

Molekulare Determinanten der Kaliumkanalblockade durch die
Substanz 293B und der Inaktivierung der α -Untereinheit KCNQ1 im
kardialen I_{Ks} -Kanalkomplex

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christian Lerche
aus Düsseldorf

Frankfurt 2001

DF1

Abkürzungen

AS	Aminosäure
BFNC	benigne familiäre neonatale Konvulsionen
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CHO	chinese hamster ovary
cRNA	RNA, die aus cDNA durch <i>in-vitro</i> -Synthese erhalten wurde
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Dideoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
H5	Porenschleife von Kaliumkanälen
HERG	human <i>ether-a-go-go</i> related gene, das für den HERG-Kanal kodiert
hMinK	MinK-Protein des Menschen
hKCNQ1	KCNQ1-Protein des Menschen
IC ₅₀	halbmaximale Wirkkonzentration (Inhibition) eines Stoffes
I_{Kr}	$I_{\text{Kalium rapid}}$: schnell aktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit, die durch HERG-Kanäle induziert wird
I_{Ks}	$I_{\text{Kalium slow}}$: langsam aktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit, wird synonym für den der Leitfähigkeit zugrunde liegenden Kaliumkanal benutzt
I_{Kur}	$I_{\text{Kalium ultra rapid}}$: sehr schnell aktivierende, nicht inaktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit
IsK	β -Untereinheit des I_{Ks} -Kanals, auch MinK genannt
I_{to}	$I_{\text{transient outward}}$: sehr schnell aktivierende, schnell inaktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit
kb	Kilobase

<i>KCNE1</i>	Gen der I_{Ks} - β -Untereinheit MinK
KCNQ1	Kaliumkanal, α -Untereinheit des I_{Ks} -Kanals, auch KvLQT1 genannt
Kv-Kanäle	Familie von spannungsabhängigen Kaliumkanälen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LQT	Long QT
LQTS	Long-QT-Syndrom
MinK	minimaler Kaliumkanal, β -Untereinheit des I_{Ks} -Kanals
MirP	MinK related protein, wobei MirP1 das Protein des Gens <i>KCNE2</i> darstellt, MirP2 das von <i>KCNE3</i> und MirP3 das von <i>KCNE4</i>
mKvLQT1	KvLQT1-Protein der Maus
OD _x	Optische Dichte bei x nm
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Q1,Q2,Q3	KCNQ1-, KCNQ2-, KCNQ3-Protein
QT-Zeit	Intervall von der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle im EKG; charakterisiert die ventrikuläre Erregungsausbreitung und -rückbildung
rKCNQ3	KCNQ3-Protein der Ratte
rMinK	MinK-Protein der Ratte, gilt entsprechend für andere Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
S1-S6	Transmembransegmente 1-6 eines Kaliumkanals
τ	Zeitkonstante tau; τ_{deakt} für die Deaktivierung, τ_{onset} für das Einsetzen der Inaktivierung, $\tau_{recovery}$ für die Erholung von der Inaktivierung
TE-Puffer	Puffer, der Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und EDTA enthält
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TEVC	<i>Two Electrode Voltage Clamp</i> ; Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
WT	Wild-Typ

Abkürzungen der Aminosäuren: A Alanin, C Cystein, D Aspartat, E Glutamat, F Phenylalanin, G Glycin, H Histidin, I Isoleucin, K Lysin, L Leucin, M Methionin, N Asparagin, P Prolin, Q Glutamin, R Arginin, S Serin, T Threonin, V Valin, W Tryptophan, Y Tyrosin

Meinen Eltern gewidmet

I	EINLEITUNG.....	4
I.A	Die Familie der KCNQ-Kaliumkanäle	6
I.B	Das LQT-Syndrom.....	13
I.C	Problemstellung und angewendete Techniken.....	16
II	MATERIAL UND METHODEN.....	17
II.A	Molekularbiologische Methoden.....	17
II.A.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	17
II.A.1.a	Gewinnung von Plasmid-DNA	17
	Minipräparation	17
	Midipräparation	18
II.A.1.b	Reinigen von Nukleinsäuren.....	18
	DNA-Präzipitation.....	18
	RNA-Präzipitation.....	19
	Phenol/Chloroform-Extraktion	19
	Aufreinigen von DNA aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen über Qiagensäulen.....	19
II.A.1.c	Analyse von Nukleinsäuren	20
	Enzymatische Restriktion	20
	Quantitative und qualitative photometrische Analyse	21
	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	21
	RNA-Agarosegelelektrophorese.....	21
	Sequenzierung von DNA.....	22
II.A.1.d	Modifikation von DNA	24
	Linearisierung von Plasmid-DNA zur cRNA-Synthese	24
	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	24
	Ligation von DNA-Fragmenten.....	24
	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
II.A.1.e	cRNA-Synthese.....	27
II.A.1.f	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	28
	Elektroporation	29
	Hitzeschock.....	29
II.A.2	Spezielle molekularbiologische Methoden.....	30
II.A.2.a	Einführung einer Punktmutation	30

II.A.2.b	Konstruktion chimärer Proteine	31
II.A.2.c	Klonierung des hKCNQ5	32
II.A.2.d	Northern-Blot-Analyse	32
II.B	Oozytenpräparation.....	33
II.B.1	Oozytenisolierung.....	33
II.B.2	Injektion von cRNA in Oozyten.....	35
II.C	Elektrophysiologische Methoden	37
II.C.1	Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp-Methode	37
II.C.2	Aufbau des elektrophysiologischen Messstandes	39
II.D	Datenauswertung und Statistik.....	40
II.D.1	Datenauswertung	40
II.D.2	Statistik.....	41
II.E	Computer-gestützte Proteinmodellierung.....	42
III	ERGEBNISSE.....	43
III.A	Molekulare Charakterisierung der Blockade von KCNQ1 und I_{Ks} durch das Chromanol 293B.....	43
III.A.1	Spezifität der Blockade durch 293B und der Einfluss von MinK	44
III.A.1.a	Inhibition KCNQ1-verwandter Kaliumkanäle durch 293B	44
III.A.1.b	Klonierung, Charakterisierung und Bestimmung der Sensitivität gegenüber 293B eines neuen Mitglieds der KCNQ-Familie	47
III.A.1.c	Der Einfluss von MinK auf die Spezifität der Kaliumkanalblockade durch 293B	52
III.A.2	Stereospezifität von Chromanolen und Chromanen bezüglich KCNQ1 und I_{Ks}	54
III.A.3	Der Einfluss von MinK auf die Kaliumkanalblockade durch 293B auf molekularer Ebene	59
III.A.4	Der Einfluss von KCNQ1 auf die Kaliumkanalblockade durch 293B auf molekularer Ebene	62
III.A.4.a	Eingrenzung der Bindungsregion von 293B durch funktionelle Chimären.....	64
III.A.4.b	Molekulare Charakterisierung der Affinität von 293B an KCNQ1 durch Punktmutationen.....	71
III.A.4.c	Einfluss von Punktmutationen in KCNQ2 auf die Sensitivität gegenüber 293B.....	73
III.A.4.d	Identifizierung weiterer für die Affinität von 293B relevanter Reste durch Computer-gestützte Modellierung.....	75
III.A.4.e	Validierung des Modells	79

III.A.4.f	Überprüfung der Bindungsstelle von Chromanolen durch die potentere Substanz HMR 1556	81
III.B	Die Inaktivierung von KCNQ1	83
III.B.1	Die molekularen Determinanten der KCNQ1-Inaktivierung	84
III.B.1.a	Lösungsansatz	84
III.B.1.b	Identifizierung der für die Inaktivierung notwendigen Proteinregion	85
III.B.1.c	Sensitivität der nicht-inaktivierenden Mutanten gegenüber 293B	89
III.B.1.d	Prüfung der Kompatibilität der Ergebnisse mit dem in dem Abschnitt III.A erstellten Modell	90
III.B.2	Die KCNQ1-Inaktivierung als pathophysiologischer Mechanismus	90
IV	DISKUSSION	93
IV.A	Die Blockierung von I_{Ks}-Kanälen durch 293B	93
IV.A.1	Spezifität von 293B	93
IV.A.2	Stereoselektivität von 293B und verwandter I_{Ks} -Blocker	95
IV.A.3	Ist MinK an einer Bindungsstelle von 293B beteiligt?	96
IV.A.4	Molekulare Determinanten der Affinität von 293B an KCNQ1	98
IV.B	Die KCNQ1-Inaktivierung	100
IV.C	Das 3D-Modell von KCNQ1	102
IV.D	<i>In-vivo</i>-Relevanz der Ergebnisse	104
IV.D.1	Relevanz der Ergebnisse für die Entwicklung neuartiger Antiarrhythmika	104
IV.D.2	Physiologische Relevanz der Ergebnisse der Inaktivierungstudie	105
V	ZUSAMMENFASSUNG	107
VI	LITERATURVERZEICHNIS	109
VII	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	124

I Einleitung

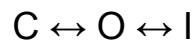
Ionenkanäle sind membranständige Proteine, die selektive Poren für Na⁺-, K⁺-, Cl⁻- oder Ca²⁺-Ionen bilden und die Grundlage der elektrischen Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen darstellen (Hille, 1992). Sie vermitteln über die Umwandlung von Reizen in Rezeptorpotentiale die Kommunikation mit der Umwelt und leiten Nachrichten innerhalb des Körpers über Aktionspotentiale und synaptische Übertragungsvorgänge weiter. An Effektororganen wie z.B. dem Herzmuskel setzen sie das elektrische Signal, das Aktionspotential, in eine mechanische Muskelkontraktion um. Es erfordert eine präzise Steuerung des Schaltverhaltens, das heisst des Öffnens und Schließens, von Ionenkanälen, um den korrekten Ablauf solcher Vorgänge zu garantieren. Bei der Fortleitung des Aktionspotentials ist es die Membranspannung, die das Schaltverhalten von Natrium- und Kaliumkanälen über spezifische Konformationsänderungen der Proteine kontrolliert; bei synaptischen Übertragungsvorgängen sind es Liganden, wie z.B. Acetylcholin. Zudem sind Ionenkanäle an vielen anderen Regulationsvorgängen von nicht primär elektrisch erregbaren Zellen beteiligt, bei denen sie über intrazelluläre Botenstoffe oder auch das Zellvolumen geschaltet werden.

Die physiologische Bedeutung von Ionenkanälen wird auch dadurch deutlich, dass erwünschte und unerwünschte Wirkungen vieler Medikamente auf eine Ionenkanalinteraktion zurückzuführen sind (Ashcroft, 2000). So wird der kardiale Kaliumkanal HERG (human ether-a-go-go related gene, Warmke und Ganetzky, 1994) durch Antiarrhythmika wie z.B. Dofetilid oder das D-Sotalol inhibiert, wodurch Herzrhythmusstörungen verhindert werden. Das Antiallergikum Terfenadin hingegen wurde 1998 vom Markt genommen, da es durch seine inhibitorische Wirkung auf den HERG-Kanal bei einigen Patienten zum Tode führende Herzrhythmusstörungen verursachte (Davies *et al.*, 1989; Suessbrich *et al.*, 1996a). Das macht deutlich, wie empfindlich der individuelle Organismus auf Veränderungen des elektrischen Schaltverhaltens reagiert.

Aufgrund der fundamentalen Bedeutung von Ionenkanälen ist auch zu erwarten, dass Mutationen in Kanalproteinen zu pathologischen Störungen der elektrophysiologischen Erregbarkeit führen. In den letzten 10-15 Jahren wurde durch die Kombination von elektrophysiologischen und molekulargenetischen Methoden eine ständig steigende Anzahl solcher krankheitsverursachenden Kanalmutationen entdeckt. Es wurde der Begriff der so genannten Ionenkanalerkrankung geschaffen (Lehmann-Horn und Rüdel, 1996). Dahinter verbirgt sich eine heterogene Gruppe seltener Erbkrankheiten mit interessantem Modellcharakter für die Pathophysiologie und Therapie der sehr viel häufiger auftretenden, sporadischen Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik. Die Ionenkanalerkrankungen sind

durch Funktionsstörungen der Muskulatur oder des Nervensystems, das heisst durch Erregungsstörungen gekennzeichnet, was sich in Herzrhythmusstörungen oder auch epileptischen Anfällen äußern kann. Die Symptome lassen sich häufig durch bestimmte Trigger provozieren, wie z.B. körperliche Anstrengung.

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle sind für die Generation des Aktionspotentials mitverantwortlich. Sie sind beim Ruhemembranpotential üblicherweise geschlossen und öffnen durch die Membrandepolarisation während eines Aktionspotentials. Manche Kanäle inaktivieren anschließend. Es gibt folglich mindestens drei prinzipielle Konformationszustände dieser Proteine, einen Ruhezustand (geschlossen oder "closed"), einen offenen (O) und einen inaktivierten Zustand (I). Diese drei Zustände lassen sich in der einfachsten Form wie in dem folgenden Schaltschema darstellen:



Der Übergang vom Ruhezustand in den offenen oder aktivierten Zustand wird als Aktivierung bezeichnet, die retrograde Konformationsänderung als Deaktivierung. Sie tritt bei einer Repolarisation der Membran ein. Der Übergang von dem aktivierten in den inaktivierten Zustand wird als Inaktivierung und die Rückreaktion als Erholung von der Inaktivierung bezeichnet (Ashcroft, 2000).

Die Struktur der Familie spannungsgesteuerter Ionenkanäle ist in der Evolution konserviert. Diese Kanäle bestehen aus vier Haupt- (α -) Untereinheiten, die aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6) zusammengesetzt sind (siehe auch Abbildung I.1). Die S4-Segmente enthalten je 4-8 positiv geladene Aminosäuren, die die Spannungsabhängigkeit des Kanals ausmachen. Sie bilden den so genannten Spannungssensor, der sich in Abhängigkeit von der Membranspannung relativ zu anderen Teilen des Proteins bewegt (Stühmer *et al.*, 1989; Yang und Hom, 1995; Yