiol/Dapco/Dapi (Tab. 10) eingebettet wurden. Zur Visualisierung wurde das FV1000 konfokale Lasermikroskop von Olympus verwendet. Zur weiteren Verarbeitung wurde FV10-ASW 3.1 Viewer (Olympus) und Photoshop CS4 (Adobe) genutzt.

3.2.2.15. Immunofluoreszenzfärbung von apoptotischen Zellen

Um apoptotische Zellen zu detektieren, wurde Annexin-V genutzt. Dieses ist in der Lage, an Phosphatidylserin zu binden, welches unter apoptotischen Bedingungen an die äußere Zellmembran geflippt wird und somit ohne Permeabilisierung mittels Annexin-V gefärbt werden kann (Burlacu, 2003; Galluzzi et al., 2012; Grutter, 2000; Vucic et al., 2011). Hek 293 T- und HeLa-Zellen wurden zunächst wie oben beschrieben ausgesät. Zum geeigneten Zeitpunkt erfolgte anschließend die Stimulation mit 2 μ M Staurosporin für 6 Stunden, um Apoptose auszulösen. Die Zellen wurden 1x mit PBS und dann mit 1x Annexin-Puffer (Biolegend) gewaschen. Die Färbung erfolgte mittels Annexin-V-FITC (Biolegend) für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal mit Annexin-Puffer gewaschen und mit 0,5 % Paraformaldehyd (PFA)/Annexin-Puffer für 20 Minuten unter Ausschluss von Licht fixiert. Die weitere Färbung erfolgte wie oben beschrieben. Die Analyse der Fluoreszenzintensität erfolgte mit ImageJ nach (Burgess et al., 2010; Gavet, Pines, 2010; Potapova et al., 2011).

3.2.2.16. Durchflusszytometrie

Um zu überprüfen, ob ein veränderter Zelltod vorherrschte, wurde auch die Methode der Durchflusszytometrie angewendet. Dafür wurden HeLa- oder SW707-Zellen ausgesät und mit eGFP markierten Proteinen transfiziert (s. 2.2.2.4.). 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Staurosporin stimuliert (s. 2.2.2.6.) und anschließend trypsiniert (s. 2.2.2.2.), wobei jeweils Medium und PBS aufgefangen wurden. Nach 5 - 10 Minuten wurde PBS zu den abgelösten Zellen gegeben und alles wieder aufgefangen. Nachdem die Zellen bei 210 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurden, wurden sie in 1x Annexin-Puffer gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit Annexin-V-APC (Biolegend) gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit 1x Annexin-Puffer wurden die Zellen in 200 μ l 1x Annexin-Puffer mit 7-AAD (Bioscience) als Färbung für tote Zellen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen über ein BD FACSVerse und FlowJo Software analysiert.

3.2.2.17. Färbung von reaktiven Sauerstoffspezies

Um zu überprüfen, ob eine vermehrte Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies vorliegt, wurden die Zellen mit MitoSox (LifeTechnologies) gemäß den Herstellerangaben gefärbt. Dafür wurde 5 μ M MitoSox ins Medium der Zellen gegeben und für 10 Minuten

bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert. Anschließend wurde wie oben beschrieben mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden einmal abzentrifugiert und dann in FACS-Buffer (Tab. 10) aufgenommen und unmittelbar mit dem BD FACSVerser analysiert.

3.2.3. Elektrophysiologie

3.2.3.1. Mikroinjektion von *Xenopus laevis* Oozyten

Xenopus laevis Oozyten wurden bei Ecocyte bestellt. Zur Mikroinjektion wurde eine geeignete Glaskapillare gezogen und pro Oozyte 10 ng RNA injiziert. Bei Mischungen mehrerer Konstrukte wurde auch maximal 10 ng injiziert und gegebenenfalls mit DEPC-Wasser das Volumen aufgefüllt. Die injizierten Oozyten wurden bei 17 °C in ND-96 (Tab. 10), versetzt mit 50 µg/ml G418, gelagert.

3.2.3.2. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Zur Messung der Ströme wurden der *Xenopus laevis* Oozyten drei Tage nach Injektion analysiert. Die Spannungsklemme erfolgte mit Turbo TEC-05X Amplifier (npi electronics) und wurde gemäß Abbildung 11A aufgebaut. Zur Referenz für Spannungs- und Stromstärkeelektrode wurde eine 3 M KCl-Lösung benutzt, welche über Agarbrücken (1 M KCl in 1 % Agarose) mit dem ND-96-Bad der Oozyte verbunden war. Als Qualitätsmerkmal der Glaspipetten wurde darauf geachtet, dass diese während der gesamten Messung einen Widerstand zwischen 0,5 und 2 MΩ hatten. Mit der Spannungselektrode wurde das Ruhepotential auf – 80 mV gehalten und während der aktiven Klemme in 20 mV Schritten für 2,5 Sekunden die Spannung zwischen – 80 und 40 mV verändert (Abb. 11B). Als Abschluss wurde ein *Tail-Current* bei – 30 mV für 250 Millisekunden gemessen. Die gemessenen Ströme wurden mit pClamp8 (Axon Instruments) aufgenommen.

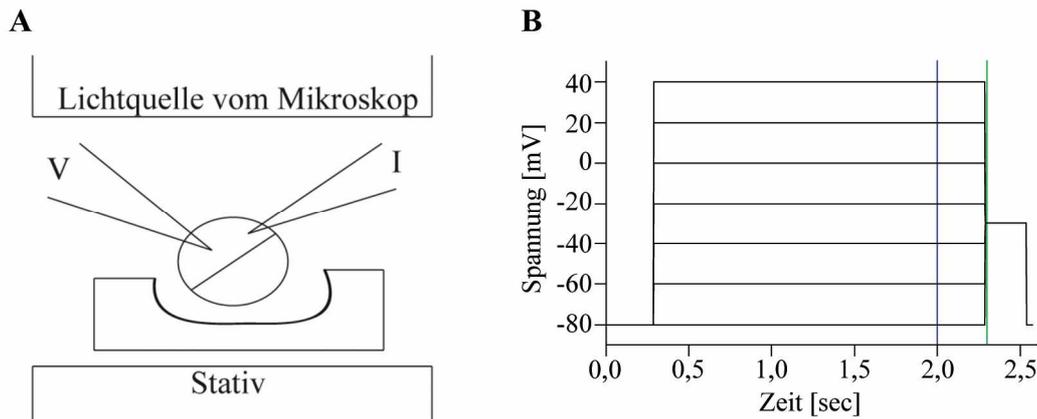


Abbildung 11: Aufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsquelle. (A) Aufbau der Spannungsquelle. Die *Xenopus laevis* Oozyten wurden stetig in ND-96 gehalten und die Messung erfolgte bei Raumtemperatur. (B) Clamp-Protokoll der Spannungsquelle. Die blaue Linie steht bei 2,0 Sekunden und zeigt den Punkt zur Analyse der *Steady-State-Currents*. Die grüne Linie zeigt bei 2,3 Sekunden den Punkt zur Analyse der *Tail-Currents*.

3.2.3.3. Datenanalyse der Spannungsquelle

Die Daten der Spannungsquelle wurden mit OriginPro 8.1 analysiert. *Steady-State*-Analysen geben an, wie viel Ionen zum ausgewählten Zeitpunkt über den Kanal strömen, womit sich der gesamte Ionenfluss verschiedener Kanäle vergleichen lässt. Dafür normalisiert man Ströme bei 2,0 Sekunden bei 40 mV auf den Referenzstrom (zum Beispiel Wildtyp (WT) Kv7.1). Die *Tail-Current*-Analyse zeigt die Funktionalität der vermessenen Kanäle an. Da im *Clamp*-Protokoll (Abb. 12B) von zum Beispiel 40 mV auf -30 mV gewechselt wird, muss der Kanal sich inaktivieren. Gleichzeitig werden aber auch Ströme gemessen, bei dem man von -80 mV auf -30 mV springt. Somit aktiviert der Kanal in dieser Phase. In der gesamten Analyse kann man dann bei 2,3 Sekunden die verschiedenen Aktivierungs- und Inaktivierungsphasen der Kanäle messen und somit auf die Funktionalität des Kanals rückgeschlossen werden. Um dies durchzuführen wurden die Ströme zunächst auf den Mittelwert der Ströme bei 40 mV bei 2,3 Sekunden normalisiert. Für diese wurde dann die Stromstärke gegen die Spannung geplotet, welcher dann mit der Boltzmann-Funktion gefittet wurde. Diese Boltzmann-Funktion lautet
$$I = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{-\frac{V - V_{0.5}}{k}}} + A_2,$$
 wobei I für den *Peakcurrent*, A_1 für die maximale *Peakconductance*, A_2 für die minimale *Peakconductance*, $V_{0.5}$ für die halbmaximale Aktivität und k für den *Slopefaktor* stehen. Die halbmaximale Aktivität repräsentiert dann die Spannung, zu der 50 % des Kanals geöffnet sind.

4. ERGEBNISSE

4.1. Kv7.1 wird durch verschiedene Caspasen zum CTF2 prozessiert

In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit wurde festgestellt, dass Kv7.1 zu zwei C-terminalen Fragmenten, welche CTF1 und CTF2 genannt wurden, prozessiert wird (Doktorarbeit von C. Raab) (Abb. 12).

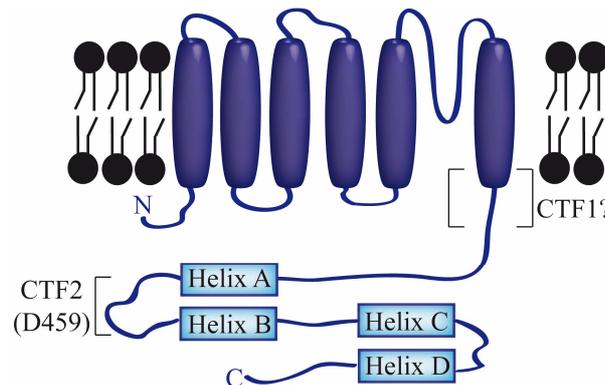


Abbildung 12: Topologie des Kv7.1.

Das CTF1-Fragment von Kv7.1 kann bei ungefähr 40 kDa im Western Blot detektiert werden (Abb. 13). Für das CTF2-Fragment wurde ein Aspartat an Position 459 in Kv7.1 für die Fragmentierung zum CTF2 verantwortlich gemacht (Doktorarbeit C. Raab). Ob wirklich nur das D59 in Kv7.1 für den Schnitt zum CTF2 wichtig ist, wurde in dieser Arbeit noch einmal überprüft (Abb. 13).

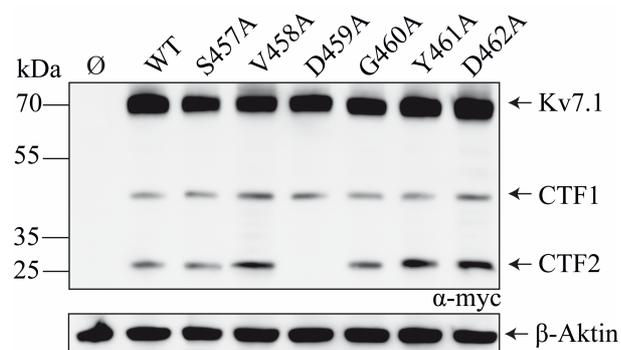


Abbildung 13: Kv7.1 wird an D459 zum CTF2 prozessiert. HeLa-Zellen wurden transient mit Wildtyp (WT) Kv7.1-myc (WT), Kv7.1-S457A-myc (S457A), Kv7.1-V458A-myc (V458A), Kv7.1-D459A-myc (D459A), Kv7.1-G460A-myc (G460A), Kv7.1-Y461A-myc (Y461A) und Kv7.1-D462A-myc (D462A) transfiziert und mittels Western Blot untersucht. Untransfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2.

Der Western Blot zeigte das typische Bandenmuster von Wildtyp (WT) Kv7.1 mit einer Bande bei 70 kDa, die dem unprozessierten Kv7.1 entspricht. Weiterhin wurde das CTF1-Fragment bei 40 kDa und das CTF2-Fragment bei 25 kDa detektiert. Nur wenn das Aspartat an Position 459 zu einem Alanin verändert wurde (Kv7.1-D459A), kam es zu einem Verlust der Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2.

Weiterhin wurde in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass Caspasen für die Fragmentierung von Kv7.1 zum CTF2 verantwortlich sind (Doktorarbeit von C. Raab). Es wurde aber nicht geklärt, welche Caspase den Kv7.1 zum CTF2 prozessiert. Caspasen können in Entzündungs-, Effektor- und Initiatorcaspasen unterteilt werden, wobei Caspase-1 eine Entzündungscaspase, Caspase-2, -3 und -7 Effektorcaspasen und Caspase-8 eine Initiatorcaspase darstellt (Tab. 3). Um zu untersuchen, welche Caspase den Kv7.1 prozessieren kann, wurden in Kv7.1 stabil transfizierte Hek 293 T-Zellen Caspase-1, -2, -3, -7 und -8 transfiziert (Abb. 14).

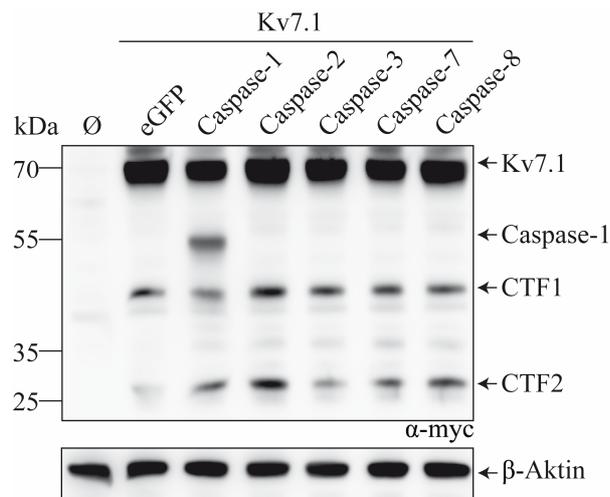


Abbildung 14: Verschiedene Caspasen können Kv7.1 zum CTF2 prozessieren. Hek 293 T-Zellen, die Kv7.1-myc stabil exprimieren, wurden zusätzlich mit Caspase-1, -2, -3, -7 und -8 transfiziert und im Western Blot untersucht. Untransfizierte und mit eGFP transfizierte und stabil exprimierenden Kv7.1-myc Hek 293 T-Zellen dienten als Kontrolle. Eine repräsentative Abbildung von vier verschiedenen unabhängigen Experimenten ist gezeigt. eGFP: *enhanced green fluorescent protein*. CTF1: C-terminales Fragment 1. CTF2: C-terminales Fragment 2.

Im Western Blot war für Kv7.1 das typische Bandenmuster zu erkennen, bei dem eine Bande bei 70 kDa (*full-length* Kv7.1), 40 kDa (CTF1) und 25 kDa (CTF2) detektiert werden konnte. Bei Überexpression von Kv7.1 zusammen mit allen untersuchten Caspasen konnte im Vergleich zur Ko-Expression von Kv7.1 mit eGFP ein Anstieg der CTF2-Bande detektiert werden. Demnach scheinen verschiedene Caspasen in der Lage zu sein, den Kv7.1 zum CTF2 zu prozessieren.

Da der Kv7.1 zum CTF2 am Aspartat 459 von Caspasen gespalten wird (Abb. 13, 14), kann die Proteolyse immer dann eine Bedeutung einnehmen, wenn Caspasen aktiv sind (Abb. 15).

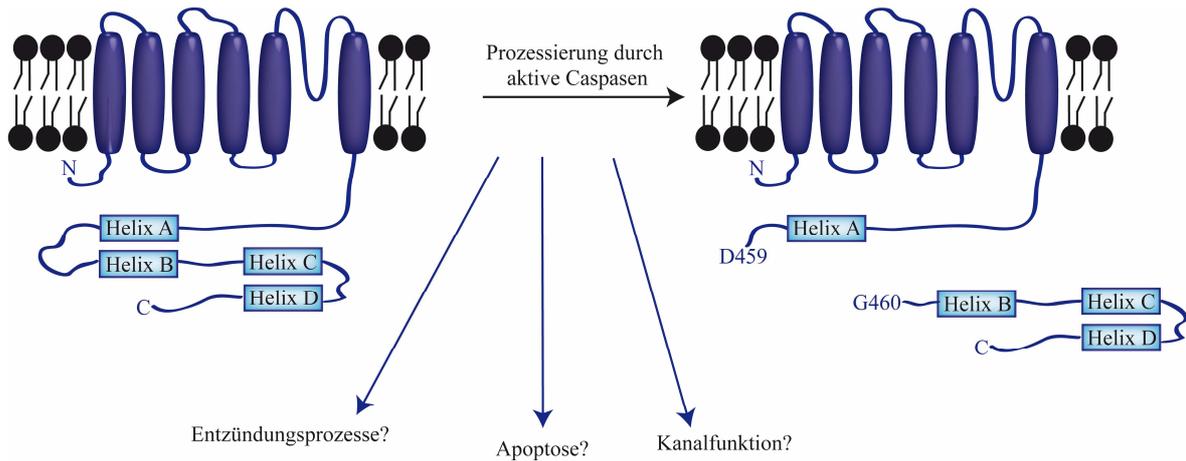


Abbildung 15: Übersicht zu potentiellen Funktionen der Proteolyse des Kv7.1.

Aktive Caspasen sind zum Beispiel bei Entzündungsprozessen, sowie während der Apoptose zu finden (Gill et al., 2002; Grutter, 2000; Liang et al., 2001; Merkle et al., 2007; Moorjani et al., 2006; Nicholson, 1999; Shiozaki, Shi, 2004; Thornberry et al., 1992; Yang et al., 2013). Zunächst wurde die Prozessierung des Kv7.1 während Entzündungsprozessen untersucht.

4.2. Eine Rolle der Proteolyse von Kv7.1 in Entzündungsprozessen?

Überexpressionsexperimente zeigten, dass Kv7.1 auch von Caspase-1, der wichtigsten Entzündungscaspase, zum CTF2 proteolytisch gespalten werden kann (Abb. 14). Somit stellte sich die Frage, ob Kv7.1 während Entzündungsprozessen verändert gespalten wird. Da Kv7.1 vor allem im Herzen exprimiert wird (Jentsch, 2000), wurde die Proteolyse von Kv7.1 in Entzündungsprozessen im Herzen untersucht. Um eine Inflammation im Herzen auszulösen, kann man Mäuse mit dem Coxsackie B-Virus (CBV) infizieren (Brunetti, DeSantis, 2008; Goudevenos et al., 1990; Hori et al., 1981; Joy et al., 1990; Karavidas et al., 2011; Spotnitz, Lesch, 2006). Durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Dr. med. Mark Lüdde (Klinik für Innere Medizin III: Kardiologie und Angiologie, UKSH, Kiel)* wurden Lysate von Mauserherzen, die vorher mit CBV infiziert wurden, zur Verfügung gestellt. Diese Lysate wurden hinsichtlich der Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2 untersucht (Abb. 16).

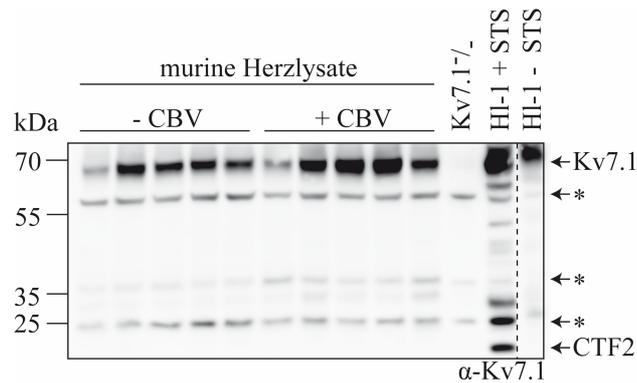


Abbildung 16: Im murinen Herzen kann nach Coxsackie B Virus (CBV)-Injektion keine vermehrte Prozessierung zum CTF2 determiniert werden. Western Blot von Herzlysaten von Mäusen, welche mit Coxsackie B-Virus (CBV) infiziert wurden. Zur Kontrolle wurden Kv7.1-defiziente Herzlysate (Kv7.1^{-/-}) und Lysate von HL-1-Zellen, die entweder mit 4 μ M Staurosporin (HL-1 + STS) oder mit DMSO (HL-1 - STS) behandelt wurden, mitgeführt. Asterisk deutet auf unspezifische Banden des C-terminalen Kv7.1-Antikörpers hin. CTF2: C-Terminales Fragment 2.

Zur Detektion des endogenen Kv7.1 in murinen Herzlysaten im Western Blot wurde ein Antikörper genutzt, der Kv7.1 an den letzten 18 Aminosäuren erkennt. Mit diesem Antikörper wurde die unprozessierte Form des Kv7.1 bei ungefähr 70 kDa erkennbar. Das CTF1-Fragment, was bei circa 40 kDa im Western Blot zu sehen sein sollte, war auf endogener Expressionsebene im murinen Herzen mit diesem Kv7.1-Antikörper nicht detektierbar. Mit Hilfe des Kv7.1-defizienten Herzgewebes konnten drei unspezifische Banden bei ungefähr 55, 35 und 25 kDa, welche mit einem Asterisk gekennzeichnet sind, detektiert werden. Um das CTF2-Fragment sicher im Western Blot erkennbar zu machen, wurden parallel HL-1-Zellen mit dem Apoptose auslösenden Staurosporin (STS) stimuliert (Hirobe, 1994; Maeno et al., 2000; Nakagawa et al., 2000; Wang et al., 2008). Die HL-1-Zelllinie ist eine Kardiomyozytenzelllinie, die Kv7.1 auf endogener Ebene exprimiert. Durch die Stimulation der HL-1-Zellen mit Staurosporin (STS) wird Apoptose ausgelöst, wodurch das CTF2-Fragment des Kv7.1 bei circa 25 kDa im Vergleich zu Kontroll-behandelten HL-1-Zellen im Western Blot sichtbar wird. Betrachtet man die CTF2-Banden des Kv7.1 in den murinen Herzlysaten, so konnte weder mit, noch ohne CBV-Behandlung der Mäuse das CTF2-Fragment von Kv7.1 detektiert werden. Demnach scheint es, dass die Prozessierung des Kv7.1 während Entzündungsprozessen keine Rolle spielt. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen der Einfluss von Kv7.1 auf Apoptose untersucht.

4.3. Eine Rolle von Kv7.1 während der Apoptose

4.3.1. Die Kanalaktivität von Kv7.1 treibt Zellen in die Apoptose

Viele spannungsabhängige Kaliumkanäle sind für die Durchführung der Apoptose von Bedeutung, indem sie die apoptotische Volumenreduktion vermitteln (Maeno et al., 2000; Shimizu et al., 2007). Diese apoptotische Volumenreduktion führt zum Schrumpfen der Zelle während der Apoptose. Dies ist eine Voraussetzung, damit Caspasen überhaupt während des programmierten Zelltodes aktiv werden können (Felipe et al., 2006; Maeno et al., 2000; Shimizu et al., 2007). Somit stellte sich die Frage, ob auch Kv7.1, wie viele andere spannungsabhängige Kaliumkanäle, in der Lage ist, den programmierten Zelltod zu beeinflussen. Der potentielle Einfluss von Kv7.1 auf Apoptose könnte dann entweder über die Kanalaktivität von Kv7.1 und/oder über die Proteolyse vermittelt werden.

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob Kv7.1 den programmierten Zelltod überhaupt verändern kann. Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wurde Kv7.1 in SW707-Zellen transfiziert. SW707-Zellen wurden genutzt, da dies eine kolorektale Krebszelllinie ist, die ein leicht erhöhtes Membranpotential aufweisen (Yang, Brackenbury, 2013). Dieser Anstieg des Membranpotentials kann die Kanalaktivität von Kv7.1 leicht steigern. Würde Kv7.1 einen Einfluss auf Apoptose nehmen, so müsste nach Expression von Kv7.1 sich die Anzahl der apoptotischen Zellen, welche mit Annexin-V gefärbt wurden, verändern (Abb. 17).

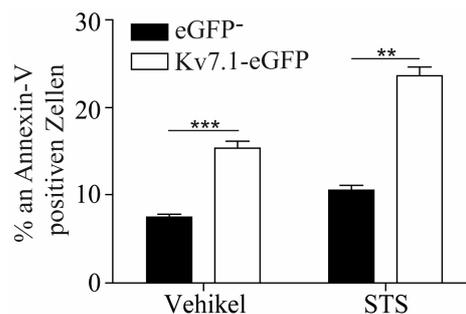


Abbildung 17: Die Expression von Kv7.1 erhöht Apoptose in SW707-Zellen. SW707-Zellen wurden mit Kv7.1-eGFP transfiziert und 48 Stunden später für 6 Stunden mit DMSO oder 2 μ M Staurosporin (STS) behandelt. Die dargestellte Analyse vergleicht die transfizierten Zellen (Kv7.1-eGFP) gegen die untransfizierten Zellen (eGFP-). Die Statistik wurde mittels zweiseitigem unpaarigem *student's t*-Test ermittelt und ab $p < 0,05$ als signifikant angesehen. ** $0,001 \leq p < 0,01$. *** $p > 0,001$. eGFP: *enhanced green fluorescent protein*.

Die Expression von Kv7.1-eGFP erhöhte im Vergleich zu den untransfizierten Zellen die Anzahl der apoptotischen Zellen. Dieser Effekt war unabhängig der Exposition mit dem Apoptose-auslösenden Staurosporin. Somit ist gezeigt worden, dass die Expression von Kv7.1 Apoptose beeinflussen kann. Es sollte weiter untersucht werden, ob die

Kanalaktivität von Kv7.1 eine Rolle während der Apoptose spielt. Um dies festzustellen, wurde eine Kanal-inaktive Mutante von Kv7.1 genutzt. Dieses Kv7.1-Konstrukt enthält eine Mutation am Aspartat 317 in Kv7.1 (Kv7.1-D317A), wobei D317 im Selektivitätsfilter von Kv7.1 liegt (Abb. 2). Durch den Austausch von Aspartat zu Alanin in Kv7.1-D317A ist die gesamte Kanalaktivität von Kv7.1 aufgehoben. Vergleicht man die Anzahl der apoptotischen Zellen bei Expression des inaktiven Kv7.1-D317A mit der Anzahl an apoptotischen Zellen nach eGFP-Expression, so erhält man einen Einblick, wie viele Zellen durch die Expression eines Kv7.1-Konstruktes ohne Kanalfunktion entstehen. Im Gegenzug kann der Vergleich der Apoptoserate zwischen WT Kv7.1 und inaktivem Kv7.1-D317A einen Einblick geben, in wie weit die Kanalfunktion von Kv7.1 einen Einfluss auf Apoptose nimmt. Daher wurden eGFP, WT Kv7.1-eGFP und Kv7.1-D317A-eGFP in SW707-Zellen transfiziert und die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-Färbung untersucht (Abb. 18).

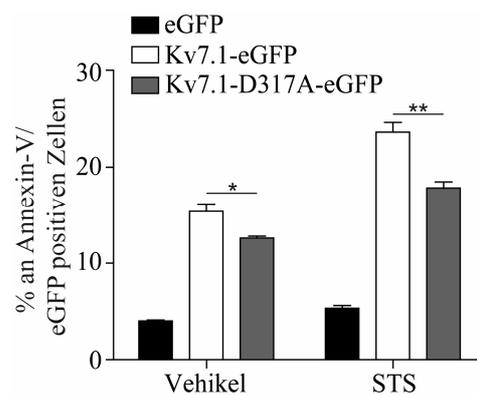


Abbildung 18: Die Kanalaktivität von Kv7.1 fördert Apoptose. SW707-Zellen wurden mit eGFP, Kv7.1-eGFP und Kv7.1-D317A-eGFP transfiziert und 48 Stunden später für 6 Stunden mit DMSO oder 2 μ M Staurosporin (STS) stimuliert. Die Statistik wurde mittels *One-Way-Anova* gefolgt von Bonferroni's multiplen Vergleichstest ermittelt und ab $p < 0,05$ als signifikant angesehen. * $0,01 \leq p < 0,05$. ** $0,001 \leq p < 0,01$. eGFP: *enhanced green fluorescent protein*.

Die Expression der Kanal-inaktiven Mutante Kv7.1-D317A erhöhte im Vergleich zu den eGFP transfizierten Zellen die Anzahl der apoptotischen Zellen. Dennoch zeigte sich bei Expression des Kanal-inaktiven Kv7.1-D317A im Vergleich zu WT Kv7.1 unter allen gemessenen Bedingungen eine leichte, signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen. Demnach kann die Kanalfunktion von Kv7.1 nach Überexpression von Kv7.1 in SW707-Zellen einen geringen Einfluss auf Apoptose nehmen.

Um weiter zu verifizieren, dass der Kv7.1-bedingte Kaliumfluss Auswirkungen auf Apoptose hat, musste der Einfluss der Kanalaktivität von Kv7.1 auf Apoptose unter endogener Expression des Kv7.1 analysiert werden. Dafür wurde die HL-1-Zelllinie genutzt. Diese murine Kardiomyozytenzelllinie zeigt auch unter basalen Bedingungen

einen Kaliumausstrom durch Kv7.1, der mit Chromanol 293B (C293B) inhibiert werden kann (Bachmann et al., 2001; Fujisawa et al., 2000; Sun et al., 2001). Unter Behandlung der Zellen mit Chromanol 293B (Inhibition von Kv7.1 und KCNE1) und Staurosporin kann der Einfluss der endogenen Kanalaktivität von Kv7.1 auf Apoptose bestimmt werden (Abb. 19).

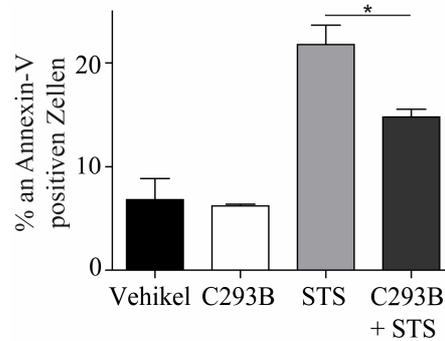


Abbildung 19: Die Hemmung der Kanalaktivität von Kv7.1 führt zu weniger Apoptose. Die HL-1-Zellen wurden zunächst für 2 Stunden mit 10 μ M Chromanol 293B (C293B) inhibiert und darauffolgend für 6 Stunden mit DMSO oder 4 μ M Staurosporin (STS) stimuliert. Die Statistik wurde mittels *One-Way-Anova* gefolgt von Bonferroni's multiplen Vergleichstest ermittelt und ab $p < 0,05$ als signifikant angesehen. * $0,01 \leq p < 0,05$.

Die Behandlung mit Chromanol 293B (C293B) zusammen mit Staurosporin verminderte die Anzahl der apoptotischen Zellen signifikant. Wenn Chromanol 293B ohne Staurosporin genutzt wird, gab es keine Veränderung in der Anzahl der apoptotischen Zellen. Da Chromanol 293B die Kanalfunktion von Kv7.1 inhibiert, ist es möglich, dass die Kanalaktivität von Kv7.1 einen Einfluss auf Apoptose nimmt.

Soweit ist durch Inhibition gezeigt worden, dass Kv7.1 mit seiner Kanalaktivität Apoptose beeinflussen kann. Demnach sollte eine Mutante von Kv7.1, die eine erhöhte Kanalfunktion von Kv7.1 zeigt, mehr Apoptose auslösen. Kv7.1-D459A ist eine Mutante von Kv7.1 (Abb. 14), die bei Ko-Expression mit KCNE1 eine erhöhte Kanalaktivität ausweist (Doktorarbeit von C. Raab). Würde also die Kanalfunktion von Kv7.1 Apoptose beeinflussen können, müssten bei der Expression von Kv7.1-D459A mit KCNE1 im Vergleich zu WT Kv7.1, welches mit KCNE1 ko-exprimiert wird, die Anzahl der apoptotischen Zellen steigen (Abb. 20).

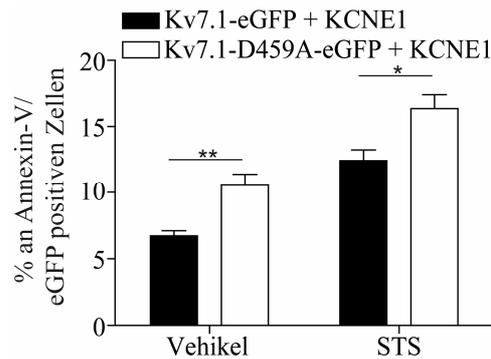


Abbildung 20: Die Mutation D459A in Kv7.1 verstärkt Apoptose. SW707-Zellen wurden mit Kv7.1-eGFP zusammen mit KCNE1 (Kv7.1-eGFP + KCNE1) oder Kv7.1-D459A-eGFP zusammen mit KCNE1 (Kv7.1-D459A-eGFP + KCNE1) transfiziert und 48 Stunden später mit DMSO oder 2 μ M Staurosporin (STS) für 6 Stunden stimuliert. Die Statistik wurde mittels einseitigem unpaarigem *student's t*-Test ermittelt und mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. * $0,01 \leq p < 0,05$. ** $0,001 \leq p < 0,01$

Die Expression von Kv7.1-D459A zusammen mit KCNE1 erhöhte im Vergleich zu WT Kv7.1, welches mit KCNE1 ko-exprimiert wird, unter allen getesteten Bedingungen die Anzahl der apoptotischen Zellen. Da Kv7.1-D459A bei Ko-Expression mit KCNE1 mehr Kanalaktivität als WT Kv7.1, welches mit KCNE1 ko-exprimiert wird, zeigt (Daten nicht gezeigt), könnte der Kv7.1-D459A-bedingte Anstieg an apoptotischen Zellen über die erhöhte Kanalfunktion von Kv7.1-D459A vermittelt werden.

Um zu verifizieren, dass Kv7.1-D459A wirklich Apoptose erhöhen kann, wurde diese Kv7.1-Mutante nicht nur nach transienter Expression, sondern auch nach stabiler Expression in Hek 293 T-Zellen untersucht. Bei transienten Transfektionen kommt es häufig zu ungewollter, indirekter Auslösung von Apoptose durch Überexpression des jeweiligen DNA-Konstruktes. Es wurden zwei Hek 293 T-Zelllinien, die WT Kv7.1-myc und Kv7.1-D459A stabil exprimieren, etabliert (Daten nicht gezeigt). Apoptose wurde nach Applikation mit Staurosporin zunächst in der Immunofluoreszenzfärbung in diesen zwei Zelllinien untersucht (Abb. 21).

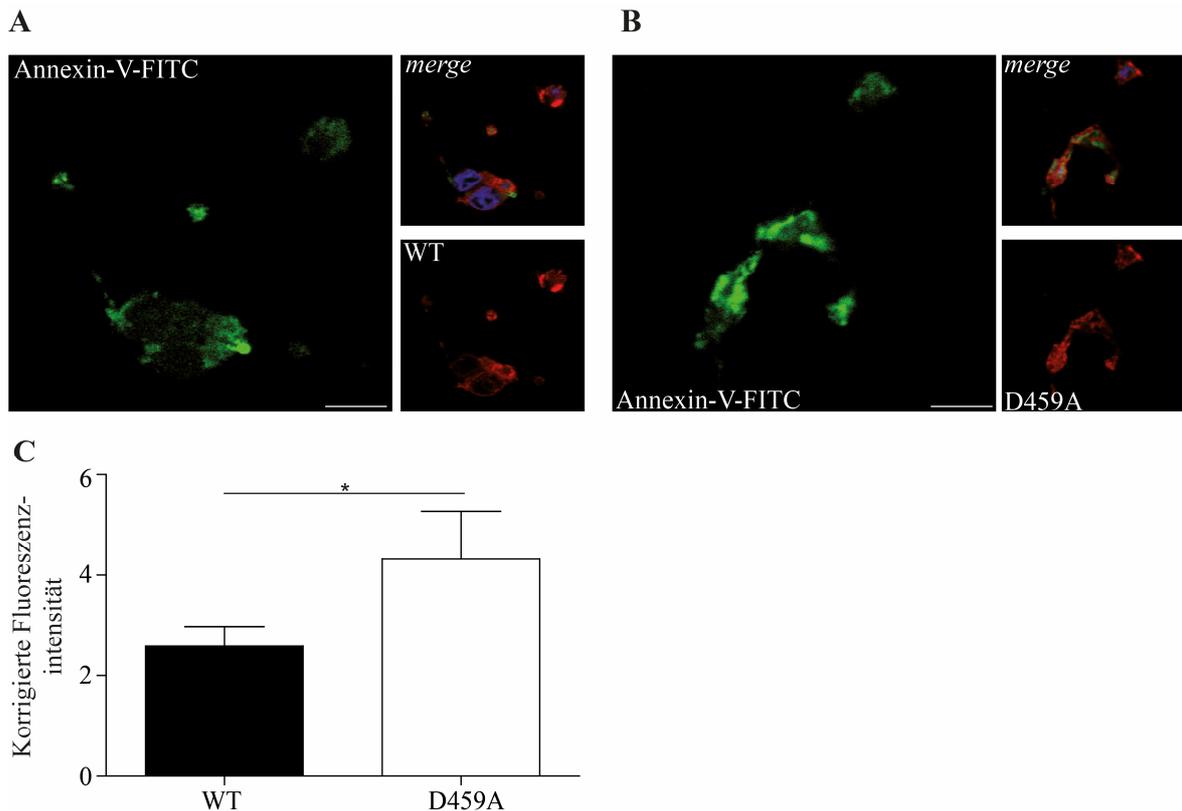


Abbildung 21: Kv7.1-D459A zeigt mehr Annexin-FITC-Färbung. (A) Mit Kv7.1-myc stabil transfizierte Hek 293 T-Zellen (WT) wurden für 6 Stunden mit 2 μ M Staurosporin (STS) stimuliert. Maßstab steht für 5 μ m. (B) Mit Kv7.1-D459A-myc stabil transfizierte Hek 293 T-Zellen (D459A) wurden für 6 Stunden mit 2 μ M Staurosporin (STS) stimuliert. Maßstab steht für 5 μ m. (C) Auswertung der korrigierten totalen Zellfluoreszenzintensität nach (Burgess et al., 2010; Gavet, Pines, 2010; Potapova et al., 2011). Die Statistik wurde mittels einseitigem unpaarigem *student's t*-Test ermittelt und eine Signifikanz wurde ab $p < 0,05$ festgesetzt. * $0,01 \leq p < 0,05$.

Die Kv7.1-D459A-myc stabil transfizierten Zellen zeigten signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten von Annexin-V-FITC im Vergleich zu den mit WT Kv7.1 stabil transfizierten Zellen. Der Anstieg an Fluoreszenzaktivität spricht für einen Anstieg an Apoptose. Um dieses Ergebnis aus der Immunfluoreszenzfärbung zu verifizieren, wurden die mit WT Kv7.1 oder Kv7.1-D459A stabil transfizierten Zellen mit Annexin-V-APC gefärbt und in der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Anzahl der apoptotischen Zellen untersucht (Abb. 22).

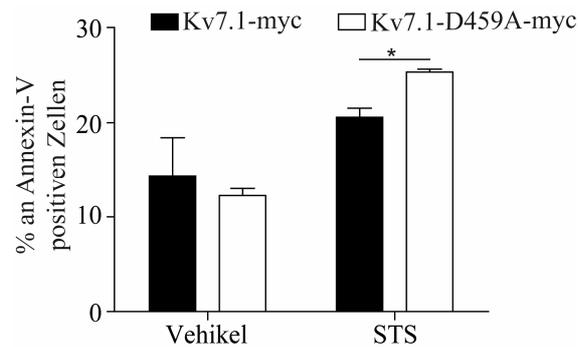


Abbildung 22: Kv7.1-D459A ist pro-apoptisch. Hek 293 T-Zellen, die stabil mit WT Kv7.1-myc oder Kv7.1-D459A-myc transfiziert sind, wurden für 6 Stunden mit DMSO oder 2 μ M Staurosporin (STS) stimuliert. Die Statistik wurde mittels unpaarigem einseitigem *student's* t-Test ermittelt und mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. * $0,01 \leq p < 0,05$.

Ohne Staurosporinexposition war in den mit WT Kv7.1-myc oder Kv7.1-D459A-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen keine Veränderung der Apoptoserate zu bemerken. Wurden die Zellen zusätzlich mit dem Apoptose-auslösenden Staurosporin behandelt, so erhöhte die Expression von Kv7.1-D459A im Vergleich zu WT Kv7.1 die Anzahl der apoptotischen Zellen. Die Kanalaktivität von Kv7.1-D459A ist nur nach Applikation mit Staurosporin höher als die Kanalfunktion von WT Kv7.1 (Doktorarbeit von C. Raab). Demnach könnte dieser Unterschied an Kanalaktivität die veränderte Anzahl der Apoptoserate bedingen. Somit scheint der Kv7.1-vermittelte Kaliumefflux pro-apoptotisch sein.

Zusammengefasst ist gezeigt worden, dass Apoptose durch die Expression einer inaktiven Kv7.1-Mutante (Kv7.1-D317A) (Abb. 18), sowie durch den pharmakologischen Block der endogenen Kanalaktivität von Kv7.1 (Abb. 19) verringert werden konnte. Weiterhin wird durch eine Mutante von Kv7.1 (Kv7.1-D459A), die gegenüber WT Kv7.1 eine verstärkte Kanalaktivität zeigt, auch mehr Apoptose ausgelöst (Abb. 20 – 22). Demnach scheint die Kanalfunktion von Kv7.1 einen geringen Einfluss auf Apoptose zu haben, so wie es auch Duranton und Kollegen 2010 in einer Nierenzelllinie beschrieben (Duranton et al., 2010).

4.3.2. Untersuchung zum Einfluss des CTF2 von Kv7.1 auf Apoptose

Zunächst wurde untersucht, ob die Kanalaktivität von Kv7.1 einen positiven Einfluss auf Apoptose nehmen kann. Weiterführend sollte analysiert werden, ob die Caspasen-abhängige Proteolyse von Kv7.1 eine Rolle im programmierten Zelltod einnimmt. Bei der Proteolyse von Kv7.1 zum CTF2-Fragment (Abb. 14) wird dieses Fragment ins Zytosol abgegeben (Abb. 15). Im Zytosol ist das CTF2-Fragment von Kv7.1 dann in der Lage, in den Zellkern zu translozieren, wo es möglicherweise die Expression von Genen beeinflusst

(Doktorarbeit von C. Raab). Würde das CTF2-Fragment die Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen verändern, so hätte der Kv7.1 nicht nur mit seiner Kanalaktivität einen Einfluss auf Apoptose, sondern auch mit der Freisetzung des CTF2-Fragmentes. Um zu untersuchen, ob das CTF2-Fragment von Kv7.1 Apoptose beeinflussen kann, wurde dieses Fragment von Kv7.1 in den pFrog3-Vektor kloniert (Kv7.1-CTF2-myc) (Abb. 23).

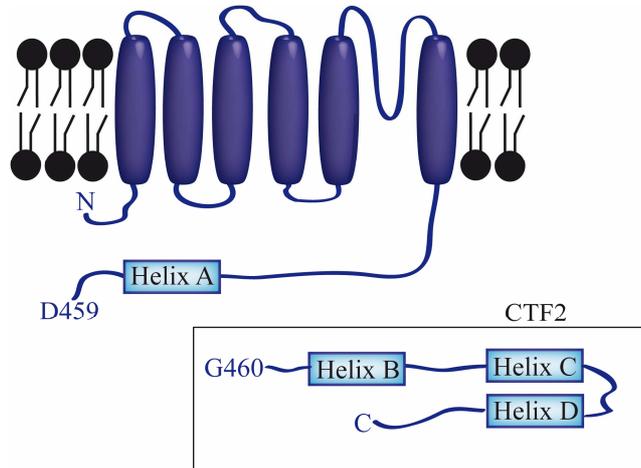


Abbildung 23: Aufbau von Kv7.1-CTF2-myc.

Um den Einfluss von Kv7.1-CTF2-myc auf Apoptose zu untersuchen, wurden HeLa Zellen transient mit Kv7.1-CTF2-myc transfiziert und mittels Annexin-V-FITC die apoptotischen Zellen gefärbt (Abb. 24).

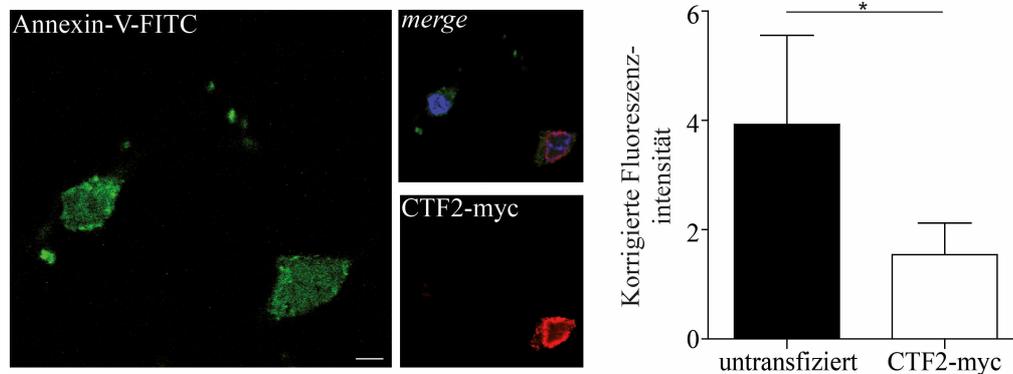


Abbildung 24: Die Expression vom CTF2 des Kv7.1 vermindert Annexin-V-FITC-Färbung. HeLa-Zellen wurden transient mit Kv7.1-CTF2-myc (CTF2-myc) transfiziert und 48 Stunden später für 6 Stunden mit 2 μ M Staurosporin stimuliert. Der Maßstab entspricht 5 μ m (links). Die Auswertung der Färbung erfolgte nach (Burgess et al., 2010; Gavet, Pines, 2010; Potapova et al., 2011). Die Statistik wurde mittels Mann-Whitney-U getestet, nachdem drei verschiedene Tests auf Normalverteilung fehlgeschlagen sind. Eine Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ angelegt. * $0,01 \leq p < 0,05$ (rechts).

Die transient mit Kv7.1-CTF2-myc (CTF2-myc) transfizierten HeLa-Zellen zeigten eine erniedrigte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den untransfizierten HeLa-Zellen. Dies deutet auf eine Verringerung der Apoptose durch Expression von Kv7.1-CTF2-myc an. Um diesen negativen Einfluss des CTF2-Fragmentes von Kv7.1 auf Apoptose weiter zu bestätigen, wurden HeLa-Zellen transient mit Kv7.1-CTF2-eGFP transfiziert und mit Annexin-V-APC die Anzahl der apoptotischen Zellen untersucht (Abb. 25).

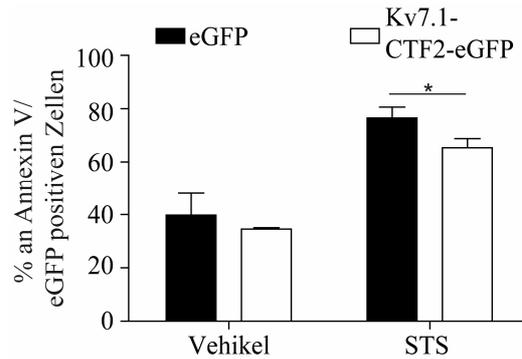


Abbildung 25: Die transiente Expression des Kv7.1-CTF2-eGFP vermindert Apoptose. HeLa-Zellen wurden transient mit Kv7.1-CTF2-eGFP transfiziert und 48 Stunden später für 6 Stunden mit DMSO oder 2 μ M Staurosporin (STS) behandelt. Die Statistik wurde mit einseitigem unpaarigem *student's t*-Test ermittelt und mit $p < 0,05$ als signifikant definiert. * $0,01 \leq p < 0,05$.

Die mit Kv7.1-CTF2-eGFP exprimierenden Zellen zeigten unter Staurosporinbehandlung etwas weniger Apoptose als die eGFP exprimierenden Zellen. Die Kontroll-behandelten Zellen zeigten keinen Unterschied in der Apoptose.

Soweit deuten die bisherigen Ergebnisse an, dass das CTF2-Fragment von Kv7.1 vielleicht einen geringen Effekt auf Apoptose nimmt. Durch Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass das CTF2-Fragment in den Zellkern translozieren kann (Doktorarbeit von C. Raab). Da das CTF2-Fragment von Kv7.1 über eine Caspasen-abhängige Proteolyse entsteht (Abb. 14), wird diese Fragment unter apoptotischen Bedingungen gebildet. Um nun zu untersuchen, ob das CTF2-Fragment auch während der Apoptose im Zellkern zu finden ist, wurden die mit Kv7.1-CTF2-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen mit Staurosporin behandelt und die Kernlokalisierung vom Kv7.1-CTF2-myc mittels Western Blots überprüft (Abb. 26).

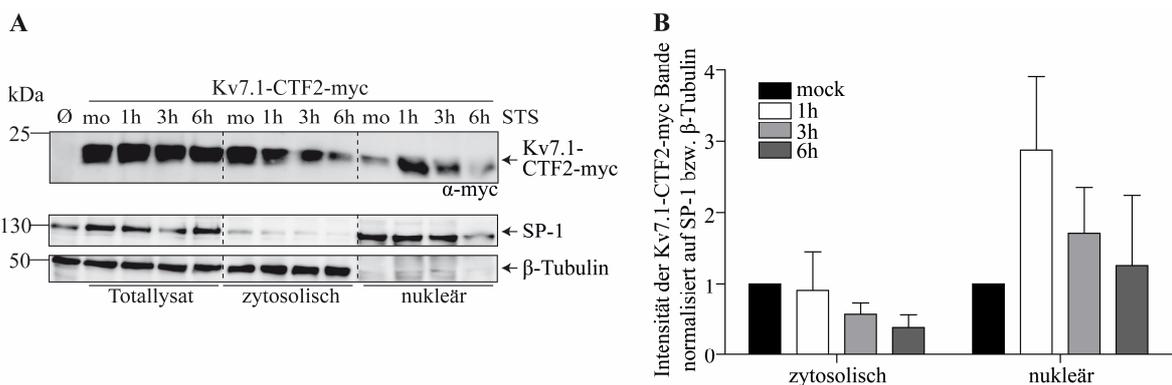


Abbildung 26: Die subzelluläre Lokalisation von Kv7.1-CTF2-myc unter apoptotischen Bedingungen. (A) Stabil mit Kv7.1-CTF2-myc transfizierte Hek 293 T-Zellen wurden für eins, drei oder sechs Stunden mit 2 μ M Staurosporin (STS) behandelt und mittels Western Blots untersucht. Untransfizierte und mock (mo) behandelte Proben dienten als Negativkontrolle. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. (B) Densitometrische Analyse von drei unabhängigen Experimenten der Kv7.1-CTF2-Bandenintensität normalisiert auf die Bandenintensität von β -Tubulin (zytosolisch) beziehungsweise SP-1 (nukleär).

Die Western Blot Analyse ergab, dass Kv7.1-CTF2-myc unter apoptotischen Bedingungen nicht degradiert wurde, da im Totallysat keine Abnahme von Kv7.1-CTF2-myc zu notieren war. Die höchste Kernlokalisierung von Kv7.1-CTF2-myc zeigte sich nach einer einstündigen Stimulation mit Staurosporin, wobei nach längerer Behandlung mit Staurosporin die Kernlokalisierung von Kv7.1-CTF2-myc wieder abnahm. Im Zytosol nimmt die Expression von Kv7.1-CTF2-myc über den Zeitraum von ein bis sechs Stunden Staurosporinbehandlung ab. Somit ist das CTF2 während Apoptose exprimiert und zum Teil auch im Zellkern vorhanden.

4.3.3. Mechanistische Untersuchungen zur potentiellen anti-apoptischen Funktion des CTF2

Nachdem festgestellt wurde, dass das CTF2-Fragment auch während der Apoptose im Zellkern vorhanden ist, sollte weiterführend untersucht werden, wie das CTF2-Fragment von Kv7.1 Apoptose möglicherweise beeinflussen könnte. Zunächst wurde überprüft, ob das CTF2-Fragment die Expression von apoptotischen Markern verändern kann. Dafür wurde die RNA-Expression von Genen, die Apoptose beeinflussen, in Kv7.1-CTF2-myc stabil transfizierten Zellen im Vergleich zu Vektor transfizierten Zellen untersucht (Abb. 27).

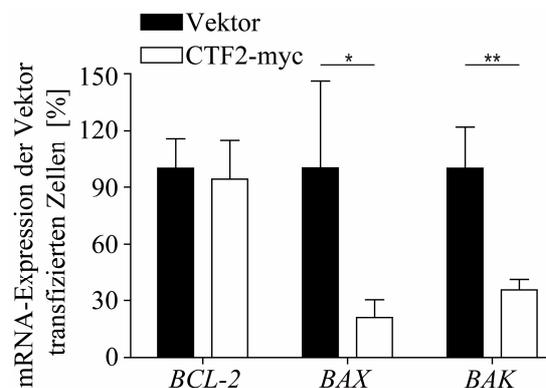


Abbildung 27: Das CTF2-Fragment von Kv7.1 vermindert die mRNA-Expression von BAX und BAK. Mit Vektor oder Kv7.1-CTF2-myc (CTF2-myc) stabil transfizierte Hek 293 T-Zellen wurden mittels qRT-PCR auf die Expression von *BAX*, *BAK* und *BCL-2* untersucht. Die Statistik wurde mit einseitigem unpaarigem Mann-Whitney-U ermittelt, nachdem drei Tests zur Normalverteilung fehlgeschlagen waren, und eine Signifikanz ab $p < 0,05$ festgelegt. * $0,01 \leq p < 0,05$. ** $0,001 \leq p < 0,01$.

Die qRT-PCR zeigte, dass Kv7.1-CTF2-myc in der Lage war, die mRNA-Expression von *BAX* und *BAK* signifikant zu verringern. Kv7.1-CTF2-myc hatte dabei keinen Einfluss auf die Expression von *BCL-2*. Zur Verifizierung wurde ebenfalls die Proteinexpression von *BCL-2*, *BAX* und *BAK* in den mit Kv7.1-CTF2-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen untersucht (Abb. 28).

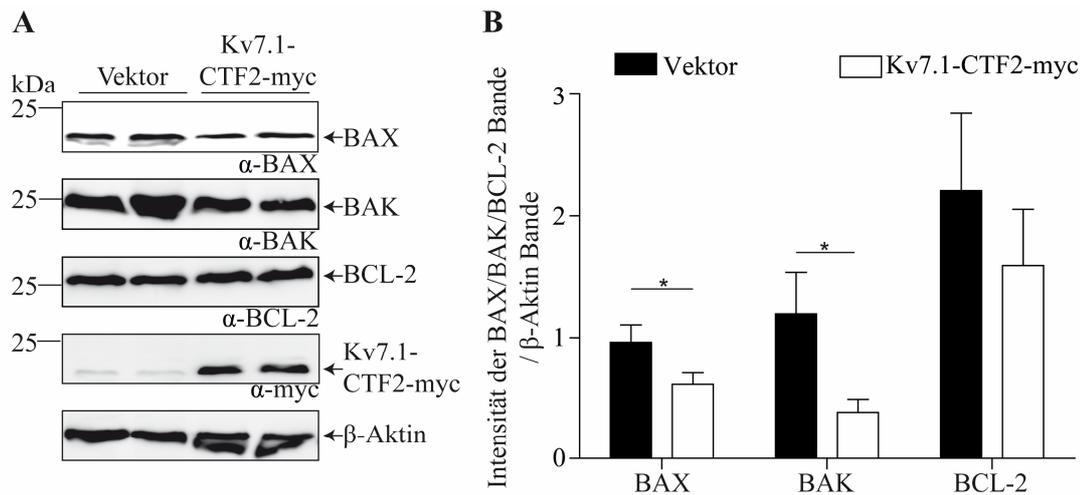


Abbildung 28: Die Expression von Kv7.1-CTF2-myc vermindert die Expression von BAX und BAK auf Proteinebene. (A) Mit Vektor oder Kv7.1-CTF2-myc stabil transfizierte Hek 293 T-Zellen wurden mittels Western Blot auf die Expression auf BAX, BAK und BCL-2 analysiert. Vektor transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. (B) Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen der Bandenintensität von BAX, BAK und BCL-2 normalisiert auf die Bandenintensität von β -Aktin der mit Vektor oder Kv7.1-CTF2-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen. Die Statistik wurde mittels einseitigem unpaarigem *student's t*-Test ermittelt und $p < 0,05$ als signifikant angesehen. * $0,01 \leq p < 0,05$.

Die Analyse des Western Blots zeigte, dass die Negativregulation von Kv7.1-CTF2-myc auf BAX und BAK auch auf Proteinebene bemerkbar wurde. Eine Regulation vom Kv7.1-CTF2-myc auf BCL-2 war weiterhin nicht zu beobachten. Insgesamt konnte so gezeigt werden, dass das CTF2-Fragment Apoptose minimal verringert und die Expression von BAX und BAK negativ beeinflusst.

Da die Proteolyse des Kv7.1 weder in Entzündungsprozessen im Herzen noch während der Apoptose wirklich bedeutend zu sein scheint, stellte sich weiterhin die Frage, wo die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2 eine Rolle spielen könnte.

4.4. Kv7.1 wird in gealterten Zellen stärker zum CTF2 prozessiert

Da eine vermehrte Aktivierung von Caspasen im gealterten Herzen beschrieben worden ist (Condorelli et al., 2001; Li et al., 2002; Merkle et al., 2007; Pollack et al., 2002; Yang et al., 1998) erschien es möglich, dass Kv7.1 in älteren Kardiomyozyten vermehrt zum CTF2 gespalten wird. Um den Einfluss von Alterung auf die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2 zu untersuchen, wurde Progerin, eine verkürzte Variante des Lamin A, genutzt (Coutinho et al., 2009; Miller et al., 2013). Lamin A wird durch mehrere proteolytische Schnitte maturiert. Wenn dabei der letzte Prozessierungsschnitt des Lamin A aufgehoben wird, akkumuliert farnesyliertes Prälamina A (Progerin). Patienten mit dem *Hutchinson-Gilford progeria* Syndrom zeigen neben Progerinakkumulation Alterungserscheinungen innerhalb

von ein bis zwei Lebensjahren. Somit wurde geschlossen, dass die Expression von Progerin Zellen vorzeitig altern kann. Um nun zu untersuchen, ob Alterung von Zellen die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2 beeinflussen kann, wurde Progerin stabil in Kv7.1-myc stabil transfizierte Hek 293 T-Zellen transfiziert. Da Progerin in der Membran des Zellkernes akkumuliert, wurde zur Kontrolle eine weitere Zelllinie erstellt. Diese Zelllinie exprimiert neben Kv7.1 ein eGFP-Konstrukt, welches eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) enthält (NLS-eGFP). Die Expression von NLS-eGFP und eGFP-Progerin wurde nach Antibiotikaselektion in den mit Kv7.1-myc doppelt stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen mittels Western Blots überprüft (Abb. 29).

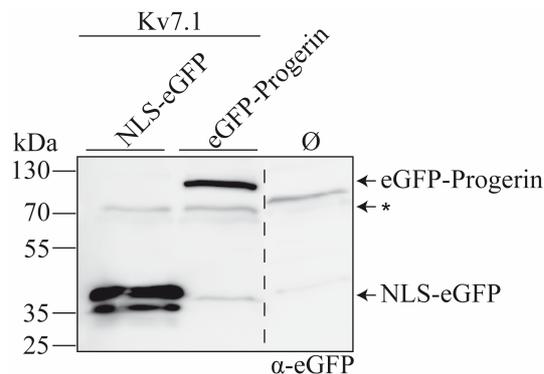


Abbildung 29: Expressionsüberprüfung der stabil transfizierten Zellen. Hek 293 T-Zellen, die Kv7.1 stabil exprimierten, wurden mit eGFP-Progerin beziehungsweise NLS-eGFP transfiziert und mittels Hygromycin B selektioniert. Die Kontrolle der eGFP-Progerin- und NLS-eGFP-Expression erfolgte mittels Western Blot. Asterisk zeigt eine unspezifische Bande des α -eGFP-Antikörpers.

Der Western Blot zeigte eine ausreichende Expression von NLS-eGFP und eGFP-Progerin in den mit Kv7.1-myc doppelt stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen. Daher wurde die Analyse der mit NLS-eGFP/Kv7.1-myc (von hier an NLS-eGFP transfizierte Zelllinie) und eGFP-Progerin/Kv7.1-myc (von hier an eGFP-Progerin transfizierte Zelllinie) transfizierten Hek 293 T-Zellen fortgeführt. Es wurde zunächst überprüft, ob überhaupt eine Alterung durch die Expression von eGFP-Progerin in diesen Hek 293 T-Zellen stattgefunden hatte. Dafür wurden zwei Kriterien genutzt, die dafür bekannt sind, bei Alterungsprozessen anzusteigen: 1) eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und 2) ein verstärktes Vorkommen von Apoptose (Miller et al., 2013). Zuerst wurde analysiert, ob vermehrt reaktive Sauerstoffspezies in den mit eGFP-Progerin transfizierten Zellen auftreten. Zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies wurde der Farbstoff Mitosox genutzt (s. 3.2.2.17.). Mitosox zeigt bei Bindung von reaktiven Sauerstoffspezies eine Fluoreszenz bei 594 nm. In der Durchflusszytometrie kann dann bestimmt werden, wie viele Zellen reaktive Sauerstoffspezies gebildet haben (Abb. 30).

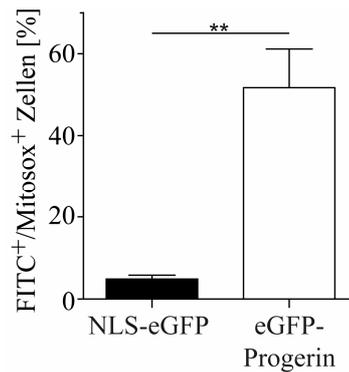


Abbildung 30: Reaktive Sauerstoffspezien akkumulieren in Hek 293 T-Zellen nach Progerin-Expression. Anzahl an FITC und Mitoxox positiven Zellen der NLS-eGFP/Kv7.1-myc oder eGFP-Progerin/Kv7.1-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Eine von drei unabhängigen Experimenten ist repräsentativ gezeigt. Statistik wurde mittels unpaarigem einseitigem *student's* t-Test ermittelt und mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. ** $0,001 \leq p < 0,01$.

Es zeigte sich, dass eGFP-Progerin im Vergleich zu NLS-eGFP die Anzahl der reaktiven Sauerstoffspezien in den Hek 293 T-Zellen erhöhte. Demnach könnte die eGFP-Progerin-Expression die Hek 293 T-Zellen gealtert haben. Um dies weiter zu überprüfen, wurde das Ausmaß der Apoptose in diesen Hek 293 T-Zellen bestimmt. Dafür wurden die mit eGFP-Progerin und NLS-eGFP transfizierten Zellen mit Staurosporin behandelt und die Intensität der aktiven Caspase-3 als indirektes Mittel zum Nachweis für Apoptose im Western Blot ermittelt (Abb. 31).

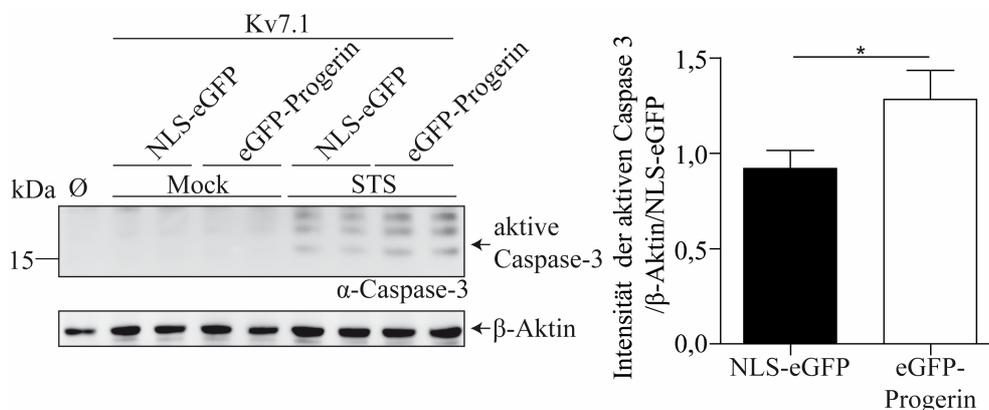


Abbildung 31: Hek 293 T-Zellen zeigen mehr aktive Caspase-3 unter Expression von eGFP-Progerin. (A) Hek 293 T Zellen, welche stabil Kv7.1-myc und NLS-eGFP beziehungsweise eGFP-Progerin exprimieren, wurden entweder mit DMSO (mock) oder mit 2 μ M Staurosporin (STS) für sechs Stunden behandelt und darauffolgend einer Zellyse und Western Blot unterzogen (links). Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten der Intensität der aktiven Caspase 3-Banden normalisiert auf β -Aktin / NLS-eGFP der mit Staurosporin behandelten Proben (rechts). Statistik wurde mittels unpaarigem einseitigem *student's* t-Test ermittelt und mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. * $0,01 \leq p < 0,05$.

Die Expression von eGFP-Progerin im Vergleich zu NLS-eGFP zeigte mehr aktive Caspase-3, wenn Apoptose zusätzlich mit Staurosporin ausgelöst wurde. Da Caspase-3 eine wichtige Effektorcaspase ist, spricht das vermehrte Auftreten von aktiver Caspase-3 für eine beschleunigte Apoptose nach Expression von eGFP-Progerin. Da die eGFP-

Progerin-Expression die Anzahl der reaktiven Sauerstoffspezies erhöhte und Apoptose beschleunigte, wurden die Hek 293 T-Zellen durch eGFP-Progerin-Expression gealtert.

Schlussendlich wurde nun untersucht, ob der durch Progerin bedingte Alterungsprozess zu einer vermehrten Proteolyse von Kv7.1 zum CTF2 führte. Dafür wurden die NLS-eGFP/Kv7.1-myc und eGFP-Progerin/Kv7.1-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen hinsichtlich der CTF2-Intensität des Kv7.1 im Western Blot untersucht (Abb. 32).

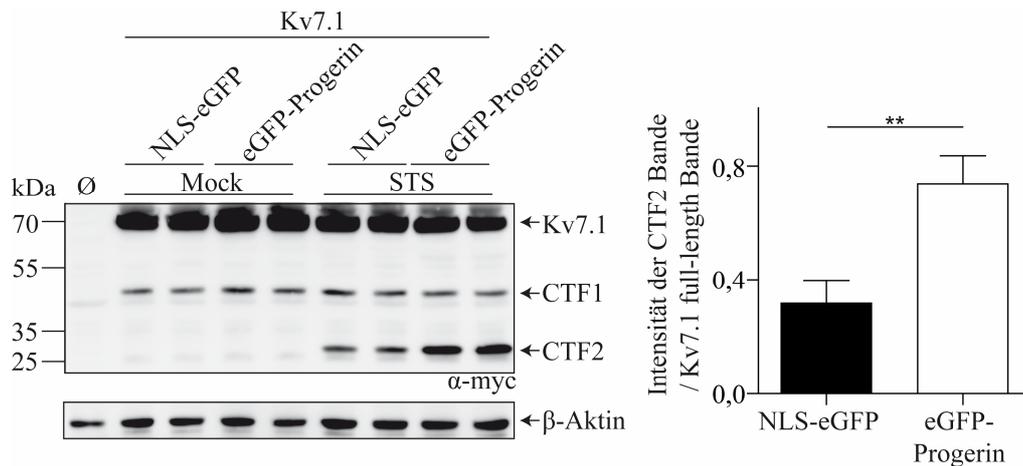


Abbildung 32: Alterung von Hek 293 T Zellen führt zu vermehrter Proteolyse von Kv7.1 zum CTF2. Die mit NLS-eGFP/Kv7.1-myc und eGFP-Progerin/Kv7.1-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen wurde mit mock (DMSO) oder mit 2 μ M Staurosporin (STS) für sechs Stunden stimuliert und nach der Zelllyse im Western Blot untersucht (links). Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten der Intensität der CTF2-Bande normalisiert auf die Bande für das unprozessierte Kv7.1 (rechts). Ein repräsentatives von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Statistik wurde mittels unpaarigem einseitigem *student's t*-Test ermittelt und mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. ** $0,001 \leq p < 0,01$. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2.

In der Western Blot Analyse wurde festgestellt, dass Kv7.1 unter NLS-eGFP- und eGFP-Progerinexpression das typische Bandenmuster des Kv7.1 mit unprozessierter Form (70 kDa) und CTF1-Bande (40 kDa) zeigte. Die CTF2-Bande des Kv7.1 war nur bei Staurosporinexposition im Western Blot zu sehen. Durch Expression von eGFP-Progerin im Vergleich zu NLS-eGFP nahm die CTF2-Intensität des Kv7.1 bei Applikation eines apoptotischen Stimulus signifikant zu. Somit kann die Proteolyse von Kv7.1 in gealterten Zellen von Bedeutung sein, während sie für Entzündungen oder Apoptose eine weniger ausgeprägte Rolle einnimmt.

4.5. Natürlich vorkommende Mutationen von Kv7.1 mit veränderter Prozessierung des Kv7.1

Mutationen in Kv7.1 lösen Herzrhythmen aus (Arnestad et al., 2007; Dvir et al., 2014; Horr et al., 2011; Rivas, Francis, 2005; Robbins, 2001; Schmitt et al., 2000; Splawski et al., 2000). Daher stellte sich die Frage, ob die Proteolyse die Kv7.1-bedingten

Herzarrhythmien beeinflussen kann. Somit wurde nach natürlich vorkommenden Mutationen von Kv7.1 gesucht, die in Patienten Herzarrhythmien ausgelöst haben und gleichzeitig eine veränderte Prozessierung zum CTF2 zeigten. Bei der Suche nach Patientenmutationen des Kv7.1 mit veränderter Prozessierung wurden die Mutationen Kv7.1-G460S und Kv7.1-A372D (Arnestad et al., 2007; Crotti et al., 2012) mit einer veränderte Proteolyse zum CTF2 gefunden (Abb. 33).

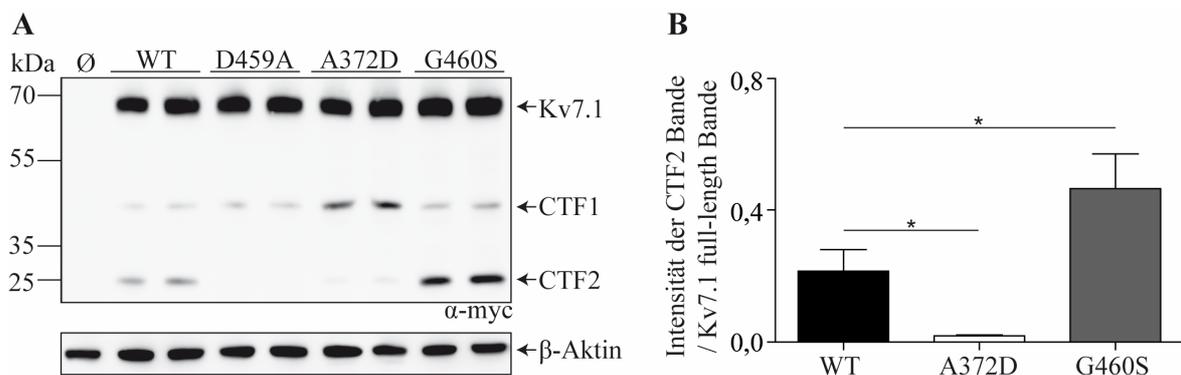


Abbildung 33: Natürlich vorkommende Mutationen in Kv7.1 beeinflussen die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2. (A) Western Blot Analyse von HeLa-Zellen transient mit WT Kv7.1-myc (WT), Kv7.1-D459A-myc (D459A), Kv7.1-A372D-myc (A372D) und Kv7.1-G460S-myc (G460S) transfiziert. Untransfizierte, WT Kv7.1 (WT) und Kv7.1-D459A-myc (D459A) transfizierte Zellen dienen als Negativ- beziehungsweise Positivkontrollen. Eine repräsentative von vier verschiedenen Analysen ist gezeigt. (B) Densitometrische Auswertung von vier verschiedenen unabhängigen Experimenten der CTF2-Bandenintensität normalisiert auf die *full-length* Bande von Kv7.1. Die Statistik wurde mittels *One-Way-Anova* gefolgt von Bonferroni's multiplen Vergleichstest ermittelt und $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. * $0,01 \leq p < 0,05$. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2.

Der Western Blot zeigte für WT Kv7.1 das typische Bandenmuster mit den Banden bei 70, 40 und 25 kDa. Zur Kontrolle wurde Kv7.1-D459A mitgeführt, welches nur die 70 und 40 kDa Bande (unprozessiertes Kv7.1 und CTF1-Fragment) von Kv7.1 zeigte. Die Caspaseschnittstelle zum CTF2 wurde durch den Austausch zu Alanin an Position 459 in Kv7.1-D459A eliminiert. Die zwei untersuchten Patientenmutationen, Kv7.1-A372D und Kv7.1-G460S, zeigten auch die monomere Form von Kv7.1 bei 70 kDa, sowie die Bande für das CTF1-Fragment bei circa 40 kDa. Kv7.1-A372D wurde im Vergleich zu WT Kv7.1 kaum bis gar nicht mehr zum CTF2 prozessiert. Kv7.1-G460S zeigte im Vergleich zu WT Kv7.1 eine vermehrte Proteolyse zum CTF2.

Um zu untersuchen, ob die veränderte Prozessierung von Kv7.1-G460S die Pathophysiologie der G460S Mutation in Kv7.1 erklären könnte, wurde Kv7.1-G460S hinsichtlich der Kanalaktivität mit der Zwei-Elektrodenspannungsklemme in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht (Abb. 34).

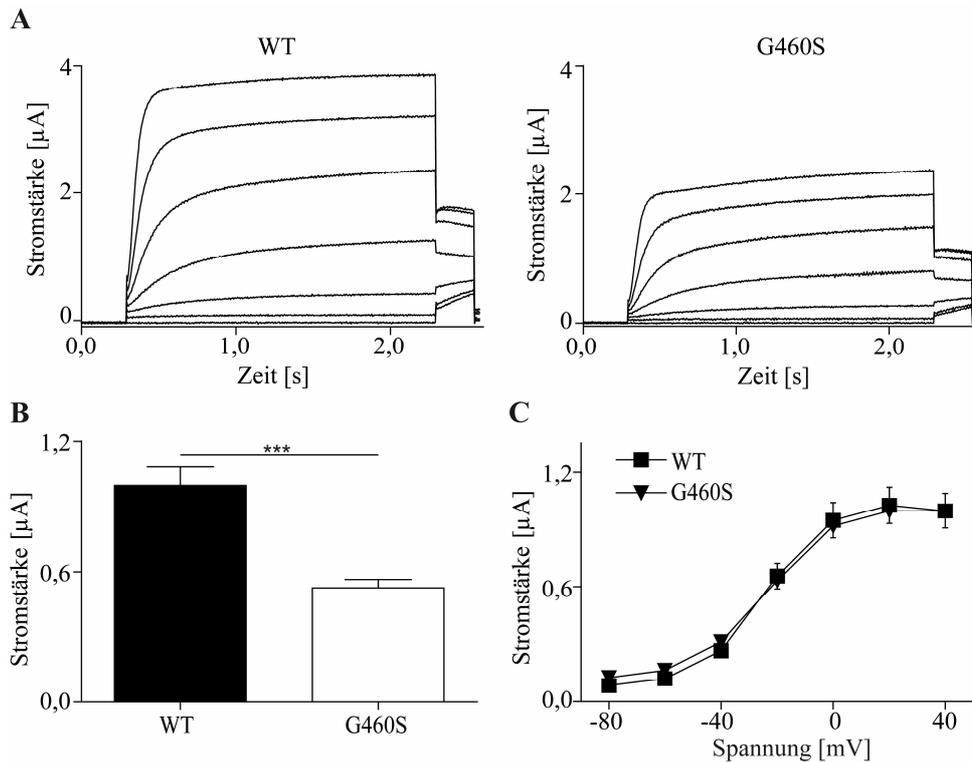


Abbildung 34: Der Austausch von Glycin 460 zu Serin in Kv7.1 vermindert die Kanalaktivität von Kv7.1. (A) Charakteristische Stromkurven von WT Kv7.1 (WT) (n = 36, links) und Kv7.1-G460S (G460S) (n = 14, rechts). (B) *Steady-State*-Analyse der auf WT Kv7.1 bei 40 mV bei 2,0 Sekunden normalisierten Ströme von WT Kv7.1 (WT) und Kv7.1-G460S (G460S). (C) *Tail-Current*-Analyse der bei 40 mV und 2,3 Sekunden normalisierten Ströme von WT Kv7.1 (WT) und Kv7.1-G460S (G460S).

Die Stromkurven von Kv7.1-G460S waren im Vergleich zu WT Kv7.1 nahezu halbiert (Abb. 34A). Dabei wurden keine weiteren Auffälligkeiten in den Strömen festgestellt. Um zu überprüfen, ob Kv7.1-G460S wirklich verminderte Stromkurven gegenüber WT Kv7.1 zeigte, wurde die *Steady-State*-Analyse genutzt. In der *Steady-State*-Analyse werden die Stromkurven von Kv7.1 bei 2,0 Sekunden untersucht. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Kaliumfluss von Kv7.1 im Gleichgewicht (*Steady-State*, Abb. 34A WT Kv7.1). Demnach kann zu diesem Zeitpunkt analysiert werden, wie viel Kalium über verschiedene Kv7.1-Varianten aus der Zelle fließt. In *Steady-State*-Analyse von WT Kv7.1 und Kv7.1-G460S bestätigte sich die Halbierung der Stromkurven (Abb. 34B). Um weiterführend zu untersuchen, ob Kv7.1-G460S noch weitere Auffälligkeiten als die halbierten Stromkurven zeigte, wurde die *Tail-Current*-Analyse genutzt. Bei dieser Analyse wird die Reaktion des Kv7.1 nach Applikation von aktivierenden und inaktivierenden Strömen untersucht. Indem einerseits aktivierende Potentiale genutzt werden, kann die Aktivierung von Kv7.1 betrachtet werden. Im Gegenzug ist durch die Applikation von inaktivierenden Spannungen die Inaktivierung von Kv7.1 analysierbar. Demnach kann in der *Tail-Current*-Analyse die Kanalfunktion von Kv7.1 detailliert hinsichtlich der Aktivierung und Inaktivierung von Kv7.1 betrachtet werden. Diese *Tail-Current*-Analyse von WT Kv7.1

und Kv7.1-G460S zeigte, dass die Kanalfunktion von Kv7.1-G460S im Vergleich zu WT Kv7.1 nicht verändert war (Abb. 34C). Somit sind die Kanalströme von Kv7.1-G460S im Vergleich zu WT Kv7.1 lediglich vermindert. Da Kv7.1-G460S eine verstärkte Fragmentierung zum CTF2 zeigte (Abb. 33), könnte somit die vermehrte Proteolyse eine erhöhte Inaktivierung von Kv7.1-G460S bedingen.

Es wurde aber nicht nur Kv7.1-G460S als Patientenmutation mit veränderter Prozessierung zum CTF2 untersucht. Auch Kv7.1-A372D fiel mit eingeschränkter Proteolyse zum CTF2 auf (Abb. 33). Um zu erklären, warum Kv7.1-A372D weniger Proteolyse im Vergleich zu WT Kv7.1 zeigte (Abb. 33), wurde zuerst die Lokalisation des Alanins an Position 372 in Kv7.1 betrachtet (Abb. 35).

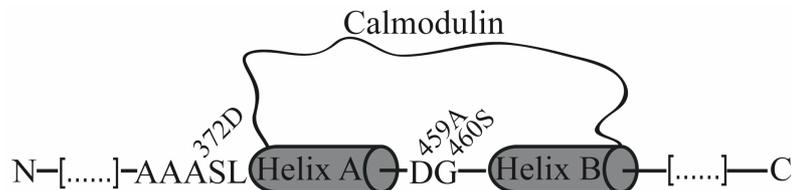


Abbildung 35: Lokalisation von A372D und G460S in Kv7.1. Zur Übersicht ist auch die Schnittstelle des CTF2-Fragmentes an D459 in Kv7.1, sowie die Calmodulinbindestellen in der intrazellulären Helix A und Helix B von Kv7.1 gezeigt.

Dabei wurde festgestellt, dass das Alanin 372 zwei Aminosäuren vor einer Calmodulinbindestelle in Kv7.1 liegt. Es ist bekannt, dass geladene Reste, wie Aspartate, in Nähe der Calmodulinbindestelle die Interaktion von Calmodulin mit Kv7-Familienmitgliedern einschränken (Etxeberria et al., 2008; Wen, Levitan, 2002; Yus-Najera et al., 2002). Da Kv7.1-A372D ein negativ geladenes Aspartat zwei Aminosäuren vor der Calmodulinbindestelle enthält, wurde geschlossen, dass diese Kv7.1-Mutante vielleicht weniger oder kein Calmodulin mehr binden kann. Um dies zu untersuchen, wurde versucht, Calmodulin mit WT Kv7.1 und Kv7.1-A372D zu ko-immunopräzipitieren (Abb. 36).

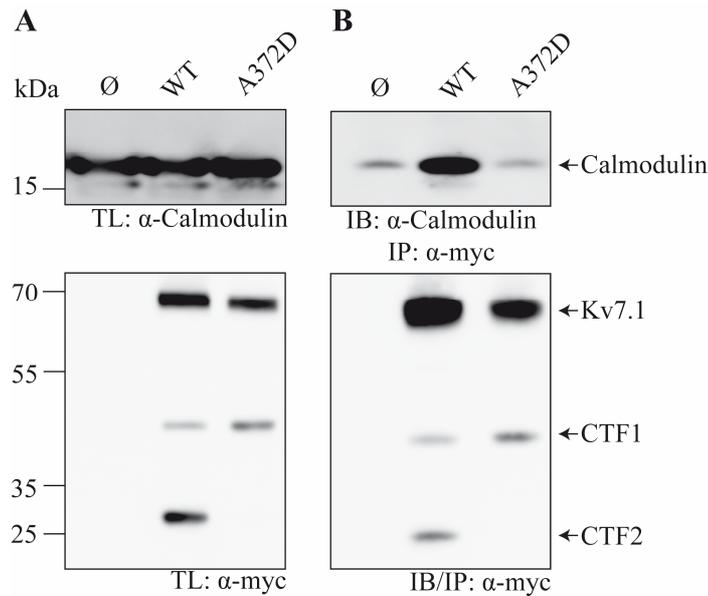


Abbildung 36: Kv7.1-A372D ist nicht mehr in der Lage, Calmodulin zu binden. HeLa-Zellen wurden transient mit WT Kv7.1 (WT) oder Kv7.1-A372D-myc (A372D) transfiziert und 72 Stunden später im Western Blot untersucht. Ein repräsentatives von drei verschiedenen unabhängigen Experimenten ist gezeigt. A: Lysatkontrollen. B: Immunopräzipitate. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2. IB: Immunoblott. IP: Immunopräzipitation. TL: Totallysat.

Die Totallysate zeigten eine Expression von WT Kv7.1 und Kv7.1-A372D (Abb. 36A). Für WT Kv7.1 war das typische Bandenmuster zu erkennen. Für Kv7.1-A372D waren nur die Banden für das unprozessierte Kv7.1 bei 70 kDa und die Bande des CTF1 bei 40 kDa zu erkennen. Weiterhin zeigte das Totallysat im Western Blot die endogene Expression von Calmodulin (Abb. 36A). Die Immunopräzipitation von WT Kv7.1 und Kv7.1-A372D mittels eines anti-myc-Antikörpers war erfolgreich. Calmodulin konnte nur bei Expression von WT Kv7.1 ko-präzipitiert werden (Abb. 36B). In der untransfizierten Probe ist eine leichte unspezifische Bindung von Calmodulin an die Agarose-Beads zu sehen. Da aber WT Kv7.1 sehr viel mehr Calmodulin ko-präzipitierte, kann von einer erfolgreichen Ko-Immunopräzipitation gesprochen werden. In dem Ko-Präzipitat von Kv7.1-A372D ist eine leichte Bande für Calmodulin zu erkennen. Da diese Bande aber genauso stark wie die Calmodulin-Bande bei der untransfizierten Probe ist, scheint Kv7.1-A372D kein Calmodulin mehr zu binden. Demnach bedingt die fehlende Calmodulinbindung möglicherweise die aufgehobene Prozessierung von Kv7.1-A372D.

Zusammengefasst scheint es mindestens zwei natürlich vorkommende Mutationen von Kv7.1 zu geben, welche die Proteolyse zum CTF2 und damit gegebenenfalls auch die Kanalaktivität von Kv7.1 beeinflussen können.

4.6. Einfluss der Proteolyse zum CTF2 auf die Kanalaktivität von Kv7.1

4.6.1. Die Calmodulinbindung ist nach Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2 vermindert

Durch Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Proteolyse zum CTF2 die Kanalaktivität von Kv7.1 verringern kann (Doktorarbeit von C. Raab). Dennoch konnte noch nicht gezeigt werden, wie die Proteolyse die Kanalfunktion von Kv7.1 aufhebt. Die Schnittstelle von Kv7.1 zum CTF2 liegt zwischen den Calmodulin-bindenden Helix A und Helix B (Abb. 35). Somit bestand die Möglichkeit, dass durch die Prozessierung zum CTF2 der verbleibende N-Terminale, Membran-gebundene Teil von Kv7.1 nicht mehr Calmodulin binden kann. Ohne Calmodulinbindung kann Kv7.1 auch keine Kanalaktivität mehr zeigen (Haitin, Attali, 2008; Wen, Levitan, 2002). Um die Interaktion von Calmodulin am prozessierten Kv7.1 zu untersuchen, wurden in HeLa-Zellen WT Kv7.1-myc und endogenes Calmodulin unter Kontroll- und apoptotischen Bedingungen (Staurosporinexposition) ko-immunopräzipitiert (Abb. 37).

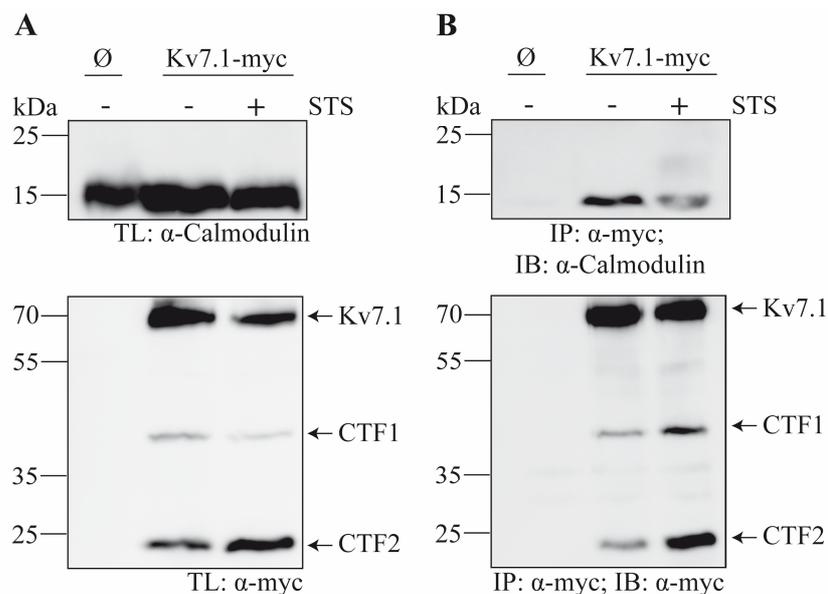


Abbildung 37: Kv7.1 bindet unter apoptotischen Bedingungen kein Calmodulin mehr. HeLa-Zellen wurden transient mit WT Kv7.1-myc transfiziert und 48 Stunden später im Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte und mock (-) behandelte Zellen genutzt. Die Stimulation mit 2 μ M Staurosporin (STS) (+) erfolgte für 6 Stunden. A: Lysatkontrollen. B: Immunopräzipitate. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2. IB: Immunoblot. IP: Immunopräzipitation. TL: Totallysat.

Die Western Blots der Abbildung 37A zeigen die Totallysate der untransfizierten und Kv7.1 transfizierten Zellen. Eine Expression von Kv7.1-myc in den HeLa-Zellen war gegeben. Die Behandlung mit dem Apoptose-auslösenden Staurosporin war erfolgreich, da im Totallysat der Kv7.1 transfizierten Zellen die CTF2-Bande bei Staurosporin- aber nicht bei Kontrollbehandlung anstieg. Gleichzeitig kam es durch die Staurosporinbehandlung zu

keinem Abbau von Calmodulin (Abb. 37A). Kv7.1-myc konnte in den Kv7.1-myc transfizierten HeLa-Zellen unter Kontroll- sowie Staurosporinbehandlung erfolgreich mit einem anti-myc-Antikörper präzipitiert werden (Abb. 37B). Calmodulin dagegen wurde unter apoptotischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung weniger stark mit Kv7.1 ko-präzipitiert. Die restliche Ko-Präzipitation von Calmodulin an Kv7.1 unter Staurosporinexposition wird vermutlich an noch vorhandenem unprozessiertem Kv7.1-myc erfolgen. Demnach bindet Kv7.1 unter apoptotischen Bedingungen weniger Calmodulin.

Um weiter zu verifizieren, ob der zum CTF2 prozessierte Kv7.1 noch Calmodulin binden kann, wurde eine Mutante von Kv7.1 erstellt, die ein Stopcodon direkt hinter dem Aspartat 459 enthält (Kv7.1-G460X) (Abb. 38A). Kv7.1-G460X entspricht damit dem N-terminalen Teil von Kv7.1, der nach Prozessierung durch Caspasen noch vorhanden ist. Es wurde versucht, Kv7.1-G460X mit Calmodulin zu ko-präzipitieren (Abb. 38B).

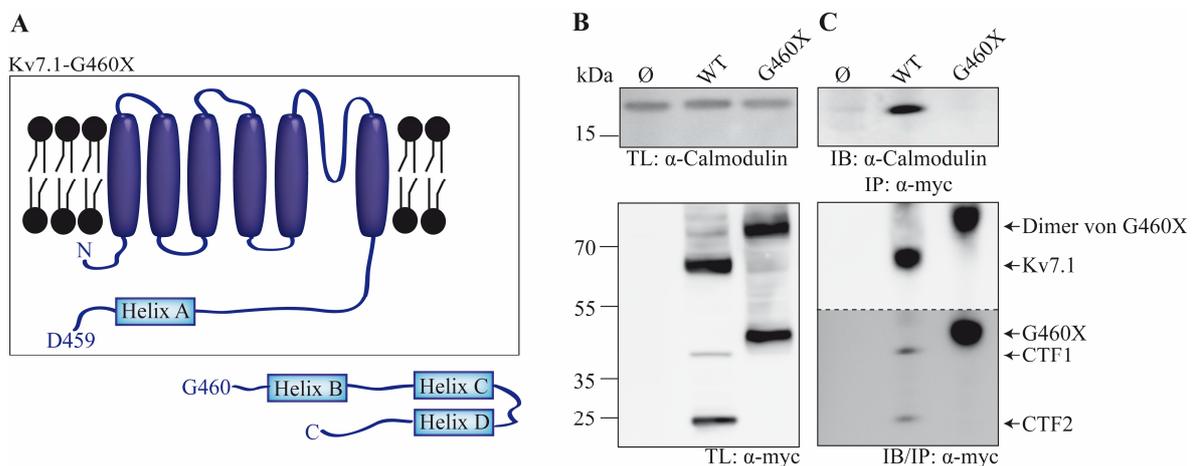


Abbildung 38: Calmodulin bindet nicht an Kv7.1-G460X. (A) Das Kv7.1-G460X Konstrukt beginnt am N-Terminus von Kv7.1 und endet mit dem Aspartat 459 von Kv7.1. Demnach spiegelt es den Kv7.1-Teil wider, der nach Prozessierung durch Caspasen in der Membran vorhanden bleibt. (B-C) HeLa-Zellen wurden transient mit WT Kv7.1-myc (WT) und Kv7.1-G460X-myc (G460X) transfiziert und 48 Stunden später im Western Blot analysiert. Untransfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Eins von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. B: Lysatkontrollen. C: Immunopräzipitate. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2. IB: Immunoblot. IP: Immunopräzipitation. TL: Totallysat.

Im Western Blot der Abbildung 38B sind die Totallysate der untransfizierten und mit WT Kv7.1-myc oder Kv7.1-G460X-myc transfizierten Zellen gezeigt. Eine Expression von WT Kv7.1-myc und Kv7.1-G460X war gegeben, wobei Calmodulin auf endogener Expressionsebene detektiert werden konnte. WT Kv7.1 zeigte wieder sein typisches Bandenmuster. Kv7.1-G460X konnte bei circa 40 kDa detektiert werden, sowie womöglich das Dimer von Kv7.1-G460X bei 80 kDa. Die Immunopräzipitation von WT Kv7.1 und Kv7.1-G460X mit einem anti-myc Antikörper verlief erfolgreich (Abb. 38C), wobei Calmodulin nur mit WT Kv7.1-myc und nicht mit Kv7.1-G460X ko-immunopräzipitiert werden konnte. Dies bedeutet, dass der nach Caspasen-bedingter

Prozessierung verbleibende N-Terminale Teil von Kv7.1 nicht mehr Calmodulin binden kann. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass das Auslösen der Proteolyse von Kv7.1 mit Staurosporin zu einer verminderten Bindung von Calmodulin an Kv7.1 führte (Abb. 37). Somit hebt die Proteolyse die Bindung von Calmodulin an Kv7.1 auf, was wiederum den Kv7.1-bedingten Kaliumfluss inaktiviert.

4.6.2. Einfluss von Phosphorylierungen an Kv7.1 auf die Proteolyse von Kv7.1

Weiterhin erhöhen Phosphorylierungen an Kv7.1 die Kanalaktivität von Kv7.1 (Kathofer et al., 2000; Kathofer et al., 2003; Kurokawa et al., 2009; Marx et al., 2002). Da, wie bereits zuvor gezeigt, die Proteolyse des Kv7.1 einen Einfluss auf die Kanalaktivität nimmt, sollten nun auch die Auswirkungen von Phosphorylierungen auf die Proteolyse des Kv7.1 analysiert werden. Dafür musste zunächst geprüft werden, ob es potentielle Phosphorylierungen an der CTF2-Schnittstelle in Kv7.1 gibt. Die Datenbank *PhosphoSitePlus* wurde zur Analyse von diesen potentiellen Phosphorylierungsstellen genutzt. (Abb. 39) (Hornbeck et al., 2012).

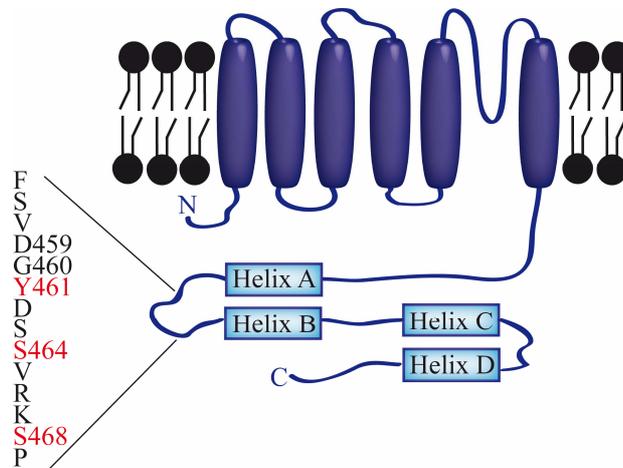


Abbildung 39: Übersicht der verschiedenen potentiellen Phosphorylierungsstellen an der Schnittstelle zum CTF2 von Kv7.1. In Rot sind die Aminosäuren hervorgehoben, die zur Untersuchung der Phosphorylierung an Kv7.1 in Nähe der CTF2-Schnittstelle untersucht werden sollten.

Die Analyse von Kv7.1 auf *PhosphositePlus* zeigte, dass es in der Nähe der CTF2 Schnittstelle an Position Y461, S464 und S468 in Kv7.1 drei potentielle Phosphorylierungsstellen gibt. Um den Einfluss dieser möglichen Phosphorylierungsstellen in Kv7.1 auf die Proteolyse zum CTF2 zu analysieren, wurden das Tyrosin 461 (Kv7.1-Y461E) sowie die Serine an Position 464 und 468 (Kv7.1-S464E, Kv7.1-S468E) in Kv7.1 zu einem Glutamat ausgetauscht. Glutamat enthält eine große negativ geladene Carboxylgruppe und kann mit dieser Gruppe Phosphorylierungen imitieren. Zusätzlich wurde noch das Glycin 460 in Kv7.1 zu einem Glutamat ausgetauscht (Kv7.1-G460E). In

dieser Arbeit ist bereits gezeigt worden, dass der Austausch an G460 zu Serin die Proteolyse von Kv7.1 beeinflussen kann (Abb. 33). Da das in Kv7.1-G460S eingebrachte Serin eine potentielle Phosphorylierungsstelle darstellt, wurde Kv7.1-G460S auch in diesem Kontext analysiert. Die Fragmentierung von Kv7.1-Y461E, Kv7.1-S464E, Kv7.1-S468E und Kv7.1-G460E zum CTF2 im Vergleich zu WT Kv7.1 wurde mittels Western Blots untersucht (Abb. 40).

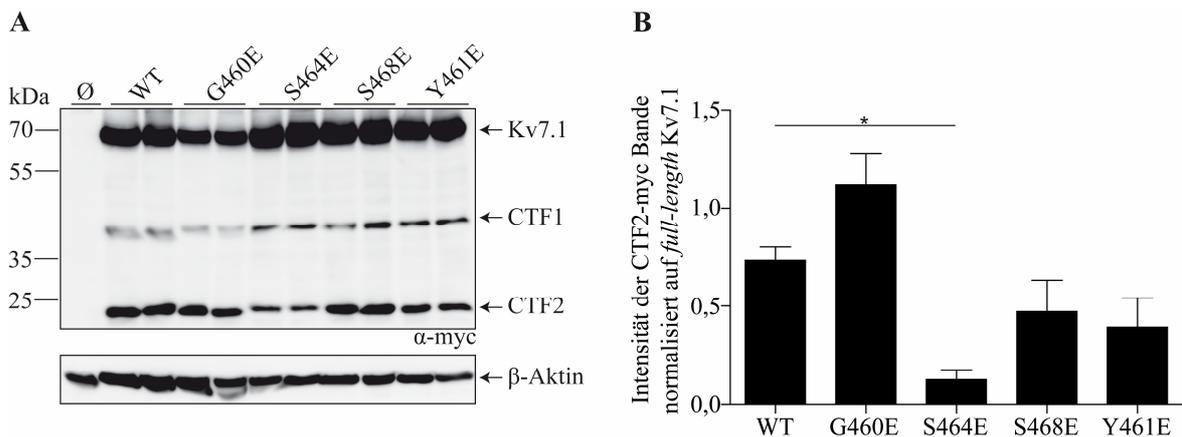


Abbildung 40: Putative Phosphorylierungsstellen an Kv7.1 können die Prozessierung zum CTF2-Fragment beeinflussen. (A) HeLa-Zellen wurden transient mit WT Kv7.1-myc (WT), Kv7.1-G460E (G460E), Kv7.1-S464E (S464E), Kv7.1-S468E (S468E) und Kv7.1-Y461E (Y461E) transfiziert und mittels Western Blot analysiert. Untransfizierte sowie WT Kv7.1 transfizierte Zellen dienen als Negativbeziehungsweise Positivkontrolle. Eins von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. (B) Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten der CTF2-Bandenintensität normalisiert auf den unprozessierten Kv7.1. Die Statistik wurde mittels *One-Way-Anova* gefolgt von Bonferroni's multiplen Vergleichstest ermittelt und die Signifikanz mit $p < 0,05$ definiert. * $0,01 \leq p < 0,05$. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2.

Die Analyse der potentiellen Phosphorylierungsmutanten von Kv7.1 im Western Blot zeigte das typische Bandenmuster für den WT Kv7.1. Bei einem Austausch von Serin 464 zu Glutamat (Kv7.1-G464E) wurde der Kanal im Vergleich zu WT Kv7.1 weniger zum CTF2 prozessiert. Es war eine Tendenz zu erkennen, dass beim Austausch von Glycin 460 auf Glutamat (Kv7.1-G460E) mehr CTF2 im Vergleich zu WT Kv7.1 abgeschnitten wurde. Zwar war bei Kv7.1-G460E die CTF2-Bande gegenüber der CTF2-Bande des WT Kv7.1 nicht verändert, aber gleichzeitig ist auch weniger unprozessierter Kv7.1 bei Kv7.1-G460E im Vergleich zu WT Kv7.1 zu detektieren. Demnach kann Kv7.1-G460E vermehrt zum CTF2 prozessiert werden. Somit können mögliche Phosphorylierungsstellen an der CTF2-Schnittstelle die Proteolyse von Kv7.1 beeinflussen.

Weiterführend sollte untersucht werden, ob die veränderte Proteolyse von Kv7.1, die durch eine solche mögliche Phosphorylierung ausgelöst wurde, die Kanalaktivität von Kv7.1 verändern. Daher wurden Kv7.1-G460E und Kv7.1-S464E in der Zwei-Elektrodenanschlussschaltung vermessen (Abb. 41).

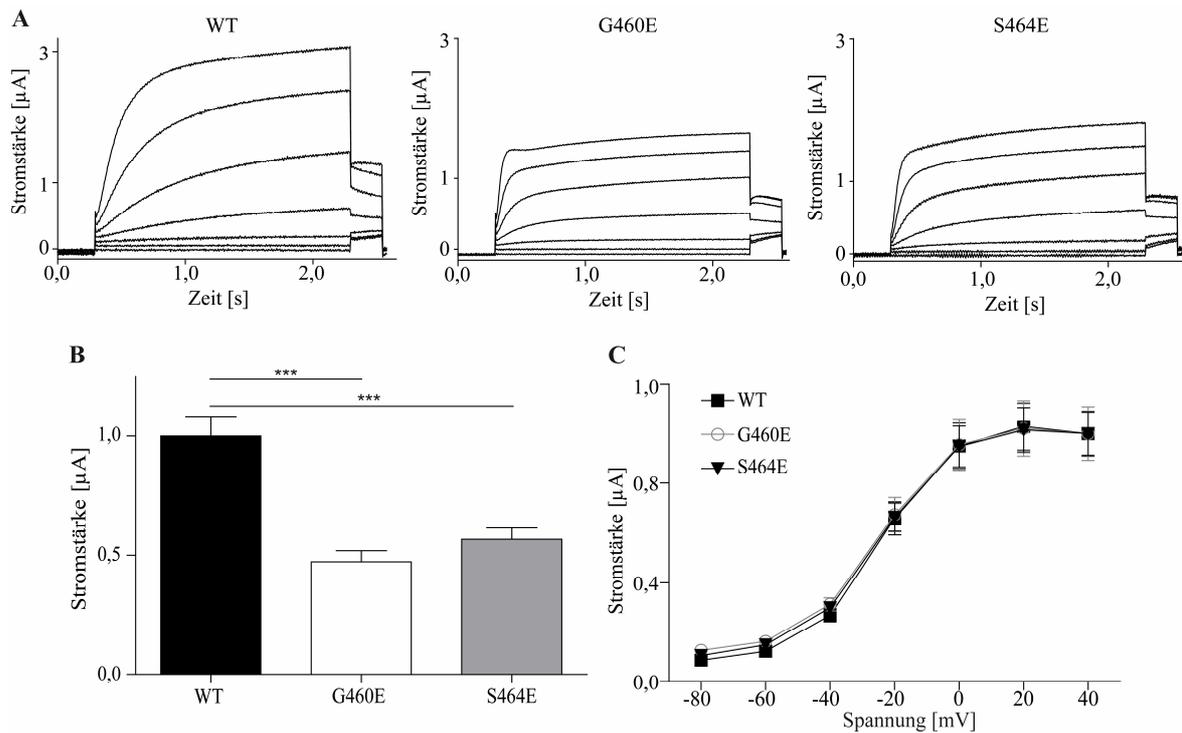


Abbildung 41: Zwei putative Phosphorylierungsstellen in Kv7.1 beeinflussen die Kanalfunktion von Kv7.1. (A) Repräsentative Stromkurven von WT Kv7.1 (WT) (n=36, links), Kv7.1-G460E (G460E) (n=18, mittig) und Kv7.1-S464E (S464E) (n=21, rechts). (B) *Steady-State*-Analyse von WT Kv7.1 (WT), Kv7.1-G460E (G460E) und Kv7.1-S464E (S464E). Alle Ströme wurden auf WT Kv7.1 bei 40 mV bei 2,0 Sekunden normalisiert. (C) *Tail-Current*-Analyse der normalisierten Ströme bei 40 mV bei 2,3 Sekunden von WT Kv7.1 (WT), Kv7.1-G460E (G460E) und Kv7.1-S464E (S464E).

In der makroskopischen Analyse der Stromkurven von WT Kv7.1 (WT), Kv7.1-G460E (G460E) und Kv7.1-S464E (S464E) war zu erkennen, dass die Stromstärken von Kv7.1-G460E und Kv7.1-S464E im Vergleich zu WT Kv7.1 vermindert waren. Weitere Effekte auf die Kanalfunktion von Kv7.1 durch die Mutation G460E oder S464E in Kv7.1 waren nicht zu bemerken (Abb. 41A). Dies bestätigte sich in den genaueren *Steady-State*- und *Tail-Current*-Analysen. Die *Steady-State*-Analyse bestätigte, dass die Ströme von Kv7.1-G460E und Kv7.1-S464E im Vergleich zu WT Kv7.1 circa halbiert waren (Abb. 41B). Es wurde keine zusätzliche Veränderung in der Kanalfunktion von Kv7.1-G460E und Kv7.1-S464E in der *Tail-Current*-Analyse bemerkbar (Abb. 41C). Demnach vermindert das Einfügen beider Glutamate an Position 460 beziehungsweise 464 in Kv7.1 lediglich den Kv7.1-vermittelten Kaliumausstrom. Weitere Veränderungen in der Kanalaktivität von Kv7.1 waren nicht zu notieren. Somit ist es möglich, dass Phosphorylierungen über die Proteolyse die Kanalfunktion von Kv7.1 beeinflussen können.

4.7. Amino-Terminal Enhancer of Split (AES) als neuer Interaktionspartner von Kv7.1

4.7.1. Validierung der Interaktion von Kv7.1 und AES

In den Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit wurde ein Hefeinteraktionsscreen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner des Kv7.1 durchgeführt. Dabei wurde als potentieller neuer Interaktionspartner des Kv7.1 der *Amino Terminal Enhancer of Split* (AES) beschrieben. Da AES ein Ko-Modulator von Transkriptionsfaktoren ist (s. 1.7.5.), könnte eine Interaktion von AES und Kv7.1 die genregulatorische Funktion des CTF2 vielleicht weiter charakterisieren.

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Interaktion von AES und Kv7.1 in Säugetierzellen validiert. Dafür wurde versucht, beide Proteine in HeLa-Zellen zu ko-immunopräzipitieren (Abb. 42).

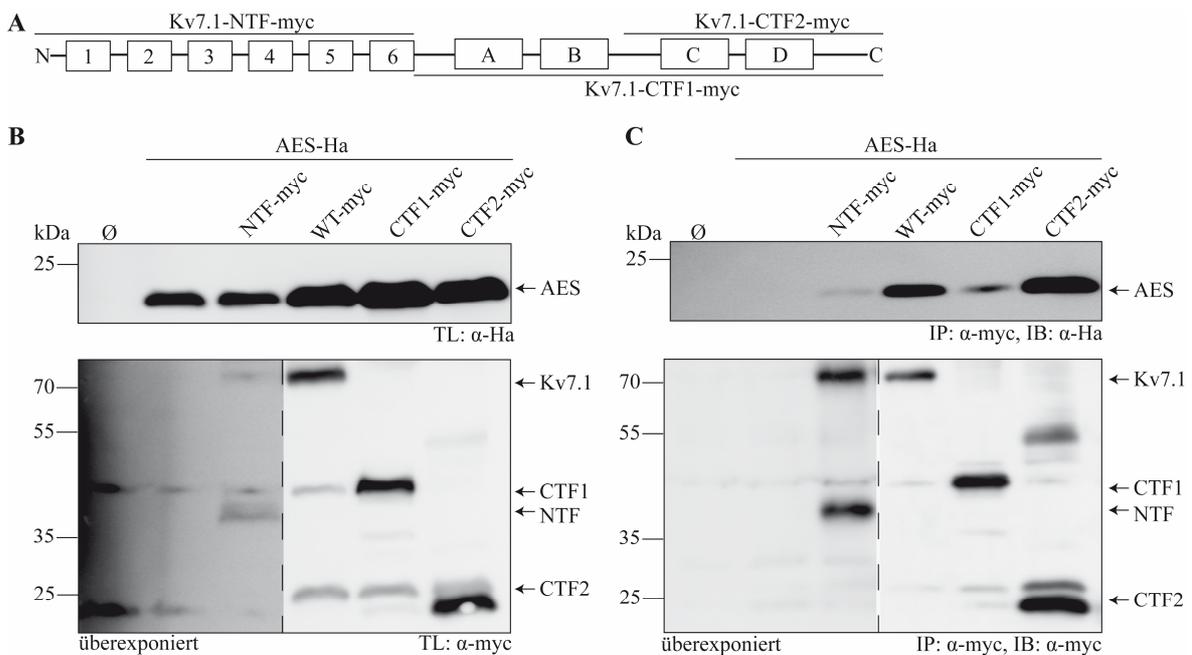


Abbildung 42: AES bindet Kv7.1 vor allem im C-Terminus von Kv7.1. (A) Übersicht zu den verschiedenen Kv7.1-Konstrukten. Die sechs Transmembrandomänen von Kv7.1 sind mit 1 – 6 und die vier C-terminalen Helices in Kv7.1 mit A – D markiert. NTF-myc hört mit L347 von Kv7.1 auf und CTF1-myc beginnt bei G348 von Kv7.1, während das CTF2-myc mit G460 von Kv7.1 startet. (B-C) HeLa-Zellen wurden transient mit AES-Ha, Kv7.1-NTF-myc (NTF-myc), WT Kv7.1-myc (WT-myc), Kv7.1-CTF1-myc (CTF1-myc) und Kv7.1-CTF2-myc (CTF2-myc) transfiziert und ko-immunopräzipitiert. Eine von drei repräsentativen Abbildungen ist gezeigt. B: Lysatkontrollen. C: Immunopräzipitate. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2. IB: Immunoblot. IP: Immunopräzipitation. TL: Totallysat.

In Abbildung 42B ist der Western Blot mit den Totallysaten der untransfizierten und mit AES-Ha, Kv7.1-NTF-myc, WT Kv7.1-myc, Kv7.1-CTF1-myc und Kv7.1-CTF2-myc transfizierten HeLa-Zellen gezeigt. AES war gleichmäßig in allen transfizierten HeLa-Zellen exprimiert. Eine veränderte Prozessierung des Kv7.1 bei Ko-Expression von AES

konnte nicht nachgewiesen werden, da wie gewohnt die unprozessierte Form von Kv7.1 (70 kDa), das CTF1 (40 kDa) und das CTF2 (25 kDa) im Totallysat detektiert wurde. Demnach nimmt AES keinen Einfluss auf die Proteolyse von Kv7.1. Die Konstrukte Kv7.1-CTF1-myc und Kv7.1-CTF2-myc exprimierten stark. Kv7.1-CTF2-myc zeigte im Western Blot zwei Banden, die beim CTF2-Fragment, das von Kv7.1 abgeschnitten wird, nicht auftraten. Kv7.1-NTF-myc repräsentiert den in der Membran befindlichen Teil von Kv7.1. Dieser enthält allen sechs Transmembrandomänen, ohne C-Terminus von Kv7.1 (Abb. 24A). Ohne den C-Terminus wird Kv7.1-NTF-myc stärker abgebaut, wodurch die Expression von Kv7.1-NTF-myc nur gut bei Überexposition des Western Blots zu bemerken war.

Die Immunopräzipitation aller gezeigten Kv7.1 Konstrukte mit einem anti-myc-Antikörper war erfolgreich (Abb. 42C). AES konnte bei Ko-Expression mit WT Kv7.1, Kv7.1-CTF1-myc und Kv7.1-CTF2-myc ko-präzipitiert werden, während Kv7.1-NTF-myc AES nicht präzipitierte. Somit liegt im C-Terminus von Kv7.1 eine mögliche Interaktionsstelle von AES und Kv7.1

Um eine mögliche Bindung von AES und Kv7.1 weiter zu untersuchen, wurden Immunofluoreszenzfärbungen von AES zusammen mit WT Kv7.1-myc, Kv7.1-CTF1-myc und Kv7.1-CTF2-myc in Cos 7-Zellen durchgeführt (Abb. 43).

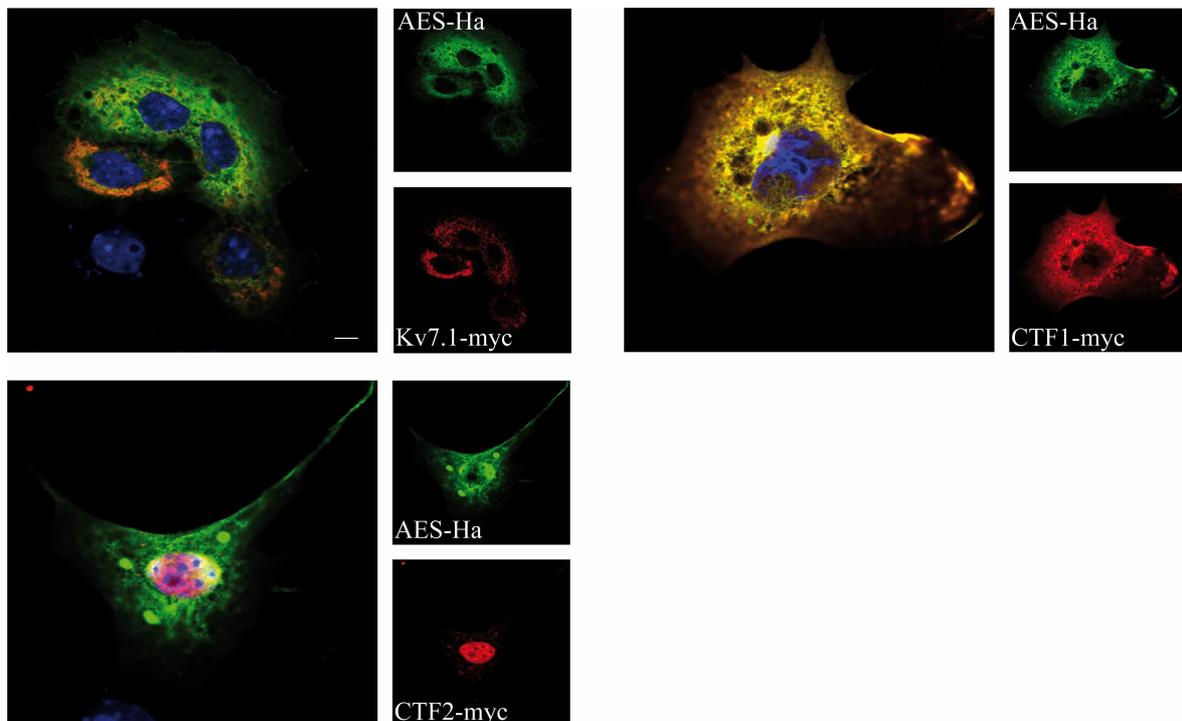


Abbildung 43: AES ko-lokalisiert mit WT Kv7.1, CTF1-myc von Kv7.1 und CTF2-myc von Kv7.1. Cos 7-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 12 Stunden später transient mit AES-Ha, Kv7.1-myc, Kv7.1-CTF1-myc (CTF1-myc) oder Kv7.1-CTF2-myc (CTF2-myc) transfiziert. Maßstab entspricht 5 μ m.

Die Immunofluoreszenzfärbung in Cos 7-Zellen zeigte eine Ko-Lokalisation von AES mit WT Kv7.1, Kv7.1-CTF1-myc und Kv7.1-CTF2-myc. AES zeigte eine diffuse Lokalisation in der Zelle. Die Ko-Färbung von AES und Kv7.1 war in Strukturen zu erkennen, die dem Endoplasmatischen Retikulum und/oder Golgi-Apparat ähnlich sehen. Kv7.1-CTF1-myc zeigte die stärkste Ko-Färbung mit AES. Die Ko-Lokalisation von AES mit Kv7.1-CTF2-myc ist am Rand des Zellkernes am stärksten ausgeprägt. Weiterhin blieb die subzelluläre Lokalisation von AES nach Expression mit Kv7.1-myc, Kv7.1-CTF1-myc oder Kv7.1-CTF2-myc gleich (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich veränderte auch Kv7.1-myc, Kv7.1-CTF1-myc oder Kv7.1-CTF2-myc ihre Lokalisation in der Zelle nicht nach Expression von AES (Daten nicht gezeigt). Somit scheint die Ko-Expression von AES und allen in Abbildung 43 gezeigten Kv7.1-Konstrukten keinen Einfluss auf die Lokalisation des jeweiligen Anderen zu haben. Insgesamt bewahrheitet sich die Assemblierung von AES und Kv7.1 im C-terminalen Teil von Kv7.1 zunächst nicht nur im Western Blot (Abb. 42), sondern auch in der Immunofluoreszenzfärbung (Abb. 43).

Es wurde gezeigt, dass die Bindung von AES an Kv7.1 vor allem am C-Terminus von Kv7.1 stattfindet (Abb. 42, 43). Da AES ein Ko-Modulator von Transkriptionsfaktoren ist (s. 1.7.5.), wurde zuerst angenommen, dass die Bindung von AES an Kv7.1 über ein LxxLL-Motiv in der zytoplasmatischen Helix D stattfindet. Dieses LxxLL-Motiv ist auch im CTF2-Fragment des Kv7.1 zu finden. LxxLL-Motive sind für Transkriptionsfaktoren bedeutend, da sie für die Funktion eines Transkriptionsfaktors wichtige Protein-Protein-Interaktionen mit Ko-Aktivatoren vermitteln. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion vom *nuclear receptor coactivator-1* und dem *homodimeric peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (McInerney et al., 1998; Plevin et al., 2005). Um einen möglichen Einfluss dieses LxxLL-Motives im CTF2-Fragment des Kv7.1 auf die Bindung an AES zu untersuchen, wurde das LxxLL-Motiv in Kv7.1-CTF2-myc deletiert (Kv7.1-CTF2- Δ LxxLL-myc). Daraufhin wurde versucht, AES mit Kv7.1-CTF2-myc und Kv7.1-CTF2- Δ LxxLL-myc zu ko-präzipitieren (Abb. 44).

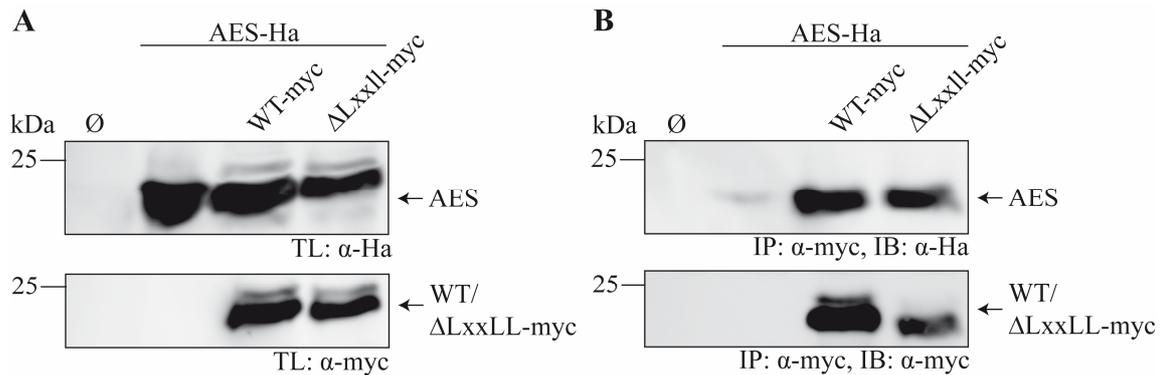


Abbildung 44: Das LxxLL-Motiv ist für die Bindung von AES an Kv7.1 unerheblich. HeLa-Zellen wurden transient mit AES-Ha und Kv7.1-CTF2-myc (WT-myc) oder Kv7.1-CTF2-ΔLxxLL-myc (ΔLxxLL-myc) transfiziert und 72 Stunden später ko-präzipitiert. Zur Kontrolle wurden untransfizierte und mit AES-Ha einzeln transfizierte Zellen mitgeführt. Ein repräsentativer von drei verschiedenen, unabhängigen Versuchen ist gezeigt. A: Lysatkontrollen. B: Immunopräzipitate. IB: Immunoblot. IP: Immunopräzipitation. TL: Totallysat.

Der Western Blot in Abbildung 44A zeigt die Totallysate der mit AES-Ha, Kv7.1-CTF2-myc (WT-myc) und Kv7.1-CTF2-ΔLxxLL-myc (ΔLxxLL-myc) exprimierenden HeLa-Zellen. Eine gleichmäßige Expression von AES-Ha, Kv7.1-CTF2-myc und Kv7.1-CTF2-ΔLxxLL-myc war gegeben. Die Präzipitation von Kv7.1-CTF2-myc und Kv7.1-CTF2-ΔLxxLL-myc mit einem anti-myc-Antikörper war erfolgreich, wobei AES mit Kv7.1-CTF2-myc und Kv7.1-CTF2-ΔLxxLL-myc ko-präzipitiert werden konnte (Abb. 44B). Eine schwache Bindung von AES an die *Dynabeads* war in der einzeln transfizierten Probe von AES zu erkennen. Dennoch ist der Anstieg der AES-Bande bei Ko-Expression von Kv7.1-CTF2-myc und Kv7.1-CTF2-ΔLxxLL-myc derartig stark, dass von einer erfolgreichen Ko-Präzipitation von AES mit Kv7.1-CTF2-myc und Kv7.1-CTF2-ΔLxxLL-myc ausgegangen werden darf. Somit ist das LxxLL-Motiv für die Bindung von Kv7.1 und AES unerheblich.

Viele Interaktionen im C-Terminus von Kv7.1 werden durch die zwei *Coiled-coil* Domänen in Helix C und Helix D von Kv7.1 bestimmt (Abb. 3). Daher wurde auch überprüft, ob die Struktur der Helix C und Helix D in Kv7.1 für die Bindung von AES an Kv7.1 bedeutend sind. Dafür wurden Punktmutationen in Kv7.1 in die intrazelluläre Helix C (L559P) und Helix D (L602P) in Kv7.1 eingeführt. Der Austausch von Lysin zu Prolin bedingt ein Aufbrechen der helikalen Struktur der zytoplasmatischen Helix C und Helix D von Kv7.1, wie man anhand der *Coiled-coil* Wahrscheinlichkeiten von WT Kv7.1, Kv7.1-L559P, Kv7.1-L602P und Kv7.1-L559P-L602P erkennen kann (Abb. 45).

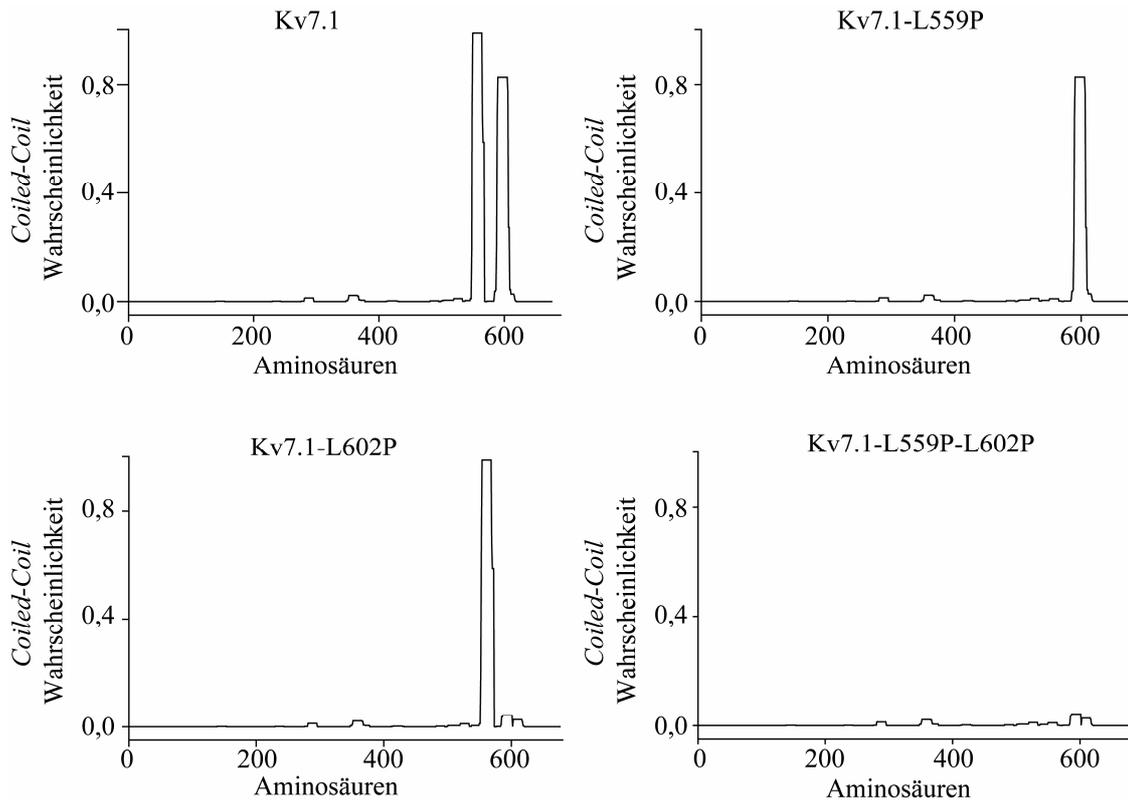


Abbildung 45: Coiled-Coil Wahrscheinlichkeit von WT Kv7.1, Kv7.1-L559P, Kv7.1-L602P und Kv7.1-L559P-L602P. Die Coiled-coil Wahrscheinlichkeiten von Kv7.1, Kv7.1-L559P, Kv7.1-L602P und Kv7.1-L559P-L602P wurden mittels Coils Server 2.0 berechnet.

Die Struktur der zytoplasmatischen Helix C und Helix D von Kv7.1 wurde durch das Einführen von Prolin an Position 559 (Helix C) und Position 602 (Helix D) verändert. Deswegen wurde nun charakterisiert, ob diese helikalen Strukturen in Kv7.1 die Interaktion mit AES bedingen. Zur vereinfachten Analyse wurden die Proline an Position 559 und Position 602 in Kv7.1-CTF2-myc eingeführt (Abb. 23). Es wurde dann versucht, AES mit Kv7.1-CTF2, Kv7.1-CTF2-L559P, Kv7.1-CTF2-L602P und Kv7.1-CTF2-L559P-L602P zu ko-präzipitieren (Abb. 46).

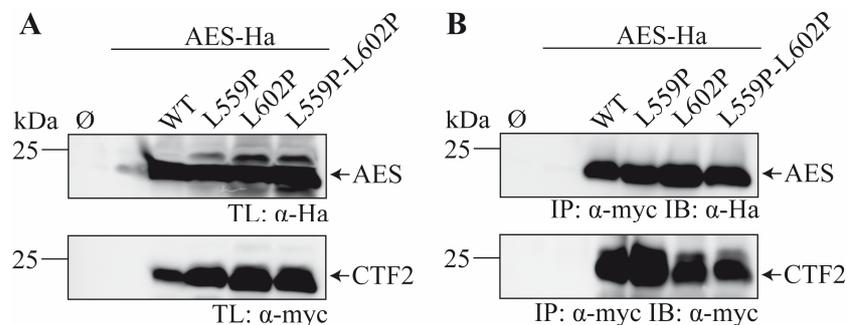


Abbildung 46: Die Struktur der Helix C und der Helix D von Kv7.1 haben keinen Einfluss auf die Interaktion von AES und Kv7.1. HeLa-Zellen wurden transient mit AES, Kv7.1-CTF2 (WT), Kv7.1-CTF2-L559P (L559P), Kv7.1-CTF2-L602P (L602P) und Kv7.1-CTF2-L559P-L602P (L559P-L602P) transfiziert und 72 Stunden später ko-präzipitiert. Untransfizierte und AES einzeln transfizierte Zellen dienten zur Negativkontrolle. Einen repräsentative von drei unabhängigen Abbildungen ist gezeigt. A: Lysatkontrollen. B: Immunopräzipitate. IB: Immunoblot. IP: Immunopräzipitation. TL: Totallysat.

In Abbildung 46A ist der Western Blot mit den Totallysaten der untransfizierten und der mit AES-Ha, Kv7.1-CTF2, Kv7.1-CTF2-L559P, Kv7.1-CTF2-L602P und Kv7.1-CTF2-L559P-L602P exprimierenden HeLa-Zellen gezeigt. Für alle Kv7.1-Konstrukte war eine angemessene Expression im Totallysat in den transfizierten HeLa-Zellen vorhanden. AES war in der Einzeltransfektion der HeLa-Zellen nur schwach exprimiert. Bei Ko-Transfektion von AES mit den Kv7.1-Konstrukten konnte eine starke Expression von AES festgestellt werden. Die Präzipitation von Kv7.1-CTF2, Kv7.1-CTF2-L559P, Kv7.1-CTF2-L602P und Kv7.1-CTF2-L559P-L602P mit einem anti-myc-Antikörper war erfolgreich und führte zur Ko-Präzipitation von AES mit allen verwendeten Kv7.1-Konstrukten (Abb. 46B). Demnach hat die Struktur der C-terminalen Helix C und Helix D in Kv7.1 keinen Einfluss auf die Bindung von AES an Kv7.1.

Nachdem die Bindung von AES an Kv7.1 nicht genauer im C-terminalen Teil von Kv7.1 eingegrenzt werden konnte, wurde versucht, die Bindung von AES an Kv7.1 auf bestimmte Bereiche von AES einzuschränken. Da AES aus drei Bereichen besteht: einer Glutamin-reichen Domäne, einer Glycin/Prolin-reichen Domäne sowie einer nukleären Lokalisationsequenz (Abb. 47A), wurden zwei Mutanten von AES konstruiert. Bei der ersten Mutante (AES- Δ GP) wurde die Glycin/Prolin-reiche Domäne in AES deletiert (Abb. 47A). Bei der zweiten Mutante (AES- Δ CCN) wurde die nukleäre Lokalisationssequenz aus AES herausgenommen (Abb. 47A). Daraufhin wurde die Ko-Immunopräzipitation von WT AES, AES- Δ GP und AES- Δ CCN mit Kv7.1-CTF2-myc (Abb. 23) durchgeführt (Abb. 47B).

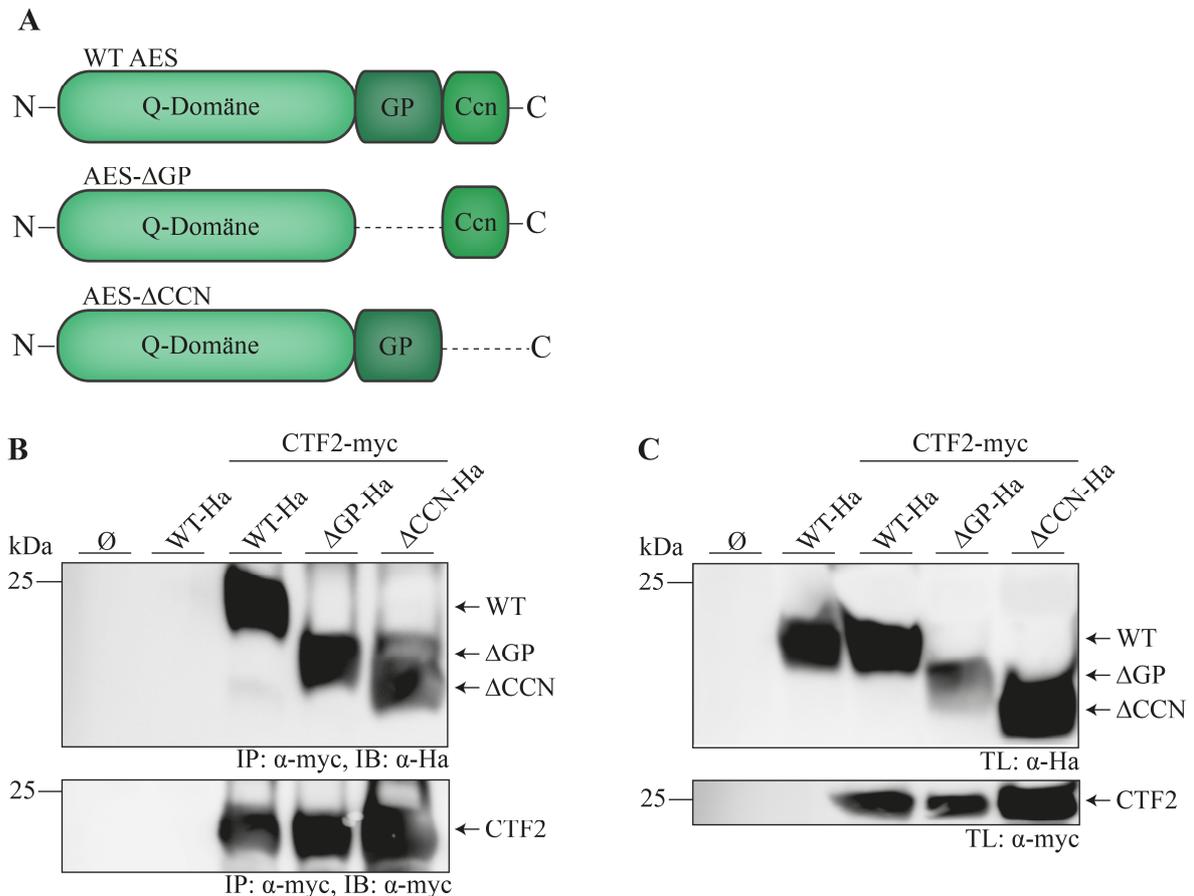


Abbildung 47: Kv7.1 bindet AES in der Glutamin-reichen Domäne von AES. (A) Schematische Übersicht der verschiedenen AES-Mutanten. WT AES besteht aus einer Glutamin (Q)-reichen Domäne, einer Glycin/Prolin (GP)-reichen Domäne und aus einer nukleären Lokalisationsequenz (CCN). Die GP-reiche beziehungsweise die nukleäre Lokalisationssequenz (CCN) wurden in AES- Δ GP beziehungsweise AES- Δ CCN deletiert. (B-C) Hek 293 T-Zellen, welche das Kv7.1-CTF2-myc (CTF2-myc) Konstrukt stabil exprimieren, wurden transient mit WT AES-Ha (WT), AES- Δ GP-Ha (Δ GP), AES- Δ CCN (Δ CCN) transfiziert und anschließend ko-immunopräzipitiert. Zur Negativkontrolle wurden untransfizierte und AES-Ha einzeln transfizierte Zellen mitgeführt. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten wird gezeigt. B: Lysatkontrollen. C: Immunopräzipitate. IB: Immunoblott. IP: Immunopräzipitation. TL: Totallysat.

In Abbildung 47B ist der Western Blot mit den Totallysaten dargestellt. Der Western Blot der Totallysate zeigte die erfolgreiche Expression von WT AES, AES- Δ GP und AES- Δ CCN in den mit Kv7.1-CTF2-myc stabil transfizierten Hek 293 T-Zellen. Die Immunopräzipitation von Kv7.1-CTF2-myc mit einem anti-myc-Antikörper war erfolgreich, wobei WT AES, AES- Δ GP und AES- Δ CCN mit Kv7.1-CTF2-myc ko-immunopräzipitiert werden konnten (Abb. 47C). Demnach erfolgt die Bindung von AES an Kv7.1 möglicherweise über die Glutamin-reiche Domäne.

Weiterführend sollte der Einfluss der nukleären Lokalisationsequenz in AES auf die subzelluläre Lokalisation von AES analysiert werden. Dafür wurden Hela-Zellen mit WT AES und der AES-Mutante, die keine nukleäre Lokalisationssequenz mehr besitzt (AES-

ΔCCN), transient transfiziert und diese Zellen in Zytoplasma und Zellkern fraktioniert (Abb. 48).

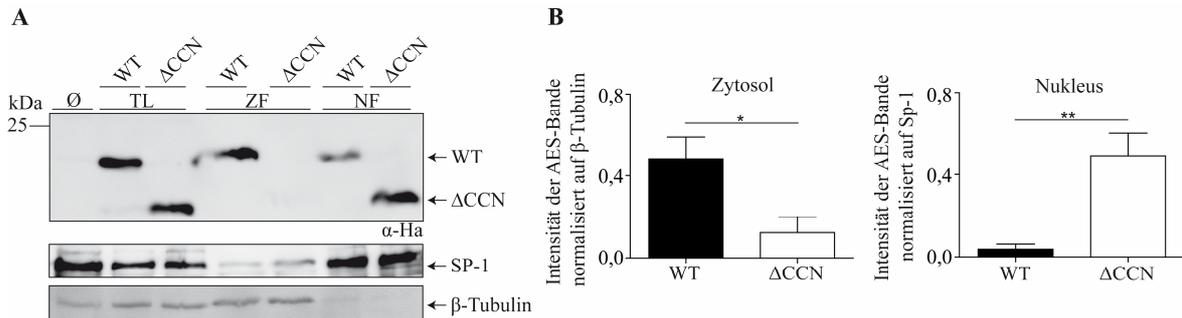


Abbildung 48: Die nukleäre Lokalisationssequenz in AES reguliert die Kernlokalisierung von AES. (A) HeLa-Zellen wurden transient mit WT AES-Ha (WT) und AES-ΔCCN-Ha (ΔCCN) transfiziert und 72 Stunden später in Totallysat (TL), zytosolische Fraktion (ZF) und Kernfraktion (NF) aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen mittels Western Blot untersucht. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. (B) Densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten der WT AES (WT)- und AES-ΔCCN (ΔCCN)-Banden normalisiert auf β-Tubulin (Zytosol; links) oder Sp-1 (Nukleus, rechts). Ein repräsentatives von vier unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die Statistik wurde mittels unpaarigem einseitigem *student's t*-Test durchgeführt und mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. ** $0,001 \leq p < 0,01$. * $0,01 \leq p < 0,05$.

WT AES und AES-ΔCCN waren im Totallysat gleichmäßig exprimiert. Die Deletion der nukleären Lokalisationssequenz von AES führte zu einer verstärkten Expression von AES im Zellkern, während die Expression im Zytoplasma abnahm. Somit hat die nukleäre Lokalisationssequenz in AES scheinbar einen dominant negativen Einfluss auf die Translokation von AES.

Um zu verifizieren, dass AES ohne nukleäre Lokalisationssequenz (AES-ΔCCN) vermehrt in den Zellkern translozieren kann, wurden zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung von AES und AES-ΔCCN in Cos7-Zellen durchgeführt (Abb. 49).

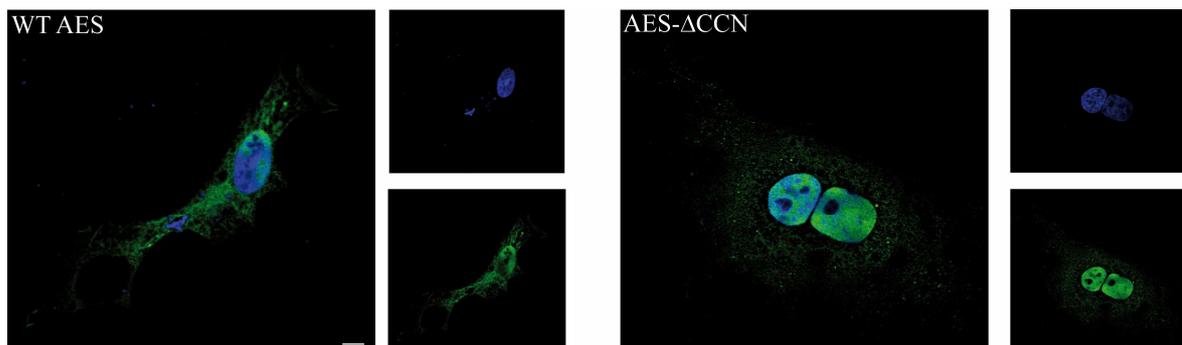


Abbildung 49: AES-ΔCCN ist im Vergleich zu WT AES vermehrt im Zellkern zu finden. Cos7-Zellen wurden transient mit WT AES und AES-ΔCCN transfiziert und 48 Stunden später mit der unter 2.2.2.14. beschriebenen Methode gefärbt und visualisiert. Der Maßstab entspricht 5 μm.

Die Immunfluoreszenzfärbung der Cos7-Zellen zeigte, dass WT AES im Zellkern und in der Peripherie der Zelle zu sehen war. Durch die Deletion der nukleären Lokalisationssequenz (AES-ΔCCN) konnte AES vermehrt im Zellkern und vermindert im Zytoplasma detektiert werden. Demnach bestätigt sich die Western Blot Analyse (Abb. 49). Es

kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die veränderte Translokation nach Deletion der nukleären Lokalisationssequenz ein Artefakt der Überexpression ist. Gleichzeitig besteht auch die Möglichkeit, dass durch die Deletion der nukleären Lokalisationssequenz AES anders gefaltet wird, was eine erhöhte Expression im Zellkern bedingen könnte.

4.7.2. Funktionelle Analyse der Interaktion von AES und Kv7.1

Nachdem gezeigt worden ist, dass Kv7.1 und AES miteinander interagieren, sollte der Einfluss von AES auf die Kanalfunktion von Kv7.1 mit der Zwei-Elektrodenspannungsklemme in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht werden.

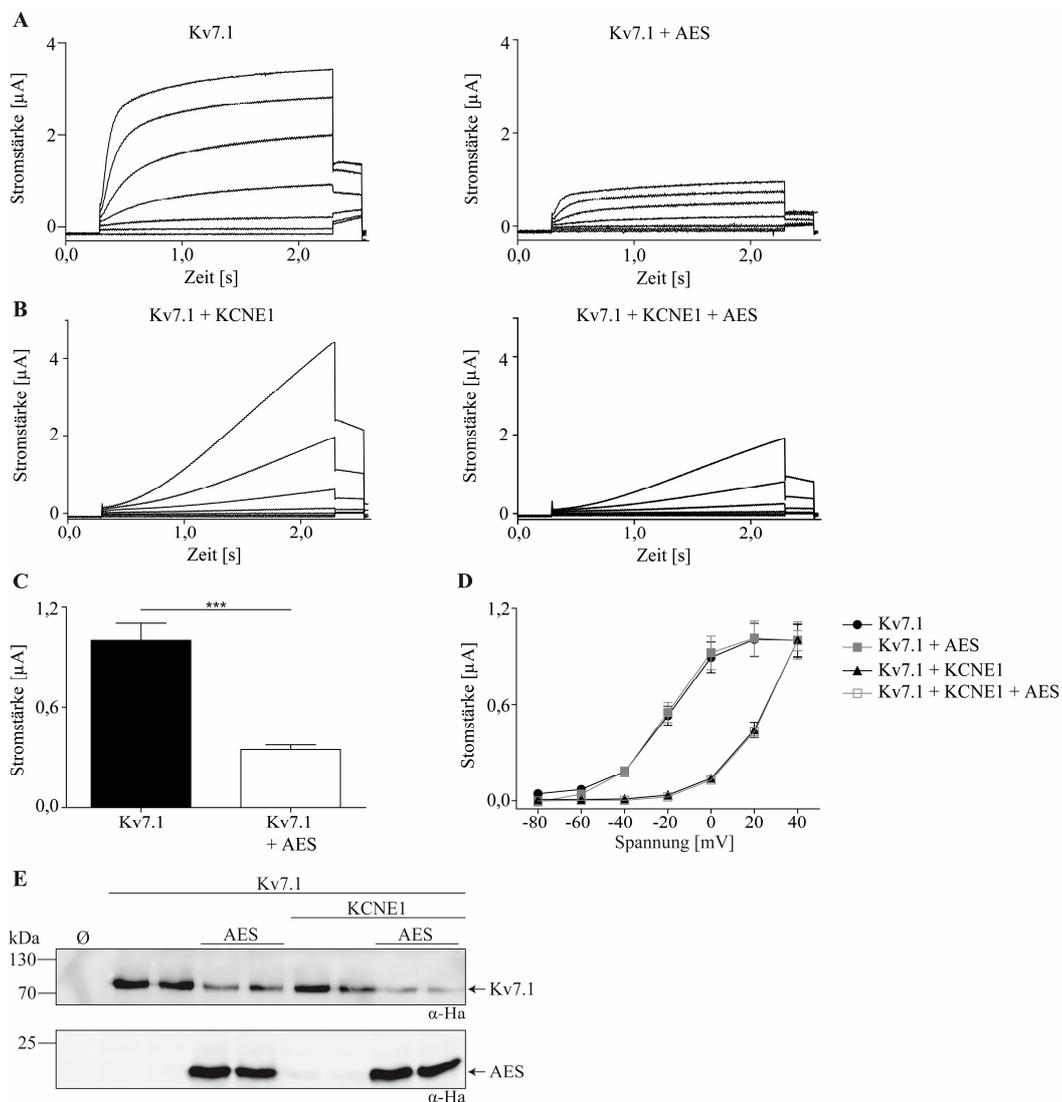


Abbildung 50: Einfluss von AES auf die Kanalfunktion von Kv7.1. (A) Repräsentative Stromkurven von Kv7.1 alleine (n = 14, links) oder mit AES (n = 14, rechts) ko-exprimiert. (B) Repräsentative Stromkurven von Kv7.1 und KCNE1 alleine (n = 15, links) oder mit AES (n = 17, rechts) ko-exprimiert. (C) *Steady-State*-Analyse von Kv7.1, Kv7.1 und AES, Kv7.1 und KCNE1, Kv7.1 und KCNE1 und AES der bei 40 mV und 2,0 Sekunden normalisierten Ströme von Kv7.1 beziehungsweise Kv7.1 und KCNE1. (D) *Tail-Current*-Analyse der normalisierten Ströme bei 40 mV und 2,3 Sekunden von Kv7.1, Kv7.1 und AES, Kv7.1 und KCNE1 beziehungsweise Kv7.1 und KCNE1 und AES. (E) Western Blot der analysierten *Xenopus laevis* Oozyten.

Die Analyse der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme von Kv7.1 mit AES zeigte, dass AES die Stromkurven von Kv7.1 senkt. Weitere Veränderung der Stromkurven von Kv7.1 bei Ko-Injektion mit AES war nicht zu notieren (Abb. 50A). Die durch AES bedingte Reduktion der Stromkurven von Kv7.1 war auch bei Ko-Expression von KCNE1 mit Kv7.1 und AES zu erkennen (Abb. 50B). Die Reduktion des Kaliumflusses von Kv7.1 durch AES bewahrheitete sich auch in der *Steady-State*-Analyse (Abb. 50C). In der *Tail-Current*-Analyse war zu erkennen, dass AES neben der Reduktion der Stromkurven keinen weiteren Effekt auf die Kanalfunktion von Kv7.1 ausübte. Die Ko-Expression mit KCNE1 veränderte diesen Phänotyp nicht (Abb. 50D). Die verwendeten *Xenopus laevis* Oozyten wurden hinsichtlich der Expression von AES und Kv7.1 im Western Blot überprüft (Abb. 50E). Dabei zeigte Kv7.1 bei Ko-Expression mit AES eine schwächere Expression im Vergleich zu den mit Kv7.1 einzeln injizierten Oozyten. Eine verminderte Expression von Kv7.1 unter AES-Ko-Expression könnte die Reduzierung der Stromkurven von Kv7.1 bei gemeinsamer Expression mit AES erklären. Da diese Expressionsunterschiede aber nur in *Xenopus laevis* Oozyten auftraten, kann nicht geklärt werden, ob AES einen Einfluss auf die Kanalfunktion von Kv7.1 nimmt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass AES und Kv7.1 am CTF2 von Kv7.1 interagieren. Eine Funktion dieser Assemblierung war nicht zu klären.

4.8. Prozessierung von Kv7.1 zum CTF1

4.8.1. Ein GSGF-Motiv in Kv7.1 könnte für die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF1 kritisch sein

Soweit ist in dieser Doktorarbeit vor allem die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2 untersucht worden. Dennoch wird Kv7.1 auch zum CTF1 gespalten (Abb. 13). Das CTF1-Fragment von Kv7.1 ist circa 40 kDa groß (Abb. 13), was ungefähr dem gesamten C-Terminus von Kv7.1 entspricht. Demnach könnte das CTF1-Fragment von Kv7.1 den kompletten C-Terminus von Kv7.1 einschließen. Daher wurden zur ersten Charakterisierung der CTF1-Schnittstelle von Kv7.1 verschiedene Bereiche am Anfang des C-Terminus deletiert (Abb. 51A). Diese Trunktationsmutanten von Kv7.1 wurden im Western Blot auf die Prozessierung zum CTF1-Fragment untersucht (Abb. 51B).

A

WT S6
 N-[...]-PAGIL-GSGFALKVQ-QRKHFNR-[...]-C
 Δ348-356
 N-[...]-PAGIL-.....-QRKHFNR-[...]-C
 Δ348-351
 N-[...]-PAGIL-.....ALKVQ-QRKHFNR-[...]-C
 Δ352-356
 N-[...]-PAGIL-GSGF.....-QRKHFNR-[...]-C

B

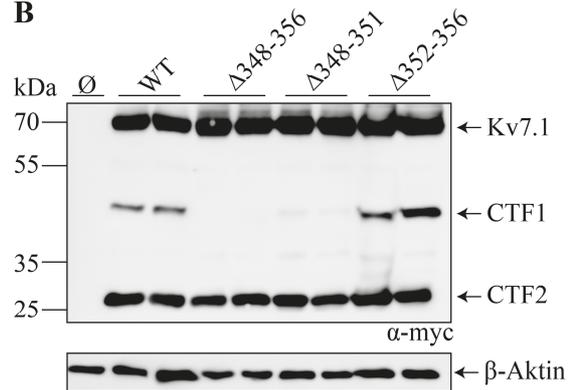


Abbildung 51: Die Schnittstelle zum CTF1 von Kv7.1 liegt in einem GSGF-Motiv direkt im Anschluss an die sechste Transmembrandomäne. (A) Schematische Übersicht zu WT Kv7.1-myc (WT), Kv7.1-Δ348-356-myc (Δ348-356), Kv7.1-Δ348-351-myc (Δ348-351) und Kv7.1-Δ352-356-myc (Δ352-356). (B) WT Kv7.1-myc, Kv7.1-Δ348-356-myc, Kv7.1-Δ348-351-myc und Kv7.1-Δ352-356-myc wurden in HeLa-Zellen exprimiert und mittels Western Blot untersucht. Zur Kontrolle wurden mit WT Kv7.1 transfizierte und untransfizierte Zellen mitgeführt. Es wird eine repräsentative Abbildung aus drei verschiedenen unabhängigen Versuchen gezeigt. CTF1: C-Terminales Fragment 1. CTF2: C-Terminales Fragment 2. S6: sechste Transmembrandomäne.

Die Western Blot Analyse ergab das typische Bandenmuster des WT Kv7.1. Die Trunkation der Aminosäuren G348 – Q356 (Kv7.1-Δ348-356) zeigte keine Prozessierung zum CTF1 von Kv7.1. Wenn in Kv7.1 nur G348 – F351 (Kv7.1-Δ348-351) deletiert wurden, war der Schnitt zum CTF1 auch nicht mehr erkennbar. Die Trunkation von Kv7.1 um A352 – Q356 (Kv7.1-Δ352-356) dagegen zeigte wieder die Prozessierung des Kv7.1 zum CTF1-Fragment. Alle Trunkationsmutanten von Kv7.1 wurden auch zum CTF2 prozessiert. Somit konnten die Aminosäuren G348 – F351 in Kv7.1 (Kv7.1-Δ348-351) für die Proteolyse zum CTF1 als kritisch detektiert werden.

Um nun die Schnittstelle zum CTF1-Fragment von Kv7.1 am GSGF-Motiv in Position 348 – 351 genauer zu untersuchen, wurde ein Alanin-Scan in Position 348 – 351 in Kv7.1 durchgeführt. Dabei wurde jede dieser vier Aminosäuren (GSGF) zu einem Alanin ausgetauscht. Diese Kv7.1-Konstrukte wurden dann in Hek 293 T-Zellen exprimiert und mittels Western Blot untersucht (Abb. 52).

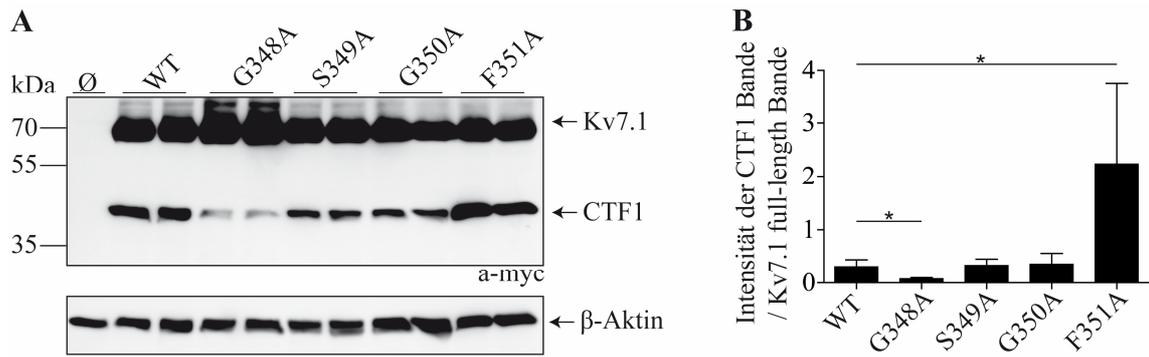


Abbildung 52: Die CTF1-Schnittstelle von Kv7.1 kann nicht auf eine einzelne Aminosäure eingeschränkt werden. (A) Western Blot der mit WT Kv7.1-myc (WT), Kv7.1-G348A-myc (G348A), Kv7.1-S349A-myc (S349A), Kv7.1-G350A-myc (G350A) und Kv7.1-F351A-myc (F351A) transfizierten Hek 293 T-Zellen. Untransfizierte und mit WT Kv7.1 (WT) transfizierte Zellen dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Eine repräsentative Abbildung von sechs verschiedenen unabhängigen Versuchen ist gezeigt. (B) Densitometrische Auswertung von sechs verschiedenen unabhängigen Analysen der CTF1-Bande von Kv7.1 normalisiert auf die Bande für das unprozessierte Kv7.1. Die Statistik wurde mittels Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunn's multiplen Vergleichstest ermittelt, nachdem mit drei verschiedenen Tests festgestellt wurde, dass keine Normalverteilung vorliegt. Signifikanz wurde ab $p < 0,05$ definiert. * $0,01 \leq p < 0,05$. CTF1: C-Terminales Fragment 1.

Die Western Blot Analyse ergab das typische Bandenmuster des WT Kv7.1. Weiterhin führte lediglich der Austausch von G348 zu Alanin in Kv7.1 zu einer signifikanten Reduktion der CTF1-Bande. Zusätzlich zeigte Kv7.1-F351A im Vergleich zu WT Kv7.1 eine vermehrte Prozessierung zum CTF1. Dennoch zeigte keine der untersuchten Kv7.1-Mutanten einen vollständigen Verlust des CTF1-Fragmentes. Demnach scheint eher das gesamte GSGF-Motiv in Kv7.1 für die Prozessierung zum CTF1 wichtig zu sein.

Um nach der verantwortlichen Protease, die das CTF1 von Kv7.1 abspaltet, zu suchen, wurde die Merops-Datenbank genutzt (Rawlings et al., 2014). Dennoch konnte keine Protease definiert werden, die eine ähnliche Sequenz, wie sie in Kv7.1 zum CTF1 gefunden wurde, bevorzugt. Daher sollte die Schnittstelle zum CTF1 von Kv7.1 genauer charakterisiert werden, indem natürlich vorkommende Mutationen in der Nähe der potentiellen CTF1-Schnittstelle untersucht wurden. Als zu untersuchende Mutationen wurden dafür S349W und S349P in Kv7.1 ausgesucht (Boulet et al., 2007; Horr et al., 2011; Oberai et al., 2009). Zusätzlich wurde auch das Glycin an Position 350 in Kv7.1 zu einem Arginin verändert, um auch den Einfluss einer positiv geladenen Aminosäure in der Nähe der CTF1-Schnittstelle in Kv7.1 zu untersuchen.

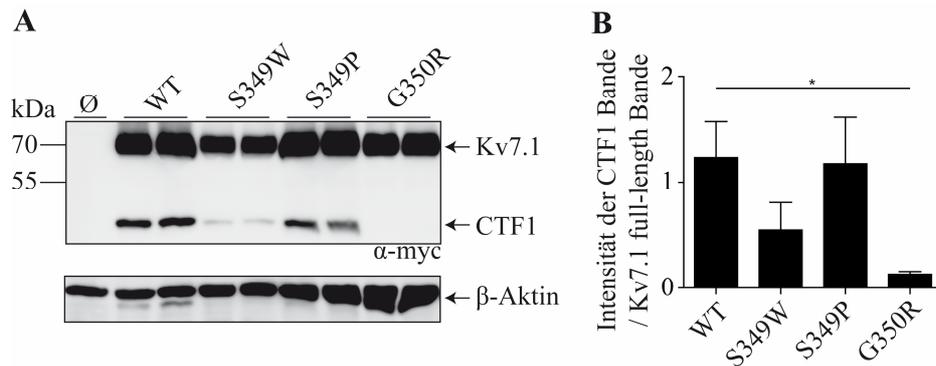


Abbildung 53: Natürlich vorkommende Mutationen in Kv7.1 können die Proteolyse von Kv7.1 beeinflussen. (A) WT Kv7.1-myc (WT), Kv7.1-S349W-myc (S349W), Kv7.1-S349P-myc (S349P) und Kv7.1-G350R-myc (G350R) wurden transient in Hek 293 T-Zellen transfiziert und mittels Western Blot analysiert. Untransfizierte und mit WT Kv7.1 (WT) transfizierte Zellen dienten zur Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. (B) Densitometrische Analyse von drei unabhängigen Versuchen der Bandenintensität des CTF1 von Kv7.1 normalisiert auf die 70 kDa Bande des Kv7.1. Statistik wurde mittels *One-Way-Anova*-Test gefolgt von Dunn's multiplem Vergleichstest ermittelt. Die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ angesetzt. * $0,01 \leq p < 0,05$. CTF1: C-Terminales Fragment 1.

Im Western Blot war das typische Bandenmuster des Kv7.1 zu erkennen. Kv7.1-S349W zeigte im Vergleich zu WT Kv7.1 eine leichte Reduktion des CTF1-Fragmentes, während Kv7.1-G350R gegenüber WT Kv7.1 sogar eine signifikante Reduktion der CTF1-Bande aufwies. Kv7.1-S349P zeigte im Vergleich zu WT Kv7.1 keine veränderte Proteolyse zum CTF1. Keine der getesteten Kv7.1-Mutanten besaß in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme noch eine Kanalaktivität (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die so gewonnenen Erkenntnisse über die CTF1-Schnittstelle mit der Merops-Datenbank, so erhält man als mögliche Proteasen, die für den Schnitt zum CTF1 in Kv7.1 verantwortlich sein könnten, Chemotrypsin, Pepsin, Proteinase K und Thermolysin.

4.8.2. Die Proteolyse von Kv7.1 zum CTF1 inaktiviert Kv7.1

Nachdem analysiert wurde, dass das GSGF-Motiv für den Schnitt zum CTF1-Fragment von Kv7.1 bedeutend ist, wurde der Einfluss des CTF1-Schnittes auf die Kanalfunktion von Kv7.1 analysiert. Dafür wurden die Mutanten Kv7.1-G348A und Kv7.1-F351A aus dem Alanin-Scan auf ihre Kanalaktivität überprüft. Beide waren die einzigen Mutanten von Kv7.1, die eine veränderte Proteolyse zum CTF1-Fragment im Alanin-Scan gezeigt hatten (Abb. 52). Die Analyse in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme beider Kv7.1-Mutanten zeigte stark veränderte Ströme (Abb. 54, 55).

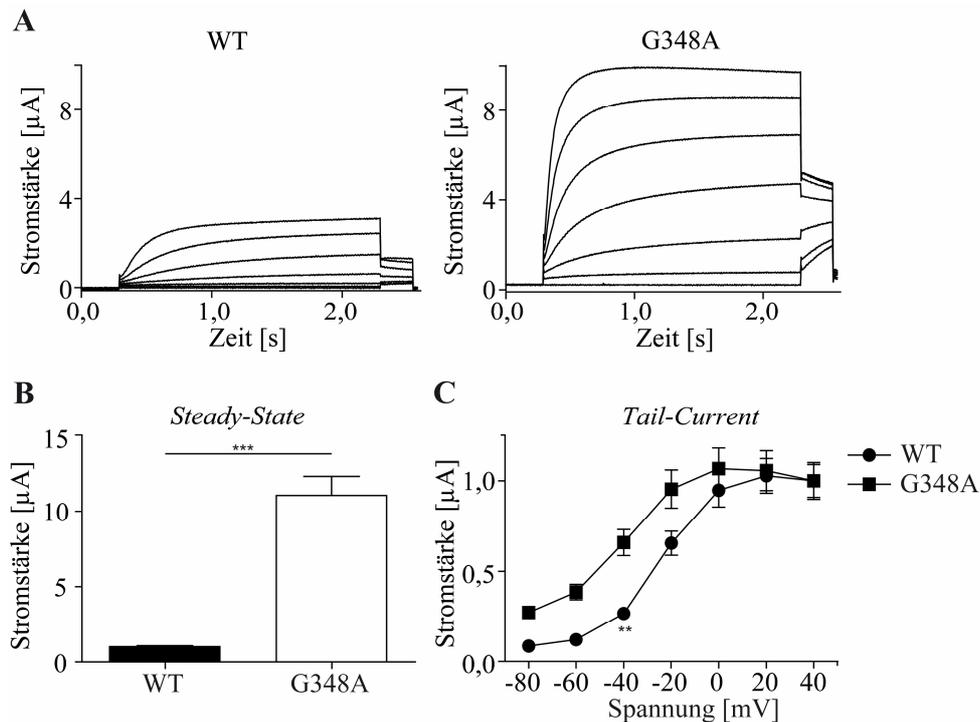


Abbildung 54: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme der G348A-Mutante von Kv7.1. (A) Charakteristische Stromkurven von WT Kv7.1 (WT) (n = 36, links) und Kv7.1-G348A (G348A) (n = 18, rechts). (B) *Steady-State*-Analyse der auf WT Kv7.1 normalisierten Ströme bei 2,0 Sekunden und 40 mV von Kv7.1 WT (WT) und Kv7.1-G348A (G348A). Die Statistik wurde mittels unpaarigem zweiseitigem *student's t*-Test ermittelt. (C) *Tail-Current*-Analyse der normalisierten Ströme bei 2,3 Sekunden von WT Kv7.1 (WT) und Kv7.1-G348A (G348A). Die Statistik wurde mittels *Two-Way*-Anova gefolgt vom Bonferonni's Posttest ermittelt und Signifikanz galt in allen Tests ab $p < 0,05$. ** $0,001 \leq p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Der Vergleich der Stromkurven von WT Kv7.1 und Kv7.1-G348A zeigte, 1) dass die G348A-Mutation in Kv7.1 im Vergleich zu WT Kv7.1 zu erhöhten Strömen führte und 2) eine schnellere Aktivierung von Kv7.1-G348A am Anfang der Klemme bei circa 0,4 Sekunden im Vergleich zu WT Kv7.1 zu erkennen war (Abb. 54A). Um die Analyse der Stromkurven weiter zu verifizieren, wurde zunächst die *Steady-State*-Analyse herangezogen. Diese Analyse von Kv7.1-G348A bestätigte die circa zehnfache Erhöhung der Stromkurven im Vergleich zu WT Kv7.1 (Abb. 54B). Der zweite Punkt, der bei der Betrachtung der Stromkurven von WT Kv7.1 und Kv7.1-G348A auffiel, war eine Aktivierung des Kv7.1-G348A im Vergleich zu WT Kv7.1 bei niedrigerer Spannung. Die Aktivierung von Kv7.1-G348A im Vergleich zu WT Kv7.1 wurde über die *Tail-Current*-Analyse weiter charakterisiert. Diese Analyse ergab eine Verlagerung der Stromkurven der G348A-Mutante gegenüber WT Kv7.1 nach links (Abb. 54C). Demnach würde Kv7.1-G348A schon bei niedrigerer Spannung Kalium aus der Zelle strömen lassen. Um weiter zu verifizieren, dass Kv7.1-G348A gegenüber WT Kv7.1 bei niedrigerer Spannung öffnet, wurde die halbmaximale Aktivierung von WT Kv7.1 und Kv7.1-G348A berechnet. Die halbmaximale Aktivierung gibt an, bei welcher Spannung 50 % des zu untersuchenden Kanals geöffnet sind (analog einer IC_{50} eines Inhibitors). Diese halbmaximale Aktivierung

erniedrigte sich bei Kv7.1-G348A von $-25 \pm 0,87$ mV (WT Kv7.1) auf $-39,36 \pm 0,53$ mV (Kv7.1-G348A). Fasst man die *Steady-State*- und *Tail-Current*-Analyse von Kv7.1-G348A zusammen, so kann man schließen, dass die G348A-Mutante von Kv7.1 im Vergleich zu WT Kv7.1 schon bei niedrigerer Spannung öffnet und dabei mehr Kalium aus der Zelle schleust.

Da auch Kv7.1-F351A ein verändertes Proteolyseverhalten zum CTF1 im Vergleich zu WT Kv7.1 zeigte (Abb. 52), wurde diese Kv7.1-Mutante bezüglich der Kanalaktivität in der Zwei-Elektrodenanschlussschleife untersucht (Abb. 55).

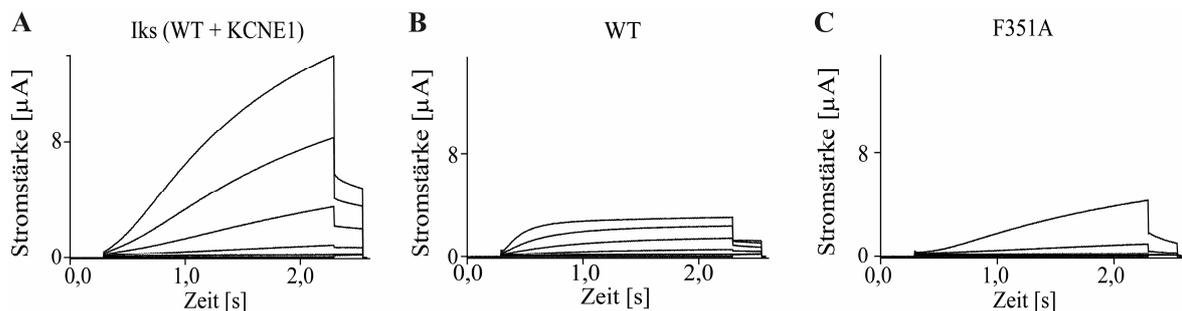


Abbildung 55: Zwei-Elektrodenanschlussschleife der F351A-Mutante von Kv7.1. (A) Charakteristische Stromkurven des Iks-Stromes, welcher von WT Kv7.1 (WT) und KCNE1 gebildet wird. (n = 52). (B) Charakteristische Ströme von WT Kv7.1 (WT) (n = 36). (C) Charakteristische Ströme von Kv7.1-F351A (F351A) (n = 9).

Der Iks-Strom, welcher von WT Kv7.1 und KCNE1 gebildet wird, zeigte seine charakteristischen Stromkurven (Abb. 55A) (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). Gegenüber WT Kv7.1 (ohne KCNE1) ist der Iks-Strom durch eine verlangsamte Aktivierung und erhöhte Stromkurven gekennzeichnet (Abb. 55B) (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). Überraschenderweise zeigte Kv7.1-F351A das gleiche Aktivierungsmuster wie der Iks-Strom (Abb. 55C). Dennoch waren die Stromkurven von Kv7.1-F351A genauso niedrig wie die Stromkurven von WT Kv7.1. Demnach imitiert Kv7.1-F351A den Iks-Strom, zeichnet sich aber über verminderte Stromkurven im Vergleich zum Iks-Strom aus.

Kv7.1-G348A und Kv7.1-F351A zeigten eine veränderte Prozessierung zum CTF1 sowie eine veränderte Kanalfunktion. Somit inaktiviert der Schnitt zum CTF1 die Kanalfunktion von Kv7.1.

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Proteolyse des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv7.1 weiter zu charakterisieren. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass Kv7.1 zu zwei C-terminalen Fragmenten (CTF1 und CTF2) prozessiert werden kann. In dieser Arbeit standen die funktionelle Charakterisierung der Caspasen-abhängigen Proteolyse zum CTF2, sowie die Untersuchung der Proteolyse des Kv7.1 zum CTF1 im Vordergrund.

5.1. Kv7.1 wird von mehreren Caspasen zum CTF2 prozessiert.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Kv7.1 am Aspartat 459 zum CTF2 geschnitten wird (s. 4.1.). Weiterführend wurde gezeigt, dass Caspase-1, -2, -3, -7 und -8 den Kv7.1 zum CTF2 prozessieren können. Demnach scheinen diverse Caspasen für die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2 verantwortlich zu sein. Initiatorcaspasen, wie Caspase-2 und -8, sind in der Lage, Effektorcaspasen, wie Caspase-3 und -7, zu aktivieren. Somit erhöht sich nach Expression von Initiatorcaspasen nicht nur die Aktivität dieser Caspasen, sondern auch die Aktivität von Effektorcaspasen (Grutter, 2000). Demnach kann für Caspase-2 und -8 nicht geklärt werden, ob sie den Anstieg an CTF2-Prozessierung nach Expression direkt vermitteln. Alternativ können Caspase-2 und -8 auch eine vermehrte Proteolyse von Kv7.1 vermitteln, indem sie andere Caspasen aktivieren, welche dann Kv7.1 prozessieren. Es kann aber geschlossen werden, dass zumindest Caspase-1, -3 und -7 den Kv7.1 schneiden.

Diese Erkenntnisse sind aber aus Überexpressionsstudien gewonnen worden. Durch Überexpression von Proteasen können Effekte derartig verstärkt werden, dass sie *in vitro* detektierbar sind, aber sich *in vivo* nicht verifizieren lassen. In den Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit ging klar hervor, dass endogen exprimierte Caspasen den Kv7.1 zum CTF2 hydrolysieren können. Welche Caspase(n) für den Schnitt zum CTF2 in Kv7.1 *in vivo* verantwortlich ist (sind), muss noch genauer untersucht werden.

Es gibt auch andere Substrate, die von mehreren Caspasen geschnitten werden (Grutter, 2000). Das bekannteste Beispiel für ein derartiges Caspase-Substrat ist die Poly [ADP-Ribose] Polymerase 1 (PARP-1) (Grutter, 2000). Betrachtet man die Caspase-Schnittstelle in Kv7.1 (Abb. 56), so ist festzustellen, dass Entzündungs-, Initiator- und Effektorcaspasen in der Lage sein sollten, den Kv7.1 zu prozessieren.



Abbildung 56: Übersicht zur Schnittstelle des CTF2 in Kv7.1.

Entzündungscaspasen bevorzugen an ihrer Schnittstelle ein Aspartat in P1-Position und eine Raum einnehmende Aminosäure in P4-Position. Dies ist beim Kv7.1 mit D459 (P1) und F456 (P4) gegeben. Effektorcaspasen nutzen DEXD-Motive in ihren Substraten, wobei nur das Aspartat in P1-Position kritisch ist (Grutter, 2000). Auch dies ist an der Schnittstelle zum CTF2 in Kv7.1 vorhanden. Initiatorcaspasen schneiden an (I/V/L)EXD-Motiven und benötigen zwingend ein Aspartat in P1-Position. In P4-Position bedarf es lediglich einer Raum einnehmenden Aminosäure. Dies ist an der Schnittstelle zum CTF2 mit F456 und D459 der Fall.

Somit stellt die Schnittstelle zum CTF2 im Kv7.1 eine Caspaseschnittstelle dar, die von allen Gruppen der Caspasen erkannt werden kann.

5.2. *In vivo* Prozesse, bei denen die Proteolyse von Kv7.1 wichtig sein könnte.

Die Proteolyse von Kv7.1 sollte dann von Bedeutung sein, wenn aktive Caspasen vorhanden sind. Da in dieser Arbeit vor allem die funktionelle Bedeutung der Proteolyse analysiert wurde, wurden Modelle genutzt, bei denen Caspasen aktiviert werden sollten. Dafür wurden als Modelle Entzündungsreaktionen, Apoptose, Alterung von Zellen und pro-arrhythmogene Mutationen von Kv7.1 untersucht (Grutter, 2000; Merkle et al., 2007; Pollack et al., 2002). Dabei wurde festgestellt, dass die Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2 in einem Zellalterungsmodell vermehrt stattfindet. Dieser Anstieg an Proteolyse beeinträchtigt aber auch die Kanalfunktion von Kv7.1, was wiederum Herzarrhythmien auszulösen vermag (Abb. 57).

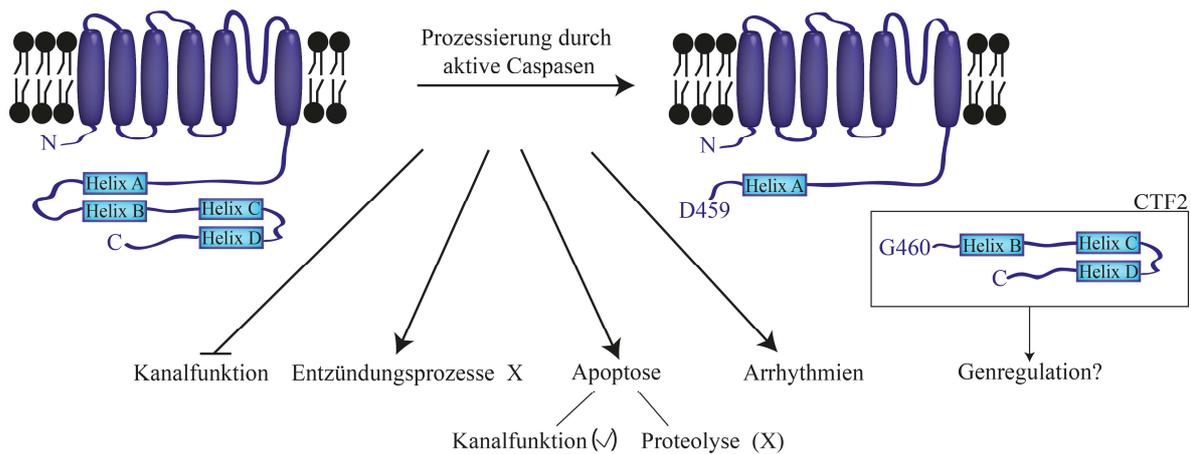


Abbildung 57: Übersicht zur Funktion der Proteolyse des Kv7.1.

5.2.1. Entzündungsreaktionen und die Proteolyse von Kv7.1

Es konnte gezeigt werden, dass Kv7.1 während Entzündungsprozessen wahrscheinlich nicht verändert prozessiert wird (s. 4.2.). Um dies zu untersuchen, wurde ein Mausmodell genutzt, bei dem Mäuse mit dem Coxsackie B-Virus (CBV) infiziert wurden (Brunetti, DeSantis, 2008; Goudevenos et al., 1990; Hori et al., 1981; Joy et al., 1990; Karavidas et al., 2011; Spotnitz, Lesch, 2006). Durch die Injektion mit CBV-Viren wird unter anderem eine Entzündung des Herzens hervorgerufen. Deswegen wird eine CBV-Injektion als gängiges Mausmodell für Myokarditis genutzt. Um zu überprüfen, ob eine Entzündung in den Herzen der verwendeten Mäuse stattgefunden hatte, wurde die Aktivierung der Caspase-1 in diesen Herzlysaten untersucht. Caspase-1 ist bekannt dafür, bei Inflammationsreaktionen im Herzen aktiviert zu werden. Dabei wird die Proform zu den aktiven Formen prozessiert (Merkle et al., 2007). Mittels Western Blot konnte aber weder die Proform der Caspase-1 noch die aktiven Formen bei 15 und 10 kDa detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Demnach konnte experimentell nicht gezeigt werden, dass durch die Injektion mit CBV in diesen Mäusen überhaupt eine Entzündungsreaktion auftrat.

Es ist aber bekannt, dass Kv7.1 unter CBV-Infektion vermehrt an die Plasmamembran transportiert wird. Dies kann zu einem potentiell pro-arrhythmogenen Anstieg der Kanalfunktion von Kv7.1 führen (Steinke et al., 2013). Dieser Anstieg an Kanalaktivität von Kv7.1 wird durch ein verändertes Phosphorylierungsmuster des Kv7.1 ausgelöst (Marx et al., 2002). Wo diese Phosphorylierungen an Kv7.1 vorgenommen werden, ist von Marx und Kollegen nicht untersucht worden. Wenn aber Kv7.1 während einer Myokarditis verstärkt phosphoryliert wird, könnten diese Phosphorylierungen am Kv7.1 dessen Proteolyse möglicherweise behindern. Dies muss in weiteren Mausstudien

untersucht werden. Erst dann kann sicher geschlossen werden, ob Kv7.1 während Entzündungsprozessen verändert prozessiert wird.

5.2.2. Mögliche, veränderte Prozessierung von Kv7.1 im Alter

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Kv7.1 in gealterten, apoptotischen Hek 293 T-Zellen vermehrt zum CTF2 prozessiert wird (s. 4.4.). Die Alterung wurde *in vitro* durch die Expression von Progerin ausgelöst (Coutinho et al., 2009; Miller et al., 2013). Dabei war es auffällig, dass Progerin alleine nicht ausreichte, um Apoptose zu stimulieren. Progerin ist aber bekannt dafür, Zellen in den Zelltod zu treiben (Miller et al., 2013). Dafür bedarf Progerin aber aktives p53 (Jung et al., 2013), welches Hek 293 T-Zellen nicht exprimieren (Fu et al., 2010). Somit ist es möglich, dass durch die fehlende Aktivierung von p53 in den verwendeten Hek 293 T-Zellen keine Apoptose über Progerin ausgelöst werden konnte. Dennoch zeigten die erhöhte Caspase-3-Aktivität, sowie der Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezien, dass Progerin zu einer Alterung der Hek 293 T-Zellen geführt hatte.

In vivo könnte die veränderte Prozessierung des Kv7.1 während der Alterung des Herzens von Bedeutung sein. Apoptose steigt im Alter an (Condorelli et al., 2001; Li et al., 2002; Merkle et al., 2007; Pollack et al., 2002; Yang et al., 1998). Wann immer aber Apoptose in Zellen ausgelöst wird, werden auch Caspasen aktiviert. Sobald Caspasen aktiv sind, wird der Kv7.1 zum CTF2 prozessiert. Somit könnte durch den Anstieg an Apoptose in gealterten Kardiomyozyten Kv7.1 stärker zum CTF2 fragmentiert werden (Abb. 58). Während der Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2 geht die Kanalaktivität von Kv7.1 verloren (Doktorarbeit C. Raab). Wenn aber Kv7.1 in gealterten Kardiomyozyten weniger aktiv ist, wird der, dem Kv7.1 zu Grunde liegende, Iks-Strom (Abb. 1) im gealterten Herzen vermindert sein. Dies sollte dann wiederum zu einer vermehrten Inzidenz von Herzarrhythmien führen (Abb. 58). Es ist nicht geklärt, ob der Kv7.1-abhängige Iks-Strom im Alter vermindert ist. Dafür ist aber bekannt, dass zumindest Herzarrhythmien im Alter vermehrt auftreten (Gonzalez et al., 2003; Li et al., 2002; Piccirillo et al., 2013). Ob der altersabhängige Anstieg an Arrhythmien durch Kv7.1 oder gar seiner Proteolyse vermittelt wird, muss noch untersucht werden.

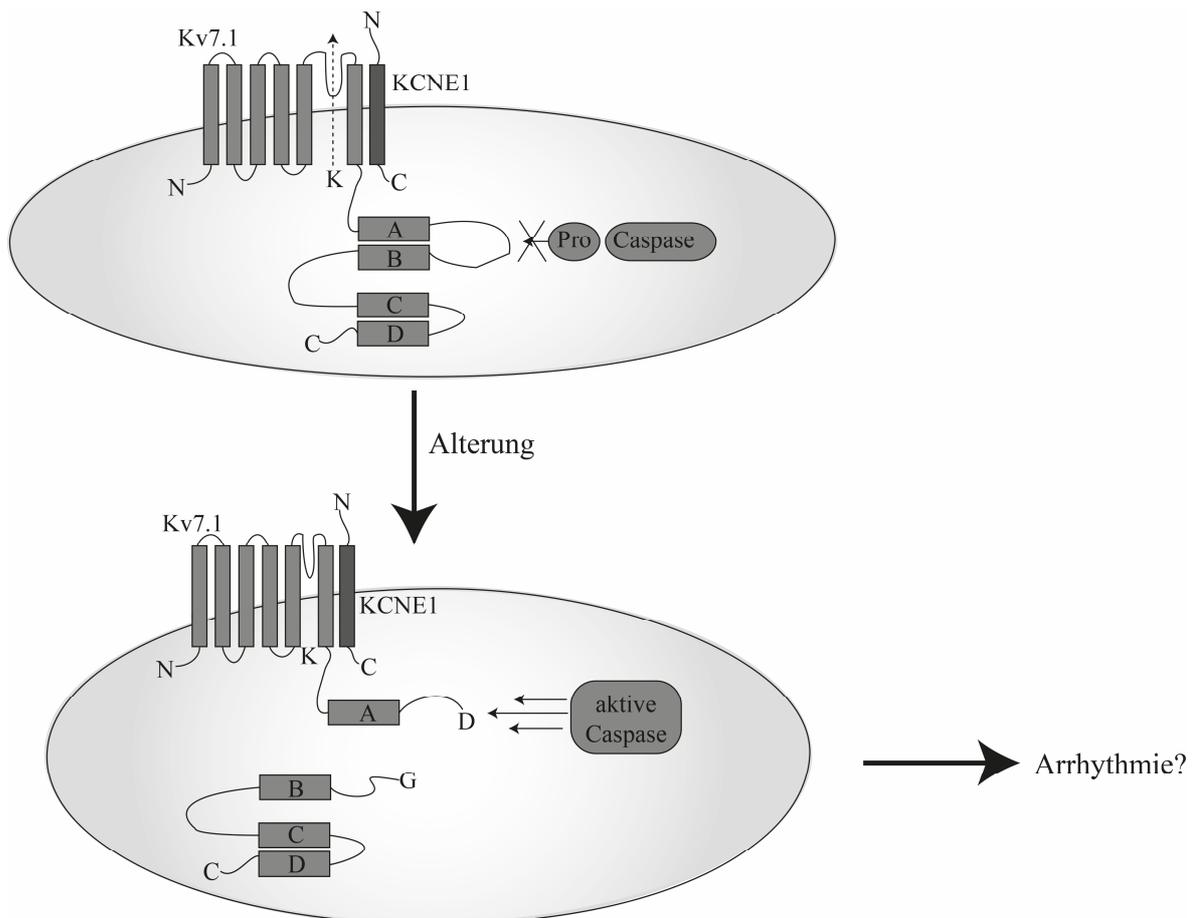


Abbildung 58: Übersicht zum Einfluss der Alterung auf die Proteolyse des Kv7.1. In einer Kardiomyozyte folgt auf Depolarisation ein Kv7.1-vermittelter Kaliumausfluss. Dabei assembliert Kv7.1 mit vier KCNE1-Untereinheiten, die hier repräsentativ mit einem Beispiel gezeigt sind. Altert die Zelle, so werden Caspasen aktiviert, die den Kv7.1 zum CTF2prozessieren. Daraufhin geht die Kanalfunktion des Kv7.1 verloren, was möglicherweise Arrhythmien auslöst.

5.2.3. Kv7.1 könnte über seine Prozessierung zum CTF2 Herzarrhythmien auslösen

Long-QT syndrome kann durch Mutationen in Kv7.1 ausgelöst werden. Wenn aber die Proteolyse Kv7.1 inaktiviert, könnte eine veränderte Fragmentierung von Kv7.1 Herzarrhythmien auslösen. Um zu untersuchen, ob die Prozessierung des Kv7.1 Herzarrhythmien auslösen kann, wurden verschiedenen Kv7.1-Mutanten hinsichtlich ihrer Proteolyse betrachtet. Dabei zeigten die von Arnestad und Crotti beschriebenen Kv7.1-Varianten Kv7.1-G460S und Kv7.1-A372D (Arnestad et al., 2007; Crotti et al., 2012) eine veränderte Proteolyse zum CTF2 (s. 4.5.).

Kv7.1-A372D wurde im Vergleich zu WT Kv7.1 nur eingeschränkt zum CTF2prozessiert. Weiterführend resultierte der Austausch am Alanin 372 zu Aspartat in Kv7.1 in einem Verlust der Calmodulinbindung. Das Aspartat 372 liegt zwei Aminosäuren vor dem für die

Calmodulinbindung entscheidenden IQ-Motiv. Es ist weiterhin für Kv7-Familienmitglieder bekannt, dass geladene Aminosäuren in der Nähe dieses IQ-Motives die Bindung an Calmodulin aufheben (Etxeberria et al., 2008; Wen, Levitan, 2002; Yus-Najera et al., 2002). Daher kann davon ausgegangen werden, dass das negativ geladene Aspartat an Position 372 in Kv7.1-A372D die Bindung an Calmodulin verhindert. Damit scheint die fehlende Calmodulinbindung die Proteolyse des Kv7.1 zu beeinflussen. Dies hebt weiterhin hervor, dass die Calmodulinbindung die Prozessierung des Kv7.1 beeinflussen kann.

Kv7.1-G460S zeigte eine vermehrte Proteolyse zum CTF2 sowie eine verminderte Kanalaktivität gegenüber WT Kv7.1. Arnestad und Kollegen beschrieben die Kv7.1-Mutation G460S und haben einen ähnlichen Phänotyp bezüglich der Kanalaktivität, wie in dieser Arbeit gezeigt, vermessen (Arnestad et al., 2007). Demnach erscheint es möglich, dass die vermehrte Proteolyse von Kv7.1-G460S einen veränderten Herzrhythmus ausgelöst hat. Somit könnte die Proteolyse von Kv7.1 die Pathogenität von klinisch beschriebenen Kv7.1-Mutationen bedingen.

5.2.4. Einfluss von Kv7.1 auf Apoptose

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass Kv7.1 eine funktionelle Rolle in der Apoptose einnimmt (s. 4.3.1.). Kv7.1 fördert über seine Kanalaktivität leicht Apoptose. Viele spannungsabhängige Kaliumkanäle, wie Kv1.3 oder Kv11.1, sind dafür bekannt, proapoptotisch zu sein. Sie lassen Zellen am Anfang der Apoptose schrumpfen (apoptotische Volumenreduktion) (Dallaporta et al., 1998; Duranton et al., 2010; Felipe et al., 2006; Lang et al., 2000; Lang et al., 2005; Maeno et al., 2000; Shimizu et al., 2007; Szabo et al., 2010; Wang et al., 2002a; Wang et al., 2008), was für die Durchführung des programmierten Zelltodes unabdinglich ist. Auch Duranton und Kollegen zeigten 2010 in einer Nierenzelllinie, dass Kv7.1 mittels seines Kaliumausflusses pro-apoptotisch ist. Sie untersuchten auch, dass Kv7.1 die apoptotische Volumenreduktion mit vermittelt (Duranton et al., 2010). Somit bestätigen die Versuche dieser Arbeit die Experimente von Duranton und Kollegen. Demnach verantwortet Kv7.1 während der Apoptose das Schrumpfen der Zelle. Insgesamt scheint Kv7.1 aber eine untergeordnete Rolle in der Ausführung der Apoptose zu spielen. Kv7.1-bedingte Änderungen der Apoptoseraten waren nach Blockierung oder Aktivierung der Kanalfunktion von Kv7.1 eher gering.

Kv7.1 nimmt aber vermutlich mit seinem Kaliumausstrom nur für eine kurze Zeit Einfluss auf Apoptose. Sobald Caspasen in einer apoptotischen Zelle aktiv werden, wird der Kv7.1 prozessiert und die Kanalfunktion durch die Proteolyse inhibiert. Da die Kanalaktivität von Kv7.1 Apoptose beeinflusst, kann Kv7.1 Apoptose nur fördern, wenn er unprozessiert vorliegt. Demnach kann Kv7.1 nur vor der Aktivierung der Caspasen für Apoptose benötigt werden. Somit scheint die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2 während der Apoptose einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus darzustellen.

Es ist aber in dieser Arbeit nicht analysiert worden, ob die pro-apoptotische Funktion von Kv7.1 *in vivo* eine Rolle spielt. Die von Duranton und Kollegen publizierte Daten, sowie die Untersuchungen in dieser Arbeit, wurden nur mit Überexpressionsstudien durchgeführt. In keiner Publikation mit Kv7.1-defizienten Mäusen ist der Einfluss von Kv7.1 auf Apoptose untersucht worden. Dennoch gibt es Hinweise, dass Kv7.1 auch *in vivo* eine Rolle in der Apoptose spielen kann. Than und Kollegen zeigten 2014, dass Kv7.1-defiziente Mäuse, welche durch eine weitere heterozygote Deletion von *adenomatous polyposis coli* (APC) spontan Adenome im Dünndarm entwickeln (Grodin et al., 1991; Moser et al., 1990), mehr Tumore ausbilden (Than et al., 2014). Tumore können aber nur überleben, wenn Apoptose vermindert wird (Plati et al., 2008; Reed, 1999; Su et al., 2013). Damit könnte die erhöhte Tumoranzahl auf eine pro-apoptotische Funktion des Kv7.1 hinweisen. Than und Kollegen untersuchten und/oder diskutierten nicht, ob in den Kv7.1-defizienten Tumoren Apoptose vermindert war.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das CTF2-Fragment von Kv7.1 Apoptose kaum beeinflussen kann. Das CTF2-Fragment von Kv7.1 ist in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und dort die Expression von BAX und BAK zu vermindern. Die Regulation von BAX und BAK über das CTF2-Fragment von Kv7.1 ist aber in einer Zelllinie gezeigt worden, die das CTF2-Fragment stabil exprimiert. Demnach spiegelt die Expression des CTF2-Fragmentes in dieser Zelllinie nicht die natürlichen Gegebenheiten der Prozessierung wider. Das CTF2-Fragment von Kv7.1 entsteht erst in einer Zelle, die beginnt zu sterben oder zu altern. In sterbenden Zellen wird dann auch der Zellkern durch Caspasen aufgelöst und die DNA abgebaut (Faleiro, Lazebnik, 2000; Kamada et al., 2005; Luo et al., 2010; Qin et al., 2001; Ramuz et al., 2003; Tinnikov, Samuels, 2013). Daraufhin wird das CTF2-Fragment von Kv7.1 aus dem Nukleus entlassen. Dies zeigt sich in der verminderten Expression von Kv7.1-CTF2-myc im Zellkern nach sechs Stunden Staurosporinbehandlung (s. 4.3.2.). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass das

CTF2-Fragment in einer sterbenden Zelle wenig Einfluss auf Apoptose oder die Expression von BAX und BAK nehmen kann. Die Zeitspanne für eine effektive Regulation vom CTF2 auf die Expression von BAX und BAK ist vermutlich zu kurz.

Damit das CTF2-Fragment von Kv7.1 die Expression von BAX und BAK beeinflussen kann, müsste es länger als in einer sterbenden Zelle exprimiert werden. Dies könnte *in vivo* nur in den *zombie-like* Kardiomyozyten der Fall sein (Boyle et al., 2011; Moorjani et al., 2006; Narula et al., 2006; Yang et al., 2013). Diese Kardiomyozyten zeigen Zeichen von Apoptose, da Caspasen in diesen Kardiomyozyten aktiv sind. Dennoch kommt es zu keinem Sterben dieser Kardiomyozyten, da die für Apoptose notwendigen BAX, BAK und Diablo in ihrer Expression eingeschränkt werden. Wie die Expression von BAX, BAK und Diablo in *zombie-like* Kardiomyozyten vermindert wird, ist nicht bekannt. Es kann nur vermutet werden, ob das CTF2-Fragment von Kv7.1 die Expression von BAX und BAK in diesen Zellen verringert. Daher muss zuerst geklärt werden, ob das CTF2 von Kv7.1 in den *zombie-like* Kardiomyozyten entsteht und einen Einfluss auf das Überleben dieser Kardiomyozyten nehmen kann.

In der Literatur ist auch gezeigt worden, dass ein Einfluss auf Apoptose genommen werden kann, indem die Transkription von BAX und BAK reguliert wird (Chirakkal et al., 2006; Del Re et al., 2007; Erler et al., 2004; Graupner et al., 2011; Jones et al., 1998; Morrison et al., 2005; Pearson et al., 2000). Dabei ist untersucht worden, dass p53, p72, *specificity protein 1* (SP-1) und *specificity protein 3* (SP-3) die Transkription von BAX und BAK regulieren. Damit ist in dieser Arbeit mit dem CTF2-Fragment des Kv7.1 ein weiterer Regulator der Expression von BAX und BAK beschrieben worden.

Zusammengefasst kann Kv7.1 Apoptose beeinflussen, indem er über seine Kanalaktivität einen pro-apoptotischen Kaliumausfluss vermittelt. Dieser Kaliumefflux wird durch die Caspasen-bedingte Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2-Fragment aufgehoben. Daraufhin beeinflusst das CTF2 die Expression von BAX und BAK negativ (Abb. 59). Insgesamt scheint aber die Regulation des Kv7.1 auf Apoptose eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

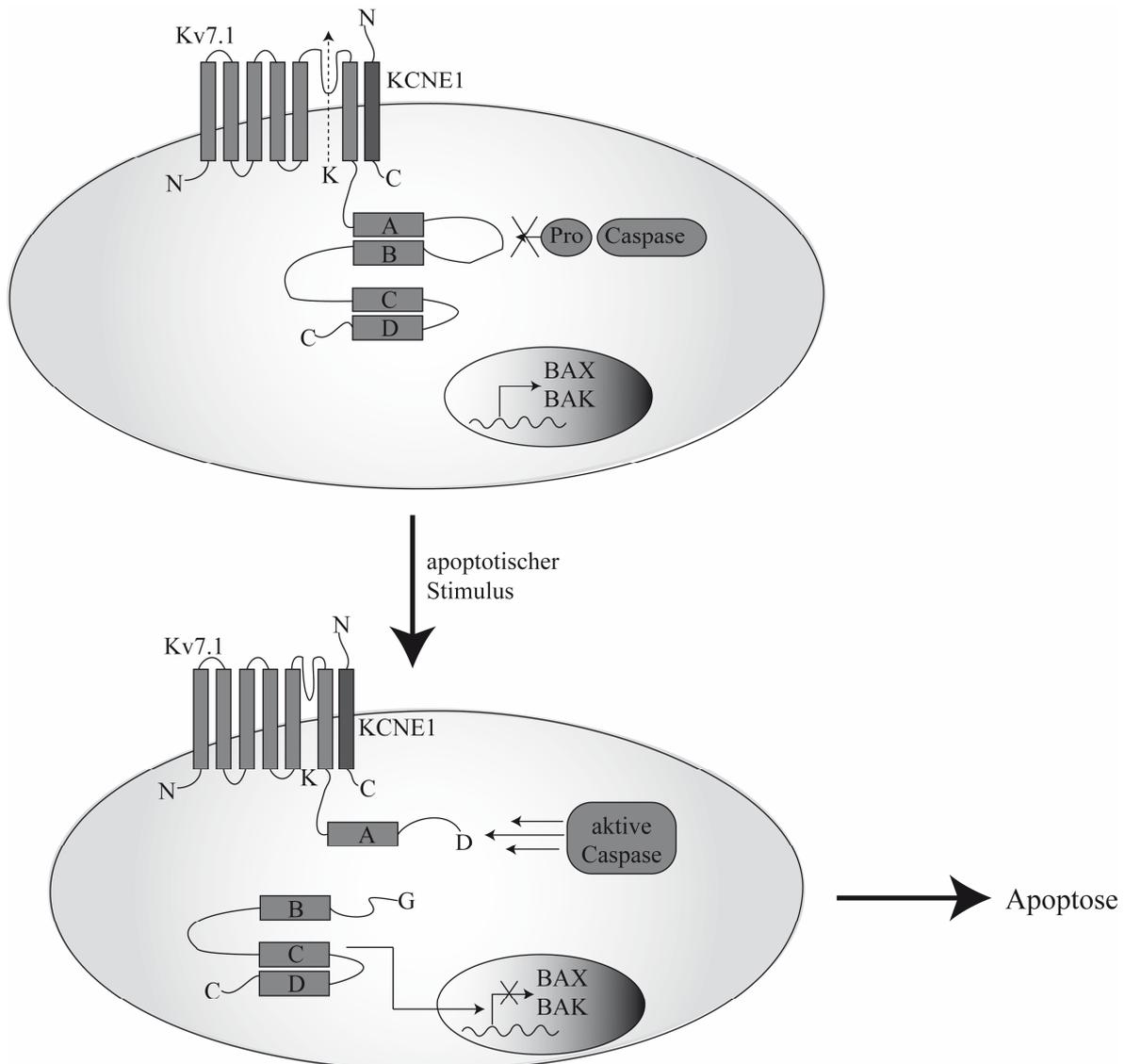


Abbildung 59: Übersicht zur Funktion des Kv7.1 in der Apoptose. In Basalzustand werden bei Depolarisation Kaliumionen (K) über den Kv7.1, der mit bis zu vier KCNE1-Proteinen assembliert, aus der Zelle transportiert. Repräsentativ ist in dieser Abbildung nur ein KCNE1-Protein dargestellt. Wird Apoptose ausgelöst, so wird unter anderem über den Kaliumfluss des Kv7.1 das Volumen der Zelle reduziert und Apoptose gefördert. Sobald Caspasen aktiv werden, wird der Kv7.1 am D459 prozessiert und die Kanalaktivität aufgehoben. Daraufhin transloziert das entstehende CTF2-Fragment in den Zellkern und kann dort die Expression von *BAX* und *BAK* vermindern. Ein Einfluss auf Apoptose durch die Genregulation vom CTF2 ist nicht festgestellt worden.

5.3. Die genregulatorische Funktion des CTF2 von Kv7.1

Das CTF2-Fragment von Kv7.1 ist in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und dort die Expression von *BAX* und *BAK* zu regulieren (Abb. 59). Wie das CTF2-Fragment von Kv7.1 dabei die Genregulation vornimmt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Entweder bindet das CTF2-Fragment selber DNA, oder es interagiert mit Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, um einen Einfluss auf die Genexpression zu nehmen.

Mit der Helix C und Helix D könnte im CTF2 ein DNA-bindendes Helix-Loop-Helix-Motiv vorhanden sein (Fisher et al., 1992; Jones, 2004). Alternativ befindet sich in der Helix D des CTF2 ein LxxLL-Motiv, welches möglicherweise die Interaktion mit Transkriptionsfaktor vermittelt (McInerney et al., 1998; Plevin et al., 2005).

Es gibt in der Literatur auch weitere Beispiele für Gen-regulierende Fragmente, die auf Grund von Proteolyse entstehen. Der Notchrezeptor ist wohl das bekannteste Beispiel dafür (Christian, 2012; Prox et al., 2012; Selkoe, Kopan, 2003). Von Kaliumkanälen sind keine durch Proteolyse entstandenen Fragmente bekannt, die nach ihrer Freisetzung in der Lage sind, Gene zu regulieren. Kim und Kollegen zeigten 2007, dass ein Fragment der Untereinheit $\beta 2$ des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.1 in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Nav1.1 reguliert (Kim et al., 2007). Somit könnte eine β -Untereinheit eines spannungsabhängigen Ionenkanals ein Fragment bilden, welches die Expression von Genen beeinflussen kann. Demnach ist Kv7.1 die bis jetzt einzige beschriebene α -Untereinheit eines spannungsabhängigen Kationenkanals, die geschnitten wird. Das dabei entstehende Fragmente kann die Transkription von Genen beeinflussen.

5.4. *Amino-Terminal Enhancer of Split* (AES) als neuer Interaktionspartner des Kv7.1?

In dieser Arbeit ist ein potentieller neuer Interaktionspartner vom Kv7.1 untersucht worden: der *Amino-Terminal Enhancer of Split* (AES). Es konnte mittels Ko-Immunopräzipitationsstudien gezeigt werden, dass AES und Kv7.1 in Säugetierzellen interagieren (s. 4.7.1.). Diese Ko-Immunopräzipitationsstudien können aber auch falsch positive Ergebnisse liefern. Diese falsch positiven Ergebnisse entstehen vor allem, wenn die Bindung zweier möglicher Interaktionspartner nach Überexpression beider Proteine untersucht wird. Dies war in dieser Arbeit ausschließlich der Fall. Es wäre notwendig, die Interaktion von AES an Kv7.1 ohne Überexpression beider Proteine zu untersuchen. Alternativ hätte man versuchen können, Ko-Immunopräzipitationsstudien von AES und Kv7.1 durchzuführen, bei denen nur AES transfiziert wird und Kv7.1 auf endogener Ebene präzipitiert wird.

Um überhaupt einen Eindruck über die Spezifität der Bindung von Kv7.1 an AES zu gewinnen, wurden verschiedene Versuchsansätze genutzt. Dafür wurden AES und Kv7.1 von beiden Seiten erfolgreich präzipitiert. Dies zeigt, dass, unabhängig an welchem Protein

man die Präzipitation durchführt, eine Interaktion von AES und Kv7.1 detektiert werden konnte.

Weiterhin ist untersucht worden, in welchen Bereichen AES und Kv7.1 einander binden. Dabei wurde festgestellt, dass AES mit dem C-Terminus von Kv7.1 interagiert. Wo die Bindung von AES an Kv7.1 im C-terminalen Bereich stattfindet, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Betrachtet man die Bereiche an denen Kv7.1 womöglich AES bindet, so wurde festgestellt, dass Kv7.1 mit der Glutamin-reichen Domäne von AES interagieren sollte. Diese Domäne vermittelt bekanntermaßen die Bindung von AES mit seinen Interaktionspartnern (Sarma, Yaseen, 2011; Yu et al., 2001).

Zusätzlich ist in dieser Arbeit auch untersucht worden, welche Funktion die Bindung von AES auf die Kanalfunktion von Kv7.1 hat. Dabei kann keine klare Aussage getroffen werden, ob AES den Kv7.1-bedingten Kaliumfluss reguliert. Eine Verminderung der Stromkurven von Kv7.1 nach Ko-Injektion mit AES lässt sich mit der reduzierten Expression des Kv7.1 nach Ko-Expression mit AES erklären. Diese Reduktion der Kv7.1-Expression ist aber nur in *Xenopus laevis* Oozyten aufgetreten. Damit ist dieser Effekt nicht auf Säugetierzellen übertragbar. Es muss noch in Säugetierzellen untersucht werden, ob AES einen Einfluss auf die Kanalaktivität von Kv7.1 nimmt.

AES ist ein Ko-Modulator von Transkriptionsfaktoren (Beagle, Johnson, 2010; Gasperowicz, Otto, 2005; Jennings, Ish-Horowicz, 2008). In dieser Arbeit ist angedeutet worden, dass das CTF2-Fragment von Kv7.1 die Expression von Genen reguliert. Somit ist es möglich, dass durch die Interaktion von AES und dem CTF2 die genregulatorische Funktion des CTF2 beeinflusst wird. Gegebenenfalls unterstützt AES auch die Translokation des CTF2 von Kv7.1 in den Zellkern. Weiterhin ist es auch denkbar, dass AES die Bindung vom CTF2 mit weiteren Interaktionspartnern, die für die genregulatorische Funktion des CTF2 von Kv7.1 wichtig sind, vermittelt. Dies müsste mit weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Somit kann AES mit seiner Glutamin-reichen Domäne innerhalb des CTF2-Fragmentes von Kv7.1 binden. Möglicherweise beeinflusst die Interaktion beider Proteine die genregulatorische Funktion des CTF2 (Abb. 60)

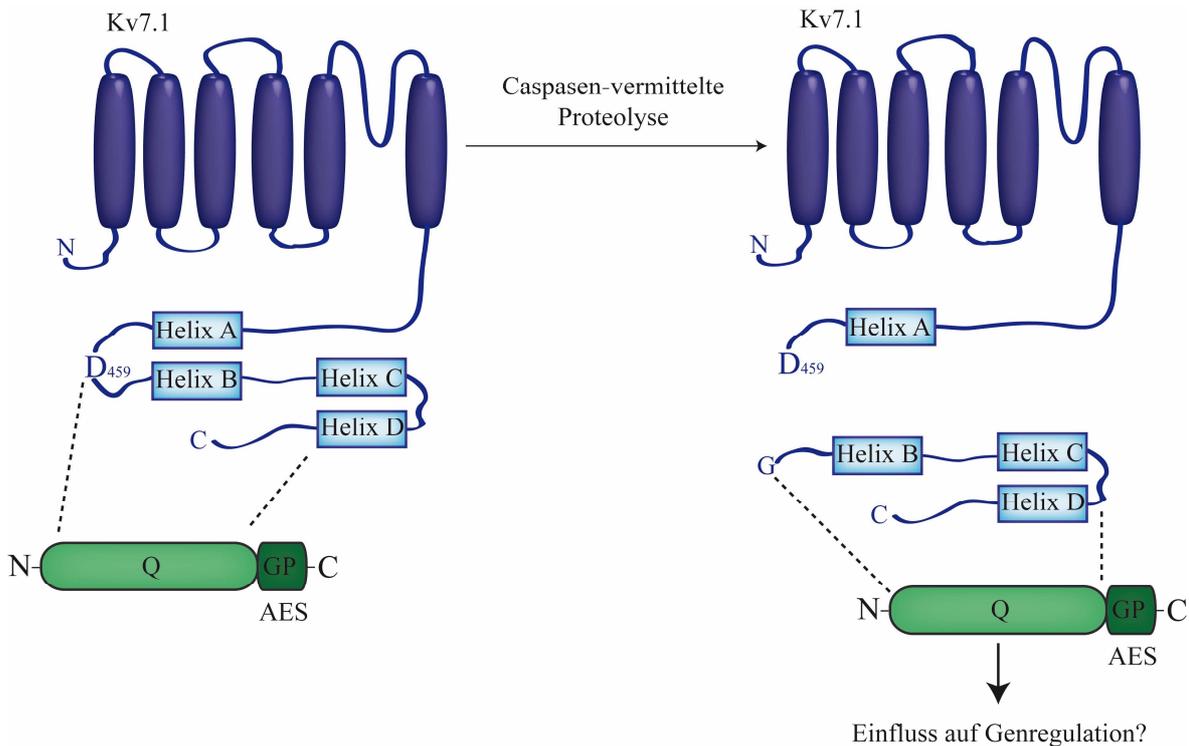


Abbildung 60: Übersicht zur Interaktion von AES und Kv7.1. AES bindet Kv7.1 innerhalb des CTF2-Fragmentes. Kv7.1 dagegen interagiert mit der Glutamin-reichen Domäne (Q) von AES. Nach Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2 könnte dann AES die mögliche Funktion als Transkriptionsfaktor des CTF2 des Kv7.1 beeinflussen. GP: Glycin-Prolin-reiche Domäne.

5.5. Prozessierung von Kv7.1 zum CTF1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kv7.1 in der Nähe der sechsten Transmembrandomäne zum CTF1 prozessiert wird (s. 4.8.). Dabei ist ein GSGF-Motiv direkt am Anschluss an die sechste Transmembrandomäne für die Proteolyse zum CTF1 entscheidend. Beim Austausch von S349W und G350R in Kv7.1 wurde der Schnitt zum CTF1 in beiden Fällen behindert. Dabei wird eine kleinere Aminosäure mit einer Rauminnehmenderen Aminosäure ausgetauscht. Nimmt man zum Beispiel Phenylalanin an Position 350 in Kv7.1 und tauscht dieses gegen ein Alanin, so wird der Schnitt zum CTF1 von Kv7.1 gefördert. Demnach unterstützen kleine Aminosäuren in der Nähe zum Glycin 348 die Proteolyse von Kv7.1 zum CTF1.

Ohne die genaue Kenntnis über die Protease, die das CTF1 von Kv7.1 spaltet, und/oder die Aminosäuren am Anfang des CTF1 von Kv7.1 zu kennen, kann nicht endgültig geschlossen werden, wo der Kv7.1 am GSGF-Motiv prozessiert wird. Zur Identifizierung des GSGF-Motives am Ende der letzten Transmembrandomäne wurden verschiedene Deletionsmutanten von Kv7.1 erstellt. Wenn aber in der Nähe einer Transmembrandomäne Aminosäuren deletiert werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die entstehenden

Trunktionsmutanten eine andere Faltung aufweisen. Eine andere Faltung von Kv7.1 könnte aber auch zu einer fehlenden Prozessierung des Kv7.1 führen. Somit besteht die Möglichkeit, dass das CTF1 an einer anderen Stelle als am GSGF-Motiv in Kv7.1 gespalten wird. Um sicherzustellen, wo und durch welche Protease das CTF1 von Kv7.1 entsteht, müsste eine massenspektroskopische Analyse des CTF1-Fragmentes durchgeführt werden. Mit Hilfe dieser Analyse ergibt sich die Möglichkeit, die genaue Aminosäurenkomposition des CTF1 erhalten. Damit könnte dann genau gesagt werden, wo das CTF1 abgespalten wird und welche Protease dies vermittelt.

Geht man davon aus, dass Kv7.1 am GSGF-Motiv zum CTF1 prozessiert wird, so besteht die mögliche CTF1-Schnittstelle in Kv7.1 aus PAGILGSGFALKVQ, wobei das GSGF-Motiv unterstrichen ist (Abb. 61).

Vergleicht man diese Schnittstelle mit der Merops-Datenbank (Rawlings et al., 2014), so ergeben sich als mögliche Proteasen, die den Schnitt zum CTF1 verantworten könnten, Chemotrypsin, Pepsin, Proteinase K und Thermolysin. Thermolysin und Proteinase K sind bakterielle Enzyme und kommen nicht in Säugetierzellen vor (Ebeling et al., 1974; Endo, 1962). Somit kann ausgeschlossen werden, dass Thermolysin oder Proteinase K für die Entstehung des CTF1 in den, in dieser Arbeit verwendeten, Säugetierzellen verantwortlich sind. Chemotrypsin und Pepsin sind beides Enzyme, die für die Verdauung der Nahrung bedeutend sind (Appel, 1986; Berger, Schechter, 1970; Dunn, 2001; Florkin, 1957; Fruton, 2002). Pepsin spaltet Proteine zu Polypeptiden. Diese Polypeptide werden dann von Chemotrypsin prozessiert. Chemotrypsin-ähnliche Proteasen verantworten unter anderem den Abbau von Proteinen im Proteasom (Heinemeyer et al., 1997; Wilk, Orłowski, 1983). Da das CTF1-Fragment von Kv7.1 nie endogen im Western Blot detektiert werden konnte, ist es möglich, dass das CTF1-Fragment als Abbauprodukt des Kv7.1 nur nach Überexpression entsteht. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das CTF1 während der Herstellung der Zelllysate gebildet wird.

All diese Überlegungen gehen aber davon aus, dass die CTF1-Schnittstelle in dem Bereich PAGILGSGFALKVQ liegt (Abb. 61). Es besteht die Möglichkeit, dass das CTF1 von Kv7.1 vom GSGF-Motiv betrachtet weiter N- oder C-terminal gelegen geschnitten wird. Trunktationen weiter C-terminal des GSGF-Motives wurden nicht vorgenommen, da sich dort auch die Calmodulinbindestelle befindet. Deletiert man in Kv7.1 die Calmodulinbindung, wird Kv7.1 fehlgefaltet, was zu einem Verlust der Prozessierung zum CTF1 führen sollte.



Abbildung 61: Mögliche Schnittstelle zum CTF1 in Kv7.1. S6: sechste Transmembrandomäne.

In dieser Arbeit ist auch nicht untersucht worden, ob weiter N-terminal gelegene Bereiche ab dem GSGF-Motiv einen Einfluss auf die Prozessierung zum CTF1 von Kv7.1 nehmen. Es besteht die Möglichkeit, dass Kv7.1 innerhalb der Zellmembran hydrolysiert wird. Als mögliche Proteasen, die innerhalb der Membran schneiden, können der γ -Sekretasekomplex, die Proteasen der *signal peptide peptidase* (SPP)-Familie und Rhomboide genannt werden.

In Vorarbeiten wurde festgestellt, dass Kv7.1 auch unter *knock-out* von Presenilin-1 und Presenilin-2 noch zum CTF1 prozessiert wird (Diplomarbeit C. Raab). Da Presenilin-1 und Presenilin-2 die aktiven Komponenten des γ -Sekretasekomplexes sind (Kaether et al., 2006), kann bei Defizienz von Presenilin-1 und Presenilin-2 keine Prozessierung von Substraten durch den γ -Sekretasekomplex mehr stattfinden. Demnach kann ausgeschlossen werden, dass Kv7.1 vom γ -Sekretase-Komplex prozessiert wird.

Für SPP-Proteasen sind bis heute als Substrate nur Typ 2 Transmembranproteine beschrieben worden (Golde et al., 2009; Mentrup et al., 2015; Schrul et al., 2010). Demnach ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Proteasen den Kv7.1 schneiden. Um aber endgültig ausschließen zu können, dass Kv7.1 von SPP-Proteasen geschnitten wird, müsste die Prozessierung von Kv7.1 in für die jeweiligen SPP-Protease defizienten Zellen untersucht werden. Alternativ kann auch unter Behandlung mit unspezifischen Inhibitoren für die SPP-Familie, wie Inhibitor X oder (Z-LL)₂-Keton (Friedmann et al., 2006; Golde et al., 2013; Ran et al., 2015; Weihofen et al., 2000), die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF1 betrachtet werden.

Als letzte Enzymfamilie, die den Schnitt zum CTF1 verantworten könnten, sollen die Serin-Proteasen der Rhomboide diskutiert werden (Urban et al., 2001; Urban, Freeman, 2003; Urban, Wolfe, 2005). Rhomboide sind dafür bekannt, auch Substrate, die, wie Kv7.1, die Membran mehrfach durchspannen, zu prozessieren (Fleig et al., 2012). Es ist gezeigt worden, dass Rhomboide in P1-Position eine kleine Aminosäure und in P4- und P2'-Position eine große hydrophobe Aminosäure bevorzugen (Akiyama, Maegawa, 2007; Strisovsky et al., 2009). Weiterhin bedarf es in einem Substrat für Rhomboide einer instabilen Helix (Akiyama, Maegawa, 2007). Betrachtet man Kv7.1 hinsichtlich dieser

Anforderungen, so findet sich in P1-Position möglicherweise mit Glycin 348 eine kleine Aminosäure (Abb. 61). In P4- und P2'-Position aber sind mit je einem Glycin keine großen hydrophoben Aminosäuren in Kv7.1 vorhanden (Abb. 61). Ob Kv7.1 eine instabile Helix trägt, kann nicht abschließend geklärt werden, da die Kristallstruktur von Kv7.1 nicht bekannt ist. Weiterführend müsste die Proteolyse von Kv7.1 unter Inhibition der Rhomboid-Aktivität untersucht werden. Dafür könnten Inhibitoren wie 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI) oder S016 (Vosyka et al., 2013; Wolf et al., 2013), genutzt werden.

5.6. Zusammenhang der Proteolyse und Kanalaktivität von Kv7.1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proteolyse zum CTF1 und CTF2 die Kanalaktivität von Kv7.1 beeinflusst.

Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit offenbarten, dass die Proteolyse zum CTF2 Kv7.1 inaktiviert. Dies ist mit weiteren Kv7.1-Mutanten in dieser Arbeit bestätigt worden. Kv7.1-G460S und Kv7.1-G460E zeigten beide eine vermehrte Prozessierung zum CTF2 und waren über verminderte Stromstärken in der Zwei-Elektrodenspannungsklemme in *Xenopus laevis* Oozyten aufgefallen.

Mittels der Mutanten Kv7.1-G348A und Kv7.1-F351A konnte gezeigt werden, dass der Schnitt zum CTF1 die Kanalfunktion von Kv7.1 aufhebt. Kv7.1-G348A und Kv7.1-F351A sind auch von Boulet und Kollegen hinsichtlich ihrer Kanalaktivität vermessen worden (Boulet et al., 2007). Die Experimente von Boulet und Kollegen zeigten die gleichen Kanalaktivitäten von Kv7.1-G348A und Kv7.1-F351A wie sie in dieser Arbeit festgestellt worden sind.

Weiterhin stellt sich aber auch die Frage, wie die Schnitte an Kv7.1 dessen Kanalaktivität beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurde die Bindung von Calmodulin am prozessierten Kv7.1 betrachtet. Bedenkt man, dass das CTF2 in Kv7.1 zwischen der Helix A und Helix B geschnitten wird, so befindet sich die Schnittstelle zum CTF2 mitten in der Calmodulin-Bindedomäne von Kv7.1 (Abb. 5). Demnach läge es nahe, dass durch den Schnitt zum CTF2 die Calmodulin-Bindung an Kv7.1 aufgehoben wird. Demnach würde der nach Prozessierung zum CTF2 übrig gebliebene N-terminale Teil von Kv7.1 nicht mehr an Calmodulin binden (Haitin, Attali, 2008; Wen, Levitan, 2002). Dies wurde untersucht und festgestellt, dass Kv7.1 nach Prozessierung zum CTF2 nicht mehr in der

Lage ist, Calmodulin zu binden (s. 4.6.1.). Die Interaktion von Calmodulin mit Kv7.1 ist aber für die richtige Faltung, den korrekten Transport zur Membran, sowie für die Kanalaktivität von Kv7.1 unabdingbar (Abb. 62). Demnach sollte das prozessierte Kv7.1 keinen Kaliumfluss mehr zeigen. Da die Schnittstelle zum CTF1 in Kv7.1 auch die CTF2-Schnittstelle enthält, geht auch nach Prozessierung zum CTF1 die Bindung von Calmodulin an Kv7.1 verloren. Somit bedingt auch der Verlust der Calmodulinbindung nach Proteolyse zum CTF1 die Inaktivierung des zum CTF1-prozessierten Kv7.1.

In dieser Arbeit ist nicht analysiert worden, ob die Proteolyse von Kv7.1 den Transport zur Membran beeinflusst. Je mehr Kv7.1 in der Membran zu finden ist, umso mehr Kanalaktivität kann detektiert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass Kv7.1-Mutanten mit weniger Proteolyse im Vergleich zu WT Kv7.1 vermehrt zur Membran transportiert werden. Gleichzeitig könnten Kv7.1-Mutationen mit mehr Proteolyse als WT Kv7.1 weniger Membranlokalisation im Vergleich zu WT Kv7.1 zeigen. Wenn Kv7.1 geschnitten wird, geht am N-terminal verbleibenden Teil von Kv7.1, der nach Proteolyse noch vorhanden ist, die Calmodulinbindung verloren. Ohne Calmodulinbindung kann Kv7.1 aber nicht mehr angemessen zur Membran transportiert werden (Haitin, Attali, 2008; Wen, Levitan, 2002). Demnach kann die verloren gegangene Calmodulinbindung ein möglicher Mechanismus sein, wie die Proteolyse die Membranlokalisation des Kv7.1 beeinflusst. Dies müsste mit Biotinylierungs- und Immunofluoreszenzfärbungen von Kv7.1-Mutanten mit veränderter Proteolyse bestimmt werden (Abb. 62).

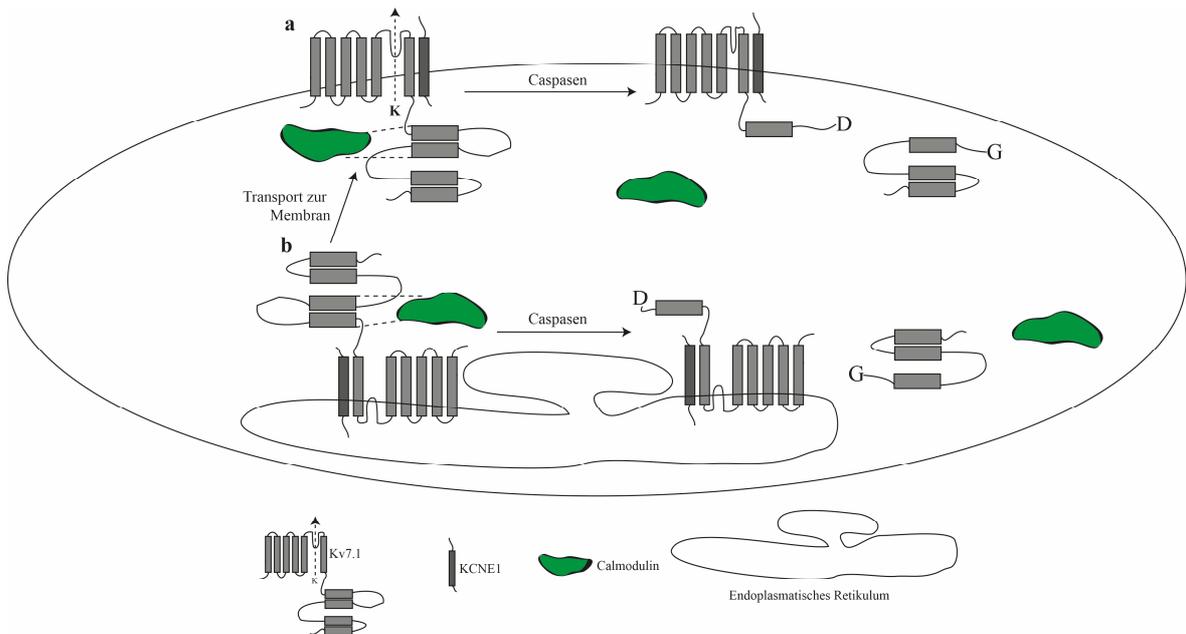


Abbildung 62: Übersicht zum Einfluss der Proteolyse auf die Kanalfunktion von Kv7.1. Repräsentativ ist hier nur die Caspasen-bedingte Proteolyse gezeigt. In einer Zelle ohne aktive Caspasen wird Kv7.1 über das Endoplasmatische Retikulum (ER) effektiv zur Zellmembran transportiert. Sobald Caspasen aktiv werden, wird der Kv7.1 entweder an der Zellmembran (a) oder im ER (b) prozessiert. Wird Kv7.1 im ER geschnitten (b), kann der Transport zur Membran nur vermindert stattfinden. Zusätzlich geht die Kanalfunktion von Kv7.1 verloren.

Mit Kv7.1-S464E ist dagegen eine Mutante beschrieben worden, bei der eine verminderte Proteolyse keine erhöhte Kanalaktivität zeigte. Dies spricht einerseits dafür, dass die Proteolyse nicht den angenommenen Effekt auf die Kanalaktivität von Kv7.1 hat. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Serin 464 für die Kanalaktivität von Kv7.1 bedeutender ist, als für die Proteolyse und anschließender Regulation der Kanalfunktion. Kathöfer und Kollegen untersuchten Kv7.1-S464A (Kathöfer et al., 2003). Sie stimulierten WT Kv7.1 und Kv7.1-S464A mit Isoproterenol. Isoproterenol ist bekannt dafür, die Kanalfunktion von Kv7.1 zu steigern. Dabei konnten Kathöfer und Kollegen mit Isoproterenol die Kaliumströme von WT Kv7.1 erhöhen. Die Kanalaktivität von Kv7.1-S464A wurde aber im Vergleich zu WT Kv7.1 weniger effektiv mit Isoproterenol angeregt. Fortführend wurde aber nicht untersucht, ob Kv7.1-S464A schon ohne Isoproterenol-Stimulation reduzierte Kaliumströme gegenüber WT Kv7.1 zeigte. Wenn Kv7.1-S464A ohne Isoproterenol-Stimulation verminderte Kaliumströme im Vergleich zu WT Kv7.1 zeigte, erklärt dies auch den Phänotyp von Kv7.1-S464A nach Isoproterenol-Stimulation. Da Kv7.1-S464E einen reduzierten Kaliumefflux (ohne Stimulation) im Vergleich zu WT Kv7.1 zeigte, scheint es möglich, dass auch Kv7.1-S464A (ohne Stimulation) verminderte Stromkurven zeigt. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass das Serin in Position 464 eine bedeutendere Rolle für die Kanalaktivität von Kv7.1

spielt. Es müssten weitere Aminosäuren an Position S464 in Kv7.1 getestet werden, um zu analysieren, ob die verminderten Ströme von Kv7.1-S464E am Einfügen einer geladenen Aminosäure (Glutamat) in Position 464 liegen oder durch die verminderte Proteolyse bedingt sind.

Die Regulation der Kanalfunktion des Kv7.1 über Proteolyse könnte *in vivo* dann von Bedeutung sein, wenn Apoptose vermehrt ausgelöst wird. Man weiß, dass in Patienten, die an Herzversagen leiden, verstärkt Apoptose im Herzen vorkommt (Yang et al., 2013). Es ist auch bekannt, dass der Kv7.1-bedingte Iks-Strom nach einem Herzinfarkt vermindert ist (Borlak, Thum, 2003; Li et al., 2000; Tsuji et al., 2000; Verkerk et al., 2003). Viele Studien versuchten zu analysieren, ob die Verminderung des Kv7.1-abhängigen Stromes nach Herzinfarkt durch eine reduzierte Expression von Kv7.1 vermittelt wird. Mittlerweile weiß man, dass dies nicht der Fall ist. Nattel diskutierte schon 2007, dass die Reduktion des Iks-Stromes nach Herzinfarkt eine posttranslationale Ursache haben sollte (Nattel et al., 2007). Damit kann die Proteolyse von Kv7.1 genau die durch Nattel beschriebene posttranslationale Veränderung des Kv7.1 sein. Dies muss aber erst im entsprechenden Mausmodell abgesichert werden.

5.7. Einfluss von Phosphorylierung auf die Proteolyse von Kv7.1

Weiterführend wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Phosphorylierungen des Kv7.1 auf die Proteolyse zum CTF2 untersucht. Es ist bekannt, dass Phosphorylierungen an Caspase-Substraten deren Prozessierung durch Caspasen verändern können (Dix et al., 2008; Dix et al., 2012). Gerade eine Phosphorylierung in P3-Position kann die Proteolyse durch Caspasen beeinflussen (Dix et al., 2012). In Kv7.1 ist in P3-Position an der CTF2-Schnittstelle mit Serin 457 eine potentielle Phosphorylierungsstelle vorhanden (Abb. 56). Es muss noch untersucht werden, ob eine negative Ladung an S457 in Kv7.1 die Caspasen-abhängige Prozessierung verändern kann. Es wurden aber auch weitere potentielle Phosphorylierungsstellen in Kv7.1 hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proteolyse untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das Einbringen der negativ geladenen Aminosäure Glutamat in Nähe der Schnittstelle zum CTF2 die Caspasen-abhängige Proteolyse von Kv7.1 beeinflusst. Eine veränderte Proteolyse von Kv7.1 zum CTF1 konnte dabei nicht festgestellt werden. Demnach scheint es möglich, dass Phosphorylierungen an der CTF2-Schnittstelle die Prozessierung des Kv7.1 beeinflussen.

Dennoch ist weder in dieser noch in einer anderen publizierten Arbeit gezeigt worden, an welchen Aminosäuren Kv7.1 in Nähe der CTF2-Schnittstelle tatsächlich phosphoryliert wird. Als mögliche Kinasen, die Kv7.1 phosphorylieren, sind Proteinkinase A und Proteinkinase C bekannt (Suh, Hille, 2007; Woodcock et al., 2009; Zaydman, Cui, 2014; Zhang et al., 2003). Mittels Aktivatoren der Proteinkinase A und Proteinkinase C könnten Phosphorylierungen an Kv7.1 ausgelöst werden. Anschließend müsste man das Prozessierungsverhalten des Kv7.1 im Western Blot überprüfen. Käme es zu einer veränderten Prozessierung von Kv7.1 nach Stimulation von Proteinkinase A und Proteinkinase C, so erhält man den ersten wirklichen Hinweis, dass Phosphorylierungen die Proteolyse von Kv7.1 verändern können. Darauf folgend kann man durch gezielte Mutationsstudien untersuchen, welche Aminosäuren in Kv7.1 für das mögliche veränderte Proteolyseverhalten nach Phosphorylierung bedeutend wären (Abb. 63).

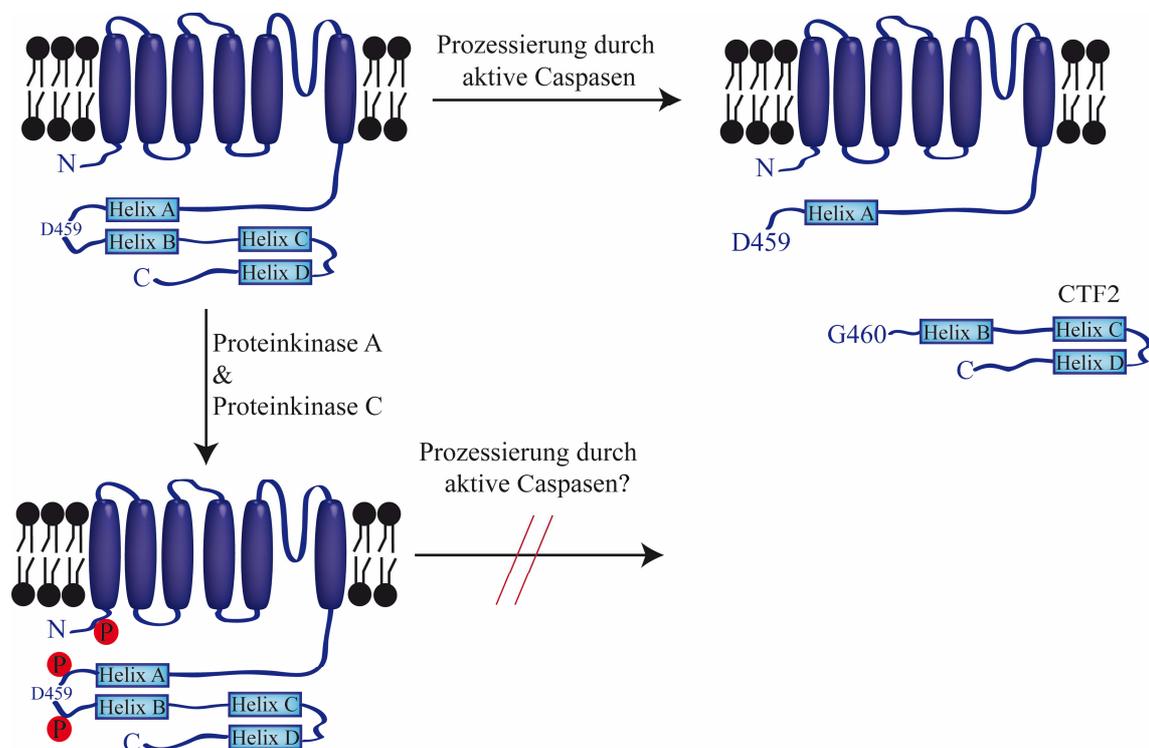


Abbildung 63: Übersicht zum Einfluss der Phosphorylierung von Kv7.1 auf die Proteolyse des Kv7.1.

Betrachtet man Bedingungen, bei denen Phosphorylierung an Kv7.1 *in vivo* verändert sind, ist es bekannt, dass Patienten mit Herzerkrankungen ein verändertes Phosphorylierungsmuster des Kv7.1 zeigen. Diese veränderten Phosphorylierungen an Kv7.1 sollen über eine vermehrte Expression der adrenergen β 2-Rezeptors bei Patienten mit Herzerkrankungen vermittelt werden (Reiken et al., 2003; Wehrens et al., 2003). Die Phosphorylierung an Kv7.1 selber erhöht die Kanalaktivität von Kv7.1. Somit kann rückgeschlossen werden, dass in Patienten, die an Herzversagen leiden, Kv7.1 eine erhöhte Kanalaktivität zeigen sollte. Ob mögliche Phosphorylierungen an Kv7.1 in Patienten mit

Herzerkrankungen die Proteolyse verändern, müsste noch mit entsprechendem Gewebe von Patienten, die an Herzversagen leiden, untersucht werden.

5.8. Ausblick

In dieser Arbeit wurde versucht, die Proteolyse des Kv7.1 weiter zu charakterisieren. Dabei wurde festgestellt, dass Kv7.1 in einem Zellalterungsmodell vermehrt zum CTF2 prozessiert wird. Dies muss in gealtertem Gewebe, wie Herzgewebe, bestätigt werden. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung des Kv7.1 seine Kanalfunktion beeinflusst. In gealterten oder durch Herzinfarkt gestörte Kardiomyozyten könnte die Proteolyse des Kv7.1 einen schädigenden Einfluss auf die Herzfunktion nehmen. Auch dies muss weiterführend in Alterungs- oder Infarktmodellen an Maus-, Ratten- oder humanen Herzen analysiert werden.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass Kv7.1 mit seinem Kaliumefflux eine pro-apoptische Funktion hat. Dies ist in dieser Arbeit nur mit Überexpressionstudien untersucht worden. Ein Einfluss des Kv7.1 auf Apoptose muss *in vivo* bestätigt werden. Dafür könnte man zum Beispiel Tumorproben verwenden.

Weiterhin wurde das CTF2-Fragment des Kv7.1 in Zellkulturmodellen als möglicher Regulator der Genexpression analysiert. Dies muss endogen weiter abgesichert werden. *Zombie-like* Kardiomyozyten wären ein geeignetes System, bei dem das CTF2-Fragment eine Regulation der Genexpression möglicherweise vornehmen kann. Fortführend ist nicht geklärt, wie das CTF2-Fragment die Expression von Genen beeinflusst. Mit dem *Amino-Terminal Enhancer of Split* ist dabei ein möglicher Modulator der genregulatorischen Funktion des CTF2 identifiziert worden. Es konnte gezeigt werden, dass AES und Kv7.1 in Überexpressionstudien interagieren. Dies muss endogen validiert werden.

Zusätzlich konnte nicht abschließend geklärt werden, in welchem Bereich Kv7.1 zum CTF1 geschnitten wird. Mit massenspektroskopischen Analysen muss der N-Terminus des CTF1 determiniert und dann die verantwortliche Protease identifiziert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv7.1 zu zwei carboxyterminalen Fragmenten (CTF1 und CTF2) prozessiert wird. Das kleinere CTF2 des Kv7.1 entsteht dabei durch Caspasen-vermittelte Proteolyse nach dem Aspartatrest 459. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, an welcher Position in Kv7.1 das größere CTF1 entsteht. In dieser Arbeit sollte analysiert werden, welche Caspasen den Kanal unter welchen (patho-) physiologischen Bedingungen schneiden. Außerdem sollte die Bildung des CTF1 sowie die Auswirkungen der Proteolyse auf die Kanalfunktion von Kv7.1 untersucht werden.

Zunächst ergaben Mutationsstudien, dass der Schnitt zum CTF1 an einem GSGF-Motiv kurz nach der sechsten Transmembrandomäne des Kv7.1 stattfindet. Stromkurven-Analysen von Kv7.1-Mutanten mit veränderter CTF1-Prozessierung in Froscheizellen konnten beweisen, dass die Proteolyse zum CTF1 die Kanalaktivität von Kv7.1 beendet.

Zusätzlich wurde untersucht, wie die proteolytische Prozessierung zum CTF2 die Kanalfunktion des Kv7.1 beeinflussen kann. Mittels Ko-Immunopräzipitationsstudien wurde festgestellt, dass der Kv7.1 nach der limitierten Proteolyse zum CTF2 kein Calmodulin mehr bindet. Somit hebt auch die Spaltung zum CTF2 den Kv7.1-vermittelten zellulären Kaliumefflux auf.

Weiterführend wurde die funktionelle Bedeutung der Proteolyse zum CTF2 charakterisiert. Mit Hilfe von Überexpressionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass vor allem Caspase-1, -3 und -7 bei der Spaltung des Kv7.1 zum CTF2 beteiligt sind. Demnach wird Kv7.1 dann proteolytisch fragmentiert, wenn Caspasen aktiv sind, wie zum Beispiel bei Entzündungsprozessen, bei der Apoptose und in gealterten Zellen.

In einem murinem Myokarditismodell konnte mittels Immunoblot-Analysen keine vermehrte Caspase-abhängige Proteolyse von Kv7.1 beobachtet werden. Daraufhin wurde versucht, die Funktion des Kv7.1 während induzierter apoptotischer Prozesse zu klären. Mittels Überexpressions- und Inhibitionsstudien konnte gezeigt werden, dass Kv7.1 einen pro-apoptischen Kaliumausfluss vermittelt, der zum Schrumpfen der apoptotischen Zellen beiträgt. RNA- und Protein-Expressionsanalysen bestätigten, dass das CTF2 die Expression der zwei pro-apoptischen Proteine *BCL-2 associated X protein* und *BCL-2 homologous antagonist killer* vermindert. Diese genregulatorische Funktion des CTF2

scheint aber nicht unmittelbar einen Einfluss auf das Einsetzen und das Ausmaß der Apoptose zu nehmen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob der *Amino-Terminal Enhancer of Split* (AES) als möglicher Interaktionspartner des Kv7.1 eine Bedeutung hat. Ko-Immunopräzipitationsanalysen ergaben, dass Kv7.1 und AES in Säugetierzellen aneinander binden. Einen Einfluss der Interaktion von Kv7.1 und AES auf den Kaliumstrom des Kv7.1 und auf die genannte genregulatorische Funktion des CTF2 konnte bisher nicht ermittelt werden.

Weiterhin wurden Hek 293 T-Zellen mit Hilfe der gekürzten Lamin-A-Variante Progerin gealtert, wobei Kv7.1 in diesen Seneszenz-induzierten Zellen vermehrt zum CTF2 gespalten wird. Demnach ist es möglich, dass die proteolytische Prozessierung den Kv7.1-vermittelten Iks-Strom im gealterten Herzen vermindert. Um den Einfluss dieses Proteolyseereignisses auf Herzarrhythmien näher zu untersuchen, wurden klinisch beschriebene Mutationen von Kv7.1 hinsichtlich der CTF2-Bildung betrachtet. Zwei dieser untersuchten Mutationen, Kv7.1-G460S und Kv7.1-A372D, zeigten im Immunoblot eine veränderte Prozessierung des Kv7.1 zum CTF2.

Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Kv7.1 zum einem von verschiedenen Caspasen gespalten wird. Auf der anderen Seite beendet die limitierte Proteolyse innerhalb des zytoplasmatischen Anteils von Kv7.1 dessen Kanalfunktion. Weiterhin legen die Experimente in dieser Arbeit eine Rolle der Kv7.1-Proteolyse bei der Entstehung von Herzarrhythmien beim Menschen nahe.

7. SUMMARY

Previous studies indicated that the voltage-dependent potassium channel Kv7.1 undergoes proteolysis, generating two C-terminal fragments (CTF1 and CTF2). While the smaller CTF2 fragment is generated by caspases requiring an aspartate at position 459, the cleavage position for the origination of the bigger CTF1 remained unknown. Thus, this thesis aimed to elucidate which caspases are responsible for Kv7.1 cleavage. Additionally, the functional impact of the fragmentation under different (patho-) physiological conditions as well as the consequence of proteolysis on the channel function of Kv7.1 was analyzed.

The cleavage site of the CTF1 fragment at a GSGF-motif near the sixth transmembrane domain of Kv7.1 was described using site-directed mutagenesis. The analysis of the electrophysiology of Kv7.1 mutants with altered processing to the CTF1 in *Xenopus laevis* oocytes revealed that the channel function of Kv7.1 is lost after fragmentation to the CTF1.

Additionally, it was analyzed how the caspase-dependent processing of Kv7.1 can interfere with the Kv7.1-mediated potassium flux. Co-immunoprecipitations studies showed that Kv7.1 cannot bind calmodulin after limited proteolysis. Therefore, a proteolytically processed Kv7.1 remains inactive.

Furthermore, the functional impact of the cleavage of Kv7.1 to the CTF2 was characterized. Overexpression studies revealed that caspase-1, -3 and -7 are primarily responsible for cleaving Kv7.1 at position 459. These data suggest that the caspase-dependent proteolysis of Kv7.1 occurs during processes, characterized by activated caspases, such as apoptosis, inflammation and in aged cells.

The data presented here suggest a role of Kv7.1 as a regulator of apoptosis. Overexpression studies and pharmacological inhibition of Kv7.1 channel function showed that Kv7.1 generates a pro-apoptotic potassium efflux necessary for shrinkage of cells in the initial phase of apoptosis. qRT-PCR- and western blot-analysis revealed a decreased expression of BCL-2 associated X protein and BCL-2 homologous antagonist killer, two important regulators of apoptosis, upon CTF2 expression. However, the CTF2 as a possible transcription factor does not seem to have a significant influence on the onset and degree of apoptosis.

Another focus of this study was the characterization of the Amino-terminal Enhancer of Split (AES) as a putative interaction partner of Kv7.1. The interaction of AES and Kv7.1 was established by co-immunoprecipitation-experiments in mammalian cells. A functional role of this interaction of Kv7.1 and AES on the Kv7.1 channel function or the function of the CTF2 as a transcription factor could not yet be determined.

The analysis of a murine myocarditis model also failed to reveal an increase in Kv7.1 cleavage in immunoblots of murine heart lysates. The cleavage of Kv7.1 was also analyzed in a cellular model of aging. Aging was induced by expressing the lamin-A variant progerin in Hek 293 T-cells, which revealed an increased Kv7.1 proteolytic processing in those cells. This indicates that enhanced Kv7.1 cleavage leads to a decrease in Kv7.1-mediated I_{Ks} current, which might contribute to heart arrhythmias. In line with this, clinically described Kv7.1-mutations were analyzed in regard of their proteolysis. Interestingly, two of those Kv7.1-mutations, Kv7.1-G460S and Kv7.1-A372D, showed an altered cleavage pattern in western blot analysis.

In summary, Kv7.1 can be processed by several caspases at aspartate 459, while this proteolysis at the C-terminus of the channel interferes with the channel function of Kv7.1. The experiments presented in this thesis indicate a role of the proteolysis of Kv7.1 in the development of heart arrhythmias.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, G. W. and Goldstein, S. A. (2001). Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). *Mol Interv* 1, 95-107.
- Abbott, G. W. (2012). KCNE2 and the K (+) channel: the tail wagging the dog. *Channels* 6, 1-10.
- Abbott, G. W. (2014). Biology of the KCNQ1 Potassium Channel. *New Journal of Science* 2014, 26.
- Abbott, G. W., Tai, K. K., Neverisky, D. L., Hansler, A., Hu, Z., Roepke, T. K., Lerner, D. J., Chen, Q., Liu, L., Zupan, B., Toth, M., Haynes, R., Huang, X., Demirbas, D., Buccafusca, R., Gross, S. S., Kanda, V. A. and Berry, G. T. (2014). KCNQ1, KCNE2, and Na⁺-coupled solute transporters form reciprocally regulating complexes that affect neuronal excitability. *Science signaling* 7, ra22.
- Akiyama, Y. and Maegawa, S. (2007). Sequence features of substrates required for cleavage by GlpG, an Escherichia coli rhomboid protease. *Molecular microbiology* 64, 1028-37.
- Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K. (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. edn (München, Elsevier Urban & Fischer Verlag).
- Angelo, K., Jespersen, T., Grunnet, M., Nielsen, M. S., Klaerke, D. A. and Olesen, S. P. (2002). KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophysical journal* 83, 1997-2006.
- Appel, W. (1986). Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. *Clinical biochemistry* 19, 317-22.
- Arcangeli, A., Crociani, O., Lastraioli, E., Masi, A., Pillozzi, S. and Becchetti, A. (2009). Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Current medicinal chemistry* 16, 66-93.
- Arnestad, M., Crotti, L., Rognum, T. O., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Wang, D. W., Rhodes, T. E., George, A. L., Jr. and Schwartz, P. J. (2007). Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115, 361-7.
- Ashcroft, F. M. (2006). From molecule to malady. *Nature* 440, 440-7.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-8.
- Bachmann, A., Quast, U. and Russ, U. (2001). Chromanol 293B, a blocker of the slow delayed rectifier K⁺ current (IKs), inhibits the CFTR Cl⁻ current. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 363, 590-6.
- Bai, C. X., Namekata, I., Kurokawa, J., Tanaka, H., Shigenobu, K. and Furukawa, T. (2005). Role of nitric oxide in Ca²⁺ sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K⁺ current in cardiac myocytes. *Circulation research* 96, 64-72.

- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. and Romey, G. (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384, 78-80.
- Beagle, B. and Johnson, G. V. (2010). AES/GRG5: more than just a dominant-negative TLE/GRG family member. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239, 2795-805.
- Berger, A. and Schechter, I. (1970). Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 257, 249-64.
- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J. and Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-6.
- Borlak, J. and Thum, T. (2003). Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 1592-608.
- Boulet, I. R., Labro, A. J., Raes, A. L. and Snyders, D. J. (2007). Role of the S6 C-terminus in KCNQ1 channel gating. *The Journal of physiology* 585, 325-37.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7297-301.
- Boyle, A. J., Shih, H., Hwang, J., Ye, J., Lee, B., Zhang, Y., Kwon, D., Jun, K., Zheng, D., Sievers, R., Angeli, F., Yeghiazarians, Y. and Lee, R. (2011). Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy. *Experimental gerontology* 46, 549-59.
- Brown, D. A. and Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673-6.
- Brunetti, L. and DeSantis, E. R. (2008). Treatment of viral myocarditis caused by coxsackievirus B. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 65, 132-7.
- Bulusu, K. C., Tym, J. E., Coker, E. A., Schierz, A. C. and Al-Lazikani, B. (2014). canSAR: updated cancer research and drug discovery knowledgebase. *Nucleic acids research* 42, D1040-7.
- Burgess, A., Vigneron, S., Brioudes, E., Labbe, J. C., Lorca, T. and Castro, A. (2010). Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12564-9.
- Burlacu, A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of cellular and molecular medicine* 7, 249-57.

- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C. and Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* 2, 401-4.
- Chadha, P. S., Zunke, F., Zhu, H. L., Davis, A. J., Jepps, T. A., Olesen, S. P., Cole, W. C., Moffatt, J. D. and Greenwood, I. A. (2012). Reduced KCNQ4-encoded voltage-dependent potassium channel activity underlies impaired beta-adrenoceptor-mediated relaxation of renal arteries in hypertension. *Hypertension* 59, 877-84.
- Chadha, P. S., Jepps, T. A., Carr, G., Stott, J. B., Zhu, H. L., Cole, W. C. and Greenwood, I. A. (2014). Contribution of kv7.4/kv7.5 heteromers to intrinsic and calcitonin gene-related peptide-induced cerebral reactivity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 887-93.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. and Green, D. R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular cell* 37, 299-310.
- Chirakkal, H., Leech, S. H., Brookes, K. E., Prais, A. L., Waby, J. S. and Corfe, B. M. (2006). Upregulation of BAK by butyrate in the colon is associated with increased Sp3 binding. *Oncogene* 25, 7192-200.
- Christian, L. M. (2012). The ADAM family: Insights into Notch proteolysis. *Fly* 6, 30-4.
- Christofori, G. (2011). Metastatic colon cancer cells negotiate the intravasation Notch. *Cancer cell* 19, 6-8.
- Chung, H. J. and Jan, L. Y. (2006). Channeling to the nucleus. *Neuron* 52, 937-40.
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A. and Izzo, N. J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2979-84.
- Condorelli, G., Roncarati, R., Ross, J., Jr., Pisani, A., Stassi, G., Todaro, M., Trocha, S., Drusco, A., Gu, Y., Russo, M. A., Frati, G., Jones, S. P., Lefer, D. J., Napoli, C. and Croce, C. M. (2001). Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9977-82.
- Coutinho, H. D., Falcao-Silva, V. S., Goncalves, G. F. and da Nobrega, R. B. (2009). Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model. *Immunity & ageing : I & A* 6, 4.
- Crotti, L., Spazzolini, C., Porretta, A. P., Dagradi, F., Taravelli, E., Petracci, B., Vicentini, A., Pedrazzini, M., La Rovere, M. T., Vanoli, E., Goosen, A., Heradien, M., George, A. L., Jr., Brink, P. A. and Schwartz, P. J. (2012). Vagal reflexes following an exercise stress test: a simple clinical tool for gene-specific risk stratification in the long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 60, 2515-24.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. and Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 49-63.

- Dallaporta, B., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., Larochette, N., Brenner, C., Marzo, I. and Kroemer, G. (1998). Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *Journal of immunology* *160*, 5605-15.
- Danial, N. N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *13*, 7254-63.
- de Almagro, M. C. and Vucic, D. (2012). The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental oncology* *34*, 200-11.
- De Strooper, B. and Annaert, W. (2010). Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annual review of cell and developmental biology* *26*, 235-60.
- Del Poeta, G., Venditti, A., Del Principe, M. I., Maurillo, L., Buccisano, F., Tamburini, A., Cox, M. C., Franchi, A., Bruno, A., Mazzone, C., Panetta, P., Suppo, G., Masi, M. and Amadori, S. (2003). Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* *101*, 2125-31.
- Del Re, D. P., Miyamoto, S. and Brown, J. H. (2007). RhoA/Rho kinase up-regulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *282*, 8069-78.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. and Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO journal* *17*, 2215-23.
- Dewson, G. Kluck R. M. (2010). Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton* *2*, 9-22.
- Dix, M. M., Simon, G. M. and Cravatt, B. F. (2008). Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell* *134*, 679-91.
- Dix, M. M., Simon, G. M., Wang, C., Okerberg, E., Patricelli, M. P. and Cravatt, B. F. (2012). Functional interplay between caspase cleavage and phosphorylation sculpts the apoptotic proteome. *Cell* *150*, 426-40.
- Drici, M. D., Arrighi, I., Chouabe, C., Mann, J. R., Lazdunski, M., Romey, G. and Barhanin, J. (1998). Involvement of Isk-associated K⁺ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circulation research* *83*, 95-102.
- Dunn, B. M. (2001). Overview of pepsin-like aspartic peptidases. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]* *Chapter 21*, Unit 21 3.
- Durantou, C., Rubera, I., L'Hoste, S., Cougnon, M., Poujeol, P., Barhanin, J. and Tauc, M. (2010). KCNQ1 K⁺ channels are involved in lipopolysaccharide-induced apoptosis of distal kidney cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* *25*, 367-78.

- Dvir, M., Strulovich, R., Sachyani, D., Ben-Tal Cohen, I., Haitin, Y., Dessauer, C., Pongs, O., Kass, R., Hirsch, J. A. and Attali, B. (2014). Long QT mutations at the interface between KCNQ1 helix C and KCNE1 disrupt I(KS) regulation by PKA and PIP(2). *Journal of cell science* *127*, 3943-55.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. and Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European journal of biochemistry / FEBS* *47*, 91-7.
- Endo, S. (1962). Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *J Ferment Technol* *40*, 346-53.
- Enyedi, P. and Czirjak, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiological reviews* *90*, 559-605.
- Erler, J. T., Cawthorne, C. J., Williams, K. J., Koritzinsky, M., Wouters, B. G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I. J. and Dive, C. (2004). Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Molecular and cellular biology* *24*, 2875-89.
- Erwig, L. P. and Henson, P. M. (2008). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation* *15*, 243-50.
- Etxeberria, A., Aivar, P., Rodriguez-Alfaro, J. A., Alaimo, A., Villace, P., Gomez-Posada, J. C., Areso, P. and Villarroel, A. (2008). Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *22*, 1135-43.
- Faleiro, L. and Lazebnik, Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *The Journal of cell biology* *151*, 951-9.
- Felipe, A., Vicente, R., Villalonga, N., Roura-Ferrer, M., Martinez-Marmol, R., Sole, L., Ferreres, J. C. and Condom, E. (2006). Potassium channels: new targets in cancer therapy. *Cancer detection and prevention* *30*, 375-85.
- Fisher, D. E., Parent, L. A. and Sharp, P. A. (1992). Myc/Max and other helix-loop-helix/leucine zipper proteins bend DNA toward the minor groove. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 11779-83.
- Fleig, L., Bergbold, N., Sahasrabudhe, P., Geiger, B., Kaltak, L. and Lemberg, M. K. (2012). Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. *Molecular cell* *47*, 558-69.
- Florkin, M. (1957). [Discovery of pepsin by Theodor Schwann]. *Revue medicale de Liege* *12*, 139-44.
- Freidin, M. B., Bragina, Elu, Saltykova, I. V., Deeva, E. V., Ogorodova, L. M. and Puzyrev, V. P. (2013). [Effect of additional disease (comorbidity) on association of allergic rhinitis with KCNE4 gene rs12621643 variant]. *Genetika* *49*, 541-4.
- Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schlegger, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S. F., Kuhn, P. H., Stauffer, D., Rovelli, G. and Martoglio, B. (2006). SPPL2a and SPPL2b

promote intramembrane proteolysis of TNF α in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nature cell biology* 8, 843-8.

Fruton, J. S. (2002). A history of pepsin and related enzymes. *The Quarterly review of biology* 77, 127-47.

Fu, L., Van Doorslaer, K., Chen, Z., Ristriani, T., Masson, M., Trave, G. and Burk, R. D. (2010). Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PloS one* 5.

Fujisawa, S., Ono, K. and Iijima, T. (2000). Time-dependent block of the slowly activating delayed rectifier K(+) current by chromanol 293B in guinea-pig ventricular cells. *British journal of pharmacology* 129, 1007-13.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. and Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19, 107-20.

Gamper, N. and Shapiro, M. S. (2003). Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *The Journal of general physiology* 122, 17-31.

Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C. and Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 6, p11.

Gasperowicz, M. and Otto, F. (2005). Mammalian Groucho homologs: redundancy or specificity? *Journal of cellular biochemistry* 95, 670-87.

Gavet, O. and Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Developmental cell* 18, 533-43.

Ghosh, S., Nunziato, D. A. and Pitt, G. S. (2006). KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circulation research* 98, 1048-54.

Gill, C., Mestril, R. and Samali, A. (2002). Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 135-46.

Golde, T. E., Wolfe, M. S. and Greenbaum, D. C. (2009). Signal peptide peptidases: a family of intramembrane-cleaving proteases that cleave type 2 transmembrane proteins. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 225-30.

Golde, T. E., Koo, E. H., Felsenstein, K. M., Osborne, B. A. and Miele, L. (2013). gamma-Secretase inhibitors and modulators. *Biochimica et biophysica acta* 1828, 2898-907.

- Goldstein, S. A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I. and Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nature reviews Neuroscience* 2, 175-84.
- Gonzalez, A., Fortuno, M. A., Querejeta, R., Ravassa, S., Lopez, B., Lopez, N. and Diez, J. (2003). Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovascular research* 59, 549-62.
- Goudevenos, J., Parry, G. and Gold, R. G. (1990). Cocksackie B4 viral myocarditis causing ventricular aneurysm. *International journal of cardiology* 27, 122-4.
- Grant, A. O. (2009). Cardiac ion channels. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2, 185-94.
- Graupner, V., Alexander, E., Overkamp, T., Rothfuss, O., De Laurenzi, V., Gillissen, B. F., Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K. and Essmann, F. (2011). Differential regulation of the proapoptotic multidomain protein Bak by p53 and p73 at the promoter level. *Cell death and differentiation* 18, 1130-9.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. and et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589-600.
- Gross, A., McDonnell, J. M. and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 13, 1899-911.
- Grunnet, M., Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Ljungstrom, T., Jorgensen, N. K., Olesen, S. P. and Klaerke, D. A. (2002). KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *The Journal of physiology* 542, 119-30.
- Grutter, M. G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Current opinion in structural biology* 10, 649-55.
- Gunther, W., Luchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. and Jentsch, T. J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8075-80.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stuhmer, W. and Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57, 473-508.
- Haitin, Y. and Attali, B. (2008). The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *The Journal of physiology* 586, 1803-10.
- Haitin, Y., Wiener, R., Shaham, D., Peretz, A., Cohen, E. B., Shamgar, L., Pongs, O., Hirsch, J. A. and Attali, B. (2009). Intracellular domains interactions and gated motions of I(KS) potassium channel subunits. *The EMBO journal* 28, 1994-2005.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. and Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *The Journal of biological chemistry* 272, 25200-9.

- Hernandez, C. C., Zaika, O. and Shapiro, M. S. (2008). A carboxy-terminal inter-helix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K⁺ channels. *The Journal of general physiology* *132*, 361-81.
- Hessler, S., Zheng, F., Hartmann, S., Rittger, A., Lehnert, S., Volkel, M., Nissen, M., Edelmann, E., Saftig, P., Schwake, M., Huth, T. and Alzheimer, C. (2015). beta-Secretase BACE1 Regulates Hippocampal and Reconstituted M-Currents in a beta-Subunit-Like Fashion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *35*, 3298-311.
- Hille, B., Armstrong, C. M. and MacKinnon, R. (1999). Ion channels: from idea to reality. *Nature medicine* *5*, 1105-9.
- Hille, Bertil (2001). *Ion Channel of Excitable Membranes*, 3. edn (Sunderland, MA, Sinauer Associates Inc.).
- Hirobe, T. (1994). Effects of activators (SC-9 and OAG) and inhibitors (staurosporine and H-7) of protein kinase C on the proliferation of mouse epidermal melanoblasts in serum-free culture. *Journal of cell science* *107 (Pt 6)*, 1679-86.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* *117*, 500-44.
- Hori, H., Matoba, T., Shingu, M. and Toshima, H. (1981). The role of cell mediated immunity in coxsackie B viral myocarditis. *Japanese circulation journal* *45*, 1409-14.
- Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., Latham, V. and Sullivan, M. (2012). PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic acids research* *40*, D261-70.
- Horr, S., Goldenberg, I., Moss, A. J., J. O. Uchi, Barsheshet, A., Connelly, H., Gray, D. A., Zareba, W. and Lopes, C. M. (2011). Ion channel mechanisms related to sudden cardiac death in phenotype-negative long-QT syndrome genotype-phenotype correlations of the KCNQ1(S349W) mutation. *Journal of cardiovascular electrophysiology* *22*, 193-200.
- Huth, T., Schmidt-Neuenfeldt, K., Rittger, A., Saftig, P., Reiss, K. and Alzheimer, C. (2009). Non-proteolytic effect of beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) on sodium channel function. *Neurobiology of disease* *33*, 282-9.
- Jan, Y., Matter, M., Pai, J. T., Chen, Y. L., Pilch, J., Komatsu, M., Ong, E., Fukuda, M. and Ruoslahti, E. (2004). A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. *Cell* *116*, 751-62.
- Jennings, B. H. and Ish-Horowicz, D. (2008). The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome biology* *9*, 205.
- Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* *1*, 21-30.

Jespersen, T., Membrez, M., Nicolas, C. S., Pitard, B., Staub, O., Olesen, S. P., Baro, I. and Abriel, H. (2007). The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovascular research* 74, 64-74.

Jiang, M., Xu, X., Wang, Y., Toyoda, F., Liu, X. S., Zhang, M., Robinson, R. B. and Tseng, G. N. (2009). Dynamic partnership between KCNQ1 and KCNE1 and influence on cardiac IKs current amplitude by KCNE2. *The Journal of biological chemistry* 284, 16452-62.

Jones, N. A., Turner, J., McIlwrath, A. J., Brown, R. and Dive, C. (1998). Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53. *Molecular pharmacology* 53, 819-26.

Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology* 5, 226.

Joy, J., Rao, Y. Y., Raveendranath, M., Shanmugam, J. and Balakrishnan, K. G. (1990). Coxsackie viral myocarditis: a clinical and echocardiographic study. *Indian heart journal* 42, 441-4.

Jung, Y. S., Lee, S. J., Lee, S. H., Chung, J. Y., Jung, Y. J., Hwang, S. H., Ha, N. C. and Park, B. J. (2013). Loss of VHL promotes progerin expression, leading to impaired p14/ARF function and suppression of p53 activity. *Cell cycle* 12, 2277-90.

Kaether, C., Haass, C. and Steiner, H. (2006). Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neuro-degenerative diseases* 3, 275-83.

Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y. and Hunter, T. (2005). Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *The Journal of biological chemistry* 280, 857-60.

Kanki, H., Kupersmidt, S., Yang, T., Wells, S. and Roden, D. M. (2004). A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *The Journal of biological chemistry* 279, 33976-83.

Karavidas, A., Lazaros, G., Noutsias, M., Matzaraki, V., Danias, P. G., Pyrgakis, V., Voudris, V. and Adamopoulos, S. (2011). Recurrent coxsackie B viral myocarditis leading to progressive impairment of left ventricular function over 8 years. *International journal of cardiology* 151, e65-7.

Kasimova, M. A., Zaydman, M. A., Cui, J. and Tarek, M. (2015). PIP(2)-dependent coupling is prominent in Kv7.1 due to weakened interactions between S4-S5 and S6. *Scientific reports* 5, 7474.

Kathofer, S., Zhang, W., Karle, C., Thomas, D., Schoels, W. and Kiehn, J. (2000). Functional coupling of human beta 3-adrenoreceptors to the KvLQT1/MinK potassium channel. *The Journal of biological chemistry* 275, 26743-7.

Kathofer, S., Rockl, K., Zhang, W., Thomas, D., Katus, H., Kiehn, J., Kreye, V., Schoels, W. and Karle, C. (2003). Human beta(3)-adrenoreceptors couple to KvLQT1/MinK potassium channels in *Xenopus* oocytes via protein kinase C phosphorylation of the KvLQT1 protein. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 368, 119-26.

- Kim, D. Y., Carey, B. W., Wang, H., Ingano, L. A., Binshtok, A. M., Wertz, M. H., Pettingell, W. H., He, P., Lee, V. M., Woolf, C. J. and Kovacs, D. M. (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nature cell biology* 9, 755-64.
- Kinoshita, K., Komatsu, T., Nishide, K., Hata, Y., Hisajima, N., Takahashi, H., Kimoto, K., Aonuma, K., Tsushima, E., Tabata, T., Yoshida, T., Mori, H., Nishida, K., Yamaguchi, Y., Ichida, F., Fukurotani, K., Inoue, H. and Nishida, N. (2014). A590T mutation in KCNQ1 C-terminal helix D decreases I channel trafficking and function but not Yotiao interaction. *Journal of molecular and cellular cardiology*.
- Kobertz, W. R. (2014). Stoichiometry of the cardiac IKs complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5065-6.
- Kurokawa, J., Motoike, H. K., Rao, J. and Kass, R. S. (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16374-8.
- Kurokawa, J., Bankston, J. R., Kaihara, A., Chen, L., Furukawa, T. and Kass, R. S. (2009). KCNE variants reveal a critical role of the beta subunit carboxyl terminus in PKA-dependent regulation of the IKs potassium channel. *Channels* 3, 16-24.
- Lang, F., Ritter, M., Gamper, N., Huber, S., Fillon, S., Tanneur, V., Lepple-Wienhues, A., Szabo, I. and Gulbins, E. (2000). Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 10, 417-28.
- Lang, F., Foller, M., Lang, K. S., Lang, P. A., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A. and Huber, S. M. (2005). Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *The Journal of membrane biology* 205, 147-57.
- Li, D., Melnyk, P., Feng, J., Wang, Z., Petrecca, K., Shrier, A. and Nattel, S. (2000). Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 101, 2631-8.
- Li, G. R., Lau, C. P., Ducharme, A., Tardif, J. C. and Nattel, S. (2002). Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 283, H1031-41.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
- Li, X., Dang, S., Yan, C., Gong, X., Wang, J. and Shi, Y. (2013). Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature* 493, 56-61.
- Liang, Y., Yan, C. and Schor, N. F. (2001). Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* 20, 6570-8.
- Liu, X. S., Zhang, M., Jiang, M., Wu, D. M. and Tseng, G. N. (2007). Probing the interaction between KCNE2 and KCNQ1 in their transmembrane regions. *The Journal of membrane biology* 216, 117-27.

- Lorenz, C., Pusch, M. and Jentsch, T. J. (1996). Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13362-6.
- Loussouarn, G., Park, K. H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F. and Escande, D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *The EMBO journal* 22, 5412-21.
- Lundby, A., Tseng, G. N. and Schmitt, N. (2010). Structural basis for K(V)7.1-KCNE(x) interactions in the I(Ks) channel complex. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 7, 708-13.
- Luo, M., Lu, Z., Sun, H., Yuan, K., Zhang, Q., Meng, S., Wang, F., Guo, H., Ju, X., Liu, Y., Ye, T. and Zhai, Z. (2010). Nuclear entry of active caspase-3 is facilitated by its p3-recognition-based specific cleavage activity. *Cell research* 20, 211-22.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350, 232-5.
- Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A. and Okada, Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9487-92.
- Manderfield, L. J., Daniels, M. A., Vanoye, C. G. and George, A. L., Jr. (2009). KCNE4 domains required for inhibition of KCNQ1. *The Journal of physiology* 587, 303-14.
- Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D. S. and Avoli, M. (2010). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *The Lancet Neurology* 9, 413-24.
- Mao, T., Miao, H. J., Xu, G. J., Gan, T. Y., Zhou, X. H., Zhang, J., Li, F. P. and Tang, B. P. (2013). [Association of single nucleotide polymorphism of KCNE1 and KCNE4 gene with atrial fibrillation in Xinjiang Uygur and Han population]. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi* 41, 916-21.
- March, H. N., Rust, A. G., Wright, N. A., ten Hoeve, J., de Ridder, J., Eldridge, M., van der Weyden, L., Berns, A., Gadiot, J., Uren, A., Kemp, R., Arends, M. J., Wessels, L. F., Winton, D. J. and Adams, D. J. (2011). Insertional mutagenesis identifies multiple networks of cooperating genes driving intestinal tumorigenesis. *Nature genetics* 43, 1202-9.
- Marrion, N. V. (1997). Control of M-current. *Annual review of physiology* 59, 483-504.
- Marx, S. O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A. R. and Kass, R. S. (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 295, 496-9.
- McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T. M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass, C. K. and

- Rosenfeld, M. G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes & development* *12*, 3357-68.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal* *16*, 2794-804.
- Meiss, G., Pingoud, A. (2010). The final cut - Nukleasen in der Apoptose. *BIOspektrum* *1*, 22-3.
- Mentrup, T., Hasler, R., Fluhrer, R., Saftig, P. and Schroder, B. (2015). A Cell-Based Assay Reveals Nuclear Translocation of Intracellular Domains Released by SPPL Proteases. *Traffic*.
- Merkle, S., Frantz, S., Schon, M. P., Bauersachs, J., Buitrago, M., Frost, R. J., Schmitteckert, E. M., Lohse, M. J. and Engelhardt, S. (2007). A role for caspase-1 in heart failure. *Circulation research* *100*, 645-53.
- Miller, J. D., Ganat, Y. M., Kishinevsky, S., Bowman, R. L., Liu, B., Tu, E. Y., Mandal, P. K., Vera, E., Shim, J. W., Kriks, S., Taldone, T., Fusaki, N., Tomishima, M. J., Krainc, D., Milner, T. A., Rossi, D. J. and Studer, L. (2013). Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell stem cell* *13*, 691-705.
- Moorjani, N., Ahmad, M., Catarino, P., Brittin, R., Trabzuni, D., Al-Mohanna, F., Narula, N., Narula, J. and Westaby, S. (2006). Activation of apoptotic caspase cascade during the transition to pressure overload-induced heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* *48*, 1451-8.
- Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P. and Chahine, M. (2014). Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores. *Frontiers in pharmacology* *5*, 53.
- Morokuma, J., Blackiston, D., Adams, D. S., Seebohm, G., Trimmer, B. and Levin, M. (2008a). Modulation of potassium channel function confers a hyperproliferative invasive phenotype on embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 16608-13.
- Morokuma, J., Blackiston, D. and Levin, M. (2008b). KCNQ1 and KCNE1 K⁺ channel components are involved in early left-right patterning in *Xenopus laevis* embryos. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* *21*, 357-72.
- Morrison, D. J., English, M. A. and Licht, J. D. (2005). WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak. *Cancer research* *65*, 8174-82.
- Moser, A. R., Pitot, H. C. and Dove, W. F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* *247*, 322-4.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* *403*, 98-103.

- Nakajo, K. and Kubo, Y. (2014). Steric hindrance between S4 and S5 of the KCNQ1/KCNE1 channel hampers pore opening. *Nature communications* 5, 4100.
- Narula, J., Haider, N., Arbustini, E. and Chandrashekar, Y. (2006). Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure--seeing hope in death. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine* 3, 681-8.
- Nattel, S. and Carlsson, L. (2006). Innovative approaches to anti-arrhythmic drug therapy. *Nature reviews Drug discovery* 5, 1034-49.
- Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S. and Yeh, Y. H. (2007). Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiological reviews* 87, 425-56.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* 6, 1028-42.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. and Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological reviews* 87, 165-217.
- Oberai, A., Joh, N. H., Pettit, F. K. and Bowie, J. U. (2009). Structural imperatives impose diverse evolutionary constraints on helical membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17747-50.
- Ohno, S., Zankov, D. P., Ding, W. G., Itoh, H., Makiyama, T., Doi, T., Shizuta, S., Hattori, T., Miyamoto, A., Naiki, N., Hancox, J. C., Matsuura, H. and Horie, M. (2011). KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 4, 352-61.
- Oliveras, A., Roura-Ferrer, M., Sole, L., de la Cruz, A., Prieto, A., Etxebarria, A., Manils, J., Morales-Cano, D., Condom, E., Soler, C., Cogolludo, A., Valenzuela, C., Villarroel, A., Comes, N. and Felipe, A. (2014). Functional assembly of Kv7.1/Kv7.5 channels with emerging properties on vascular muscle physiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 1522-30.
- Palmer, B. R., Frampton, C. M., Skelton, L., Yandle, T. G., Doughty, R. N., Whalley, G. A., Ellis, C. J., Troughton, R. W., Richards, A. M. and Cameron, V. A. (2012). KCNE5 polymorphism rs697829 is associated with QT interval and survival in acute coronary syndromes patients. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 23, 319-24.
- Park, K. H., Piron, J., Dahimene, S., Merot, J., Baro, I., Escande, D. and Loussouarn, G. (2005). Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circulation research* 96, 730-9.
- Pearson, A. S., Spitz, F. R., Swisher, S. G., Kataoka, M., Sarkiss, M. G., Meyn, R. E., McDonnell, T. J., Cristiano, R. J. and Roth, J. A. (2000). Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 887-90.
- Piccirillo, G., Moscucci, F., Pascucci, M., Pappada, M. A., D'Alessandro, G., Rossi, P., Quaglione, R., Di Barba, D., Barilla, F. and Magri, D. (2013). Influence of aging and

chronic heart failure on temporal dispersion of myocardial repolarization. *Clinical interventions in aging* 8, 293-300.

Plant, L. D., Xiong, D., Dai, H. and Goldstein, S. A. (2014). Individual IKs channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E1438-46.

Plati, J., Bucur, O. and Khosravi-Far, R. (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of cellular biochemistry* 104, 1124-49.

Plevin, M. J., Mills, M. M. and Ikura, M. (2005). The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences* 30, 66-9.

Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A. and Leeuwenburgh, C. (2002). The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* 959, 93-107.

Potapova, T. A., Sivakumar, S., Flynn, J. N., Li, R. and Gorbsky, G. J. (2011). Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. *Molecular biology of the cell* 22, 1191-206.

Preston, P., Wartosch, L., Gunzel, D., Fromm, M., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., Barhanin, J., Warth, R. and Jentsch, T. J. (2010). Disruption of the K⁺ channel beta-subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl⁻ transport. *The Journal of biological chemistry* 285, 7165-75.

Prox, J., Rittger, A. and Saftig, P. (2012). Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin. *Experimental brain research* 217, 331-41.

Puente, X. S. and Lopez-Otin, C. (2004). A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome research* 14, 609-22.

Puente, X. S., Sanchez, L. M., Gutierrez-Fernandez, A., Velasco, G. and Lopez-Otin, C. (2005). A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochemical Society transactions* 33, 331-4.

Qin, Z. H., Wang, Y., Kikly, K. K., Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2001). Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *The Journal of biological chemistry* 276, 8079-86.

Ramuz, O., Isnardon, D., Devilard, E., Charafe-Jauffret, E., Hassoun, J., Birg, F. and Xerri, L. (2003). Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy. *International journal of experimental pathology* 84, 75-81.

Ran, Y., Ladd, G. Z., Ceballos-Diaz, C., Jung, J. I., Greenbaum, D., Felsenstein, K. M. and Golde, T. E. (2015). Differential Inhibition of Signal Peptide Peptidase Family Members by Established gamma-Secretase Inhibitors. *PloS one* 10, e0128619.

Ravn, L. S., Hofman-Bang, J., Dixen, U., Larsen, S. O., Jensen, G., Haunso, S., Svendsen, J. H. and Christiansen, M. (2005). Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation. *The American journal of cardiology* 96, 405-7.

Ravn, L. S., Aizawa, Y., Pollevick, G. D., Hofman-Bang, J., Cordeiro, J. M., Dixen, U., Jensen, G., Wu, Y., Burashnikov, E., Haunso, S., Guerchicoff, A., Hu, D., Svendsen, J. H., Christiansen, M. and Antzelevitch, C. (2008). Gain of function in IKs secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 5, 427-35.

Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J. and Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* 42, D503-9.

Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17, 2941-53.

Reiken, S., Gaburjakova, M., Guatimosim, S., Gomez, A. M., D'Armiento, J., Burkhoff, D., Wang, J., Vassort, G., Lederer, W. J. and Marks, A. R. (2003). Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *The Journal of biological chemistry* 278, 444-53.

Ren, D. (2011). Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors. *Neuron* 72, 899-911.

Rivas, A. and Francis, H. W. (2005). Inner ear abnormalities in a Kcnq1 (Kvlqt1) knockout mouse: a model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 26, 415-24.

Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology & therapeutics* 90, 1-19.

Roden, D. M. (2006). A new role for calmodulin in ion channel biology. *Circulation research* 98, 979-81.

Roepke, T. K., Anantharam, A., Kirchhoff, P., Busque, S. M., Young, J. B., Geibel, J. P., Lerner, D. J. and Abbott, G. W. (2006). The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. *The Journal of biological chemistry* 281, 23740-7.

Roepke, T. K., Kontogeorgis, A., Ovanez, C., Xu, X., Young, J. B., Purtell, K., Goldstein, P. A., Christini, D. J., Peters, N. S., Akar, F. G., Gutstein, D. E., Lerner, D. J. and Abbott, G. W. (2008). Targeted deletion of kcne2 impairs ventricular repolarization via disruption of I(K,slow1) and I(to,f). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 3648-60.

Roepke, T. K., King, E. C., Reyna-Neyra, A., Paroder, M., Purtell, K., Koba, W., Fine, E., Lerner, D. J., Carrasco, N. and Abbott, G. W. (2009). Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. *Nat Med* 15, 1186-94.

- Roepke, T. K., Purtell, K., King, E. C., La Perle, K. M., Lerner, D. J. and Abbott, G. W. (2010). Targeted deletion of *Kcne2* causes gastritis cystica profunda and gastric neoplasia. *PLoS one* 5, e11451.
- Roepke, T. K., Kanda, V. A., Purtell, K., King, E. C., Lerner, D. J. and Abbott, G. W. (2011a). KCNE2 forms potassium channels with KCNA3 and KCNQ1 in the choroid plexus epithelium. *FASEB J* 25, 4264-73.
- Roepke, T. K., King, E. C., Purtell, K., Kanda, V. A., Lerner, D. J. and Abbott, G. W. (2011b). Genetic dissection reveals unexpected influence of beta subunits on KCNQ1 K⁺ channel polarized trafficking in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 727-36.
- Roura-Ferrer, M., Sole, L., Oliveras, A., Villarroel, A., Comes, N. and Felipe, A. (2012). Targeting of Kv7.5 (KCNQ5)/KCNE channels to surface microdomains of cell membranes. *Muscle & nerve* 45, 48-54.
- Sachse, C. C., Kim, Y. H., Agsten, M., Huth, T., Alzheimer, C., Kovacs, D. M. and Kim, D. Y. (2013). BACE1 and presenilin/gamma-secretase regulate proteolytic processing of KCNE1 and 2, auxiliary subunits of voltage-gated potassium channels. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Sachyani, D., Dvir, M., Strulovich, R., Tria, G., Tobelaim, W., Peretz, A., Pongs, O., Svergun, Dmitri, Attali, B. and Hirsch, J. (2014). Structural Basis of a Kv7.1 Potassium Channel Gating Module: Studies of the Intracellular C-Terminal Domain in Complex with Calmodulin. *Structure* 22, 1582-94.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L. and Keating, M. T. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384, 80-3.
- Sarma, N. J. and Yaseen, N. R. (2011). Amino-terminal enhancer of split (AES) interacts with the oncoprotein NUP98-HOXA9 and enhances its transforming ability. *The Journal of biological chemistry* 286, 38989-9001.
- Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B. and Pongs, O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *The EMBO journal* 19, 332-40.
- Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R. and Jentsch, T. J. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 403, 196-9.
- Schrul, B., Kapp, K., Sinning, I. and Dobberstein, B. (2010). Signal peptide peptidase (SPP) assembles with substrates and misfolded membrane proteins into distinct oligomeric complexes. *The Biochemical journal* 427, 523-34.

- Schwake, M., Jentsch, T. J. and Friedrich, T. (2003). A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO reports* 4, 76-81.
- Schwake, M., Athanasiadu, D., Beimgraben, C., Blanz, J., Beck, C., Jentsch, T. J., Saftig, P. and Friedrich, T. (2006). Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 3757-66.
- Selkoe, D. and Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual review of neuroscience* 26, 565-97.
- Shamgar, L., Ma, L., Schmitt, N., Haitin, Y., Peretz, A., Wiener, R., Hirsch, J., Pongs, O. and Attali, B. (2006). Calmodulin is essential for cardiac IKS channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circulation research* 98, 1055-63.
- Shimizu, T., Maeno, E. and Okada, Y. (2007). Prerequisite role of persistent cell shrinkage in apoptosis of human epithelial cells. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 59, 512-6.
- Shiozaki, E. N. and Shi, Y. (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences* 29, 486-94.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-31.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K., Gazdar, A. F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B. H., Bachman, K. E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. and Velculescu, V. E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-74.
- Sonoshita, M., Aoki, M., Fuwa, H., Aoki, K., Hosogi, H., Sakai, Y., Hashida, H., Takabayashi, A., Sasaki, M., Robine, S., Itoh, K., Yoshioka, K., Kakizaki, F., Kitamura, T., Oshima, M. and Taketo, M. M. (2011). Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer cell* 19, 125-37.
- Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M. and Keating, M. T. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 102, 1178-85.
- Spotnitz, M. D. and Lesch, M. (2006). Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. *Progress in cardiovascular diseases* 49, 42-57.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell* 1, 949-57.

- Stahlberg, A., Aman, P., Ridell, B., Mostad, P. and Kubista, M. (2003). Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of kappa and lambda immunoglobulin light chain expression. *Clinical chemistry* 49, 51-9.
- Starr, T. K., Allaei, R., Silverstein, K. A., Staggs, R. A., Sarver, A. L., Bergemann, T. L., Gupta, M., O'Sullivan, M. G., Matise, I., Dupuy, A. J., Collier, L. S., Powers, S., Oberg, A. L., Asmann, Y. W., Thibodeau, S. N., Tessarollo, L., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Cormier, R. T. and Largaespada, D. A. (2009). A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science* 323, 1747-50.
- Steinke, K., Sachse, F., Ettischer, N., Strutz-Seebohm, N., Henrion, U., Rohrbeck, M., Klosowski, R., Wolters, D., Brunner, S., Franz, W. M., Pott, L., Munoz, C., Kandolf, R., Schulze-Bahr, E., Lang, F., Klingel, K. and Seebohm, G. (2013). Coxsackievirus B3 modulates cardiac ion channels. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 4108-21.
- Strisovsky, K., Sharpe, H. J. and Freeman, M. (2009). Sequence-specific intramembrane proteolysis: identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Mol Cell* 36, 1048-59.
- Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G., Fedorenko, O., Baltaev, R., Engel, J., Knirsch, M. and Lang, F. (2006). Functional coassembly of KCNQ4 with KCNE-beta- subunits in *Xenopus* oocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 18, 57-66.
- Su, M., Mei, Y. and Sinha, S. (2013). Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *Journal of oncology* 2013, 102735.
- Suh, B. C. and Hille, B. (2007). Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides. *The Journal of physiology* 582, 911-6.
- Sun, Z. Q., Thomas, G. P. and Antzelevitch, C. (2001). Chromanol 293B inhibits slowly activating delayed rectifier and transient outward currents in canine left ventricular myocytes. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 12, 472-8.
- Szabo, I., Zoratti, M. and Gulbins, E. (2010). Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis. *FEBS letters* 584, 2049-56.
- Takumi, T., Ohkubo, H. and Nakanishi, S. (1988). Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 242, 1042-5.
- Than, B. L., Goos, J. A., Sarver, A. L., O'Sullivan, M. G., Rod, A., Starr, T. K., Fijneman, R. J., Meijer, G. A., Zhao, L., Zhang, Y., Largaespada, D. A., Scott, P. M. and Cormier, R. T. (2014). The role of KCNQ1 in mouse and human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 33, 3861-8.
- Thomas, A. M., Harmer, S. C., Khambra, T. and Tinker, A. (2011). Characterization of a binding site for anionic phospholipids on KCNQ1. *The Journal of biological chemistry* 286, 2088-100.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. and et al. (1992). A novel

heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-74.

Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M. and Barhanin, J. (2000a). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *The EMBO journal* 19, 6326-30.

Tinel, N., Diochot, S., Lauritzen, I., Barhanin, J., Lazdunski, M. and Borsotto, M. (2000b). M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit. *FEBS letters* 480, 137-41.

Tinnikov, A. A. and Samuels, H. H. (2013). A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli. *PLoS one* 8, e61085.

Tsuji, Y., Opthof, T., Kamiya, K., Yasui, K., Liu, W., Lu, Z. and Kodama, I. (2000). Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovascular research* 48, 300-9.

Tsujimoto, Y. (2002). Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Bioscience reports* 22, 47-58.

Tsujimoto, Y., Ikegaki, N., Croce, C.M. (1987). Characterization of the protein product of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene* 2, 3-7.

Unoki, H., Takahashi, A., Kawaguchi, T., Hara, K., Horikoshi, M., Andersen, G., Ng, D. P., Holmkvist, J., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Hansen, T., Nurbaya, S., Tsunoda, T., Kubo, M., Babazono, T., Hirose, H., Hayashi, M., Iwamoto, Y., Kashiwagi, A., Kaku, K., Kawamori, R., Tai, E. S., Pedersen, O., Kamatani, N., Kadowaki, T., Kikkawa, R., Nakamura, Y. and Maeda, S. (2008). SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nature genetics* 40, 1098-102.

Urban, S., Lee, J. R. and Freeman, M. (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107, 173-82.

Urban, S. and Freeman, M. (2003). Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Molecular cell* 11, 1425-34.

Urban, S. and Wolfe, M. S. (2005). Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1883-8.

Vancha, A. R., Govindaraju, S., Parsa, K. V., Jasti, M., Gonzalez-Garcia, M. and Ballesteros, R. P. (2004). Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC biotechnology* 4, 23.

Vaux, D. L. and Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 304, 499-504.

Verkerk, A. O., Wilders, R., Coronel, R., Ravensloot, J. H. and Verheijck, E. E. (2003). Ionic remodeling of sinoatrial node cells by heart failure. *Circulation* 108, 760-6.

Vosyka, O., Vinothkumar, K. R., Wolf, E. V., Brouwer, A. J., Liskamp, R. M. and Verhelst, S. H. (2013). Activity-based probes for rhomboid proteases discovered in a mass spectrometry-based assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 2472-7.

Vucic, D., Dixit, V. M. and Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 439-52.

Wang, H., Zhang, Y., Cao, L., Han, H., Wang, J., Yang, B., Nattel, S. and Wang, Z. (2002a). HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer research* 62, 4843-8.

Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E. and McKinnon, D. (1998a). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890-3.

Wang, S., Miura, M., Jung, Y. K., Zhu, H., Li, E. and Yuan, J. (1998b). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92, 501-9.

Wang, S., Wang, J. A., Li, J., Zhou, J. and Wang, H. (2008). Voltage-dependent potassium channels are involved in staurosporine-induced apoptosis of rat mesenchymal stem cells. *Cell biology international* 32, 312-9.

Wang, W., Wang, Y. G., Reginato, A. M., Glotzer, D. J., Fukai, N., Plotkina, S., Karsenty, G. and Olsen, B. R. (2004). Groucho homologue Grg5 interacts with the transcription factor Runx2-Cbfa1 and modulates its activity during postnatal growth in mice. *Developmental biology* 270, 364-81.

Wang, W. F., Wang, Y. G., Reginato, A. M., Plotkina, S., Gridley, T. and Olsen, B. R. (2002b). Growth defect in Grg5 null mice is associated with reduced Ihh signaling in growth plates. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 224, 79-89.

Wang, Y. C., Peterson, S. E. and Loring, J. F. (2014). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell research* 24, 143-60.

Wang, Z. (2004). Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 448, 274-86.

Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Huang, F., Vest, J. A., Reiken, S. R., Mohler, P. J., Sun, J., Guatimosim, S., Song, L. S., Rosemlit, N., D'Armiento, J. M., Napolitano, C., Memmi, M., Priori, S. G., Lederer, W. J. and Marks, A. R. (2003). FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 113, 829-40.

Weihofen, A., Lemberg, M. K., Ploegh, H. L., Bogyo, M. and Martoglio, B. (2000). Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the

transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 275, 30951-6.

Wen, H. and Levitan, I. B. (2002). Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 7991-8001.

Wiener, R., Haitin, Y., Shamgar, L., Fernandez-Alonso, M. C., Martos, A., Chomsky-Hecht, O., Rivas, G., Attali, B. and Hirsch, J. A. (2008). The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *The Journal of biological chemistry* 283, 5815-30.

Wilk, S. and Orłowski, M. (1983). Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *Journal of neurochemistry* 40, 842-9.

Wolf, E. V., Zeissler, A., Vosyka, O., Zeiler, E., Sieber, S. and Verhelst, S. H. (2013). A new class of rhomboid protease inhibitors discovered by activity-based fluorescence polarization. *PloS one* 8, e72307.

Woodcock, E. A., Kistler, P. M. and Ju, Y. K. (2009). Phosphoinositide signalling and cardiac arrhythmias. *Cardiovascular research* 82, 286-95.

Yang, B., Ye, D. and Wang, Y. (2013). Caspase-3 as a therapeutic target for heart failure. *Expert opinion on therapeutic targets* 17, 255-63.

Yang, M. and Brackenbury, W. J. (2013). Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in physiology* 4, 185.

Yang, X., Chang, H. Y. and Baltimore, D. (1998). Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281, 1355-7.

Yensen, C., Matar, W. and Renaud, J. M. (2002). K⁺-induced twitch potentiation is not due to longer action potential. *American journal of physiology Cell physiology* 283, C169-77.

Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. and Catterall, W. A. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* 57, 387-95.

Yu, X., Li, P., Roeder, R. G. and Wang, Z. (2001). Inhibition of androgen receptor-mediated transcription by amino-terminal enhancer of split. *Molecular and cellular biology* 21, 4614-25.

Yus-Najera, E., Santana-Castro, I. and Villarroel, A. (2002). The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *The Journal of biological chemistry* 277, 28545-53.

Zaydman, M. A. and Cui, J. (2014). PIP2 regulation of KCNQ channels: biophysical and molecular mechanisms for lipid modulation of voltage-dependent gating. *Frontiers in physiology* 5, 195.

Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohacs, T., Lopes, C. M., Jin, T. and Logothetis, D. E. (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963-75.

Zhang, J., Zhao, Z., Zu, C., Hu, H., Shen, H., Zhang, M. and Wang, J. (2013). Atrial natriuretic peptide modulates the proliferation of human gastric cancer cells via KCNQ1 expression. *Oncology letters* 6, 407-14.

Zheng, R., Thompson, K., Obeng-Gyimah, E., Alessi, D., Chen, J., Cheng, H. and McDonald, T. V. (2010). Analysis of the interactions between the C-terminal cytoplasmic domains of KCNQ1 and KCNE1 channel subunits. *The Biochemical journal* 428, 75-84.

Zhou, H. X. and McCammon, J. A. (2010). The gates of ion channels and enzymes. *Trends in biochemical sciences* 35, 179-85.

9. ANHANG

9.1. Abkürzungsverzeichnis

AES	<i>Amino-Terminal Enhancer of Split</i>
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
AKAP-9	<i>A-Kinase Anchoring Protein 9</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS	Amminopersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BACE1	<i>Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous Antagonist Killer</i>
BAX	<i>BCL-2 Associated X protein</i>
BCL-2	B-Zell Lymphoma-2
BFNC	<i>Benigne Familiar Neonatal Convulsions</i>
BH-Domäne	BCL-2 Homologie-Domäne
Bit1	<i>BCL-2 Inhibitor of transcription 1</i>
C293B	Chromanol 293 B
CAD	Caspase-aktivierte DNase
Caspasen	Cystein abhängigen Aspartat vermittelten Proteasen
Ccn	nukleäre Lokalisationssequenz
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2,-)Oktan-Triethylendiamin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DCI	3,4-Dichloroisocoumarin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFNA2	<i>autosomal dominant nonsyndromic deafness type 2</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSIR	<i>Design of Small Interfering RNA</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EndoG	Endonuklease G
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FBS	fetales Kälberserum
FKBP12	<i>FK506 binding protein with a mass of 12 kDa</i>
FRP	<i>FKBP and rapamycin binding</i>
GP-Domäne	Glycin-Prolin-reiche Domäne
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HtrA2	HtrA Serinprotease-2
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine

Iks	<i>slow rectifier Strom</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
Limp-2	lysosomales Membranprotein-2
LQT-S	<i>Long QT-Syndrome</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minuten
Mink	<i>Minimal inward potassium rectifier</i>
Nedd4.2	<i>neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like</i>
NfκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
OAG	1-Oleoyl-2-Acetyl-Glycerol
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PD	<i>pore domain</i>
PEI	Polyethyleneimine
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
POD	Peroxidase
Q-Domäne	Glutamin-reiche Domäne
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
S0-9	N-(6-Phenylhexyl)-5-Chloro-1-Naphthalensulfonamid
scr	<i>scramble</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
sek	Sekunden
sh	<i>small hairpin</i>
Six3	<i>Homeobox protein 3</i>
Six6	<i>Homeobox protein 6</i>
SP-1	<i>specificity protein-1</i>
SP-3	<i>specificity protein-3</i>
SP-Domäne	Serin-Prolin-reiche Domäne
SPP	<i>Signal Peptide Peptidase</i>
STS	Staurosporin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline-Tween</i>
TCF-4	T-Zell Faktor-4
TFIIIE	Transkriptionsfaktor II E
TLE	<i>Transducin like Enhancer of Split</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
VSD	<i>Voltage-Sensing Domain</i>
WT	Wildtyp

XIAP *X-linked inhibitor of apoptosis*

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aktionspotential eines Kardiomyozyten.	2
Abbildung 2:	Aufbau von Kv7.1.	7
Abbildung 3:	Beispiel eines Elektrokardiogramms (EKG).	9
Abbildung 4:	Vereinfachte Übersicht der verschiedenen Interaktionspartner von Kv7.1.	11
Abbildung 5:	Aufbau der Caspasen.	14
Abbildung 6:	Übersicht der BCL-2-Proteinfamilie.	17
Abbildung 7:	Vereinfacht dargestellter Signalweg der intrinsischen Apoptose.	20
Abbildung 8:	Schematische Struktur der <i>Transducin like Enhancer of Split</i> (TLE)-Familie.	21
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des pFrog3-Vektors.	30
Abbildung 10:	Übersicht der Fusions-PCR.	31
Abbildung 11:	Aufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsquelle.	47
Abbildung 12:	Topologie des Kv7.1.	48
Abbildung 13:	Kv7.1 wird an D459 zum CTF2 prozessiert.	48
Abbildung 14:	Verschiedene Caspasen können Kv7.1 zum CTF2 prozessieren.	49
Abbildung 15:	Übersicht zu potentiellen Funktionen der Proteolyse des Kv7.1.	50
Abbildung 16:	Im murinen Herzen kann nach Coxsackie B Virus (CBV)-Injektion keine vermehrte Prozessierung zum CTF2 determiniert werden.	51
Abbildung 17:	Die Expression von Kv7.1 erhöht Apoptose in SW707-Zellen.	52
Abbildung 18:	Die Kanalaktivität von Kv7.1 fördert Apoptose.	53
Abbildung 19:	Die Hemmung der Kanalaktivität von Kv7.1 führt zu weniger Apoptose.	54
Abbildung 20:	Die Mutation D459A in Kv7.1 verstärkt Apoptose.	55
Abbildung 21:	Kv7.1-D459A zeigt mehr Annexin-FITC-Färbung.	56
Abbildung 22:	Kv7.1-D459A ist pro-apoptotisch.	57
Abbildung 23:	Aufbau von Kv7.1-CTF2-myc.	58
Abbildung 24:	Die Expression vom CTF2 des Kv7.1 vermindert Annexin-V-FITC-Färbung.	58

Abbildung 25:	Die transiente Expression des Kv7.1-CTF2-eGFP vermindert Apoptose.	59
Abbildung 26:	Die subzelluläre Lokalisation von Kv7.1-CTF2-myc unter apoptotischen Bedingungen.....	59
Abbildung 27:	Das CTF2-Fragment von Kv7.1 vermindert die mRNA-Expression von <i>BAX</i> und <i>BAK</i>	60
Abbildung 28:	Die Expression von Kv7.1-CTF2-myc vermindert die Expression von <i>BAX</i> und <i>BAK</i> auf Proteinebene.	61
Abbildung 29:	Expressionsüberprüfung der stabil transfizierten Zellen.	62
Abbildung 30:	Reaktive Sauerstoffspezien akkumulieren in Hek 293 T-Zellen nach Progerin-Expression.	63
Abbildung 31:	Hek 293 T-Zellen zeigen mehr aktive Caspase-3 unter Expression von eGFP-Progerin.	63
Abbildung 32:	Alterung von Hek 293 T Zellen führt zu vermehrter Proteolyse von Kv7.1 zum CTF2.	64
Abbildung 33:	Natürlich vorkommende Mutationen in Kv7.1 beeinflussen die Prozessierung von Kv7.1 zum CTF2.....	65
Abbildung 34:	Der Austausch von Glycin 460 zu Serin in Kv7.1 vermindert die Kanalaktivität von Kv7.1.	66
Abbildung 35:	Lokalisation von A372D und G460S in Kv7.1.	67
Abbildung 36:	Kv7.1-A372D ist nicht mehr in der Lage, Calmodulin zu binden.	68
Abbildung 37:	Kv7.1 bindet unter apoptotischen Bedingungen kein Calmodulin mehr. .	69
Abbildung 38:	Calmodulin bindet nicht an Kv7.1-G460X.....	70
Abbildung 39:	Übersicht der verschiedenen potentiellen Phosphorylierungsstellen an der Schnittstelle zum CTF2 von Kv7.1.	71
Abbildung 40:	Putative Phosphorylierungsstellen an Kv7.1 können die Prozessierung zum CTF2-Fragment beeinflussen.	72
Abbildung 41:	Zwei putative Phosphorylierungsstellen in Kv7.1 beeinflussen die Kanalfunktion von Kv7.1.	73
Abbildung 42:	AES bindet Kv7.1 vor allem im C-Terminus von Kv7.1.	74
Abbildung 43:	AES ko-lokalisiert mit WT Kv7.1, CTF1-myc von Kv7.1 und CTF2-myc von Kv7.1.	75
Abbildung 44:	Das LxxLL-Motiv ist für die Bindung von AES an Kv7.1 unerheblich. ..	77
Abbildung 45:	<i>Coiled-Coil</i> Wahrscheinlichkeit von WT Kv7.1, Kv7.1-L559P, Kv7.1-L602P und Kv7.1-L559P-L602P.....	78

Abbildung 46: Die Struktur der Helix C und der Helix D von Kv7.1 haben keinen Einfluss auf die Interaktion von AES und Kv7.1.	78
Abbildung 47: Kv7.1 bindet AES in der Glutamin-reichen Domäne von AES.	80
Abbildung 48: Die nukleäre Lokalisationssequenz in AES reguliert die Kernlokalisierung von AES.	81
Abbildung 49: AES- Δ CCN ist im Vergleich zu WT AES vermehrt im Zellkern zu finden.	81
Abbildung 50: Einfluss von AES auf die Kanalfunktion von Kv7.1.	82
Abbildung 51: Die Schnittstelle zum CTF1 von Kv7.1 liegt in einem GSGF-Motiv direkt im Anschluss an die sechste Transmembrandomäne.	84
Abbildung 52: Die CTF1-Schnittstelle von Kv7.1 kann nicht auf eine einzelne Aminosäure eingeschränkt werden.	85
Abbildung 53: Natürlich vorkommende Mutationen in Kv7.1 können die Proteolyse von Kv7.1 beeinflussen.	86
Abbildung 54: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme der G348A-Mutante von Kv7.1.	87
Abbildung 55: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme der F351A-Mutante von Kv7.1.	88
Abbildung 56: Übersicht zur Schnittstelle des CTF2 in Kv7.1.	90
Abbildung 57: Übersicht zur Funktion der Proteolyse des Kv7.1.	91
Abbildung 58: Übersicht zum Einfluss der Alterung auf die Proteolyse des Kv7.1.	93
Abbildung 59: Übersicht zur Funktion des Kv7.1 in der Apoptose.	97
Abbildung 60: Übersicht zur Interaktion von AES und Kv7.1.	100
Abbildung 61: Mögliche Schnittstelle zum CTF1 in Kv7.1.	102
Abbildung 62: Übersicht zum Einfluss der Proteolyse auf die Kanalfunktion von Kv7.1.	105
Abbildung 63: Übersicht zum Einfluss der Phosphorylierung von Kv7.1 auf die Proteolyse des Kv7.1.	107

9.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht verschiedener Ionen und ihrer Konzentrationen im intrazellulären und extrazellulären Raum sowie Gleichgewichtspotentiale. ...	2
Tabelle 2:	Übersicht der fünf Kv7-Familienmitglieder.....	5
Tabelle 3:	Einteilung ausgewählter Caspasen nach Funktion und Substratspezifität.	16
Tabelle 4:	Ausgewählte Interaktionspartner von AES und die Funktion dieser Interaktion.	22
Tabelle 5:	Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien und deren Referenzen.....	25
Tabelle 6:	Auflistung aller verwendeten Vektoren sowie deren Resistenzgene.	25
Tabelle 7:	Auflistung aller verwendeten Konstrukte.	26
Tabelle 8:	Auflistung aller verwendeten Primer zur Herstellung der angegebenen Konstrukte.	27
Tabelle 9:	Auflistung der verwendeten Kits und ihrer Hersteller.	28
Tabelle 10:	Alle verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.....	28
Tabelle 11:	Zusammensetzung der PCR.	31
Tabelle 12:	Übersicht des PCR-Protokolls.....	31
Tabelle 13:	Auflistung aller verwendeten Sequenzierprimer.....	35
Tabelle 14:	Liste der verwendeten Primer und jeweiligen Sonden für die qRT-PCR.	38
Tabelle 15:	PCR-Protokoll zur Durchführung der qRT-PCR.	38
Tabelle 16:	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.	42
Tabelle 17:	Verwendete Primärantikörper im Western Blot.....	43
Tabelle 18:	Alle verwendeten Sekundärantikörper für den Western Blot.	43
Tabelle 19:	Alle verwendeten Primärantikörper in der Immunfluoreszenz.....	44
Tabelle 20:	Übersicht aller verwendeten Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz.	44

10. LEBENS LAUF

Name: Anne Strigli
Geburtsdatum: 18.04.1987
Geburtsort: Nordhausen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2012 – 2015 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Saftig

Thema: Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Proteolyse des Kv7.1

Praktisches Jahr 1. Hälfte: Löwen-Apotheke Mannheim
2011 2. Hälfte: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller Universität Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Stefan Schulz
Abschluss: 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin

Studium Pharmazie an der Ruprechts-Karls-Universität in Heidelberg
2006 – 2010 Abschluss: 1. und 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Schulausbildung Carolinum in Bernburg (an der Saale)
2000 – 2006 Abschluss: Abitur

11. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Paul Saftig und PD Dr. Michael Schwake für die Möglichkeit dieser Promotion sowie für die wissenschaftliche Betreuung und konstruktiven Diskussionen in den letzten Jahren bedanken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Thomas Röder für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern der AG Saftig für die schöne Zeit in den letzten Jahren.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Insbesondere danke ich meinen Eltern, Sigrid Strigli und Ralf Konetzny, für die fortwährende Unterstützung während des Studiums und der Promotion, meinen Brüdern, Christian und Manuel Strigli, für ihre ruhige Ausstrahlung und meiner Oma Christa Weinhardt und meinen Freundinnen Katharina Gressler und Tina Meißner für den andauernden Glauben an mich.

Besonderer Dank gilt aber meinem Freund Kenneth Peuker ohne dessen Unterstützung in den letzten Jahren diese Arbeit vielleicht nie entstanden wäre.

12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2012 bis September 2015 am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. Paul Saftig am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Hiermit versichere ich an Eides statt,

- Dass die Arbeit, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene ist und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel selbstständig verfasst wurde,
- Dass die Arbeit weder ganz, noch zu Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt oder zur Veröffentlichung eingereicht wurde,
- Dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Die Bestimmungen der Promotionsprüfungsordnung sind mir bekannt.

Kiel, den 03. September 2015

Anne Strigli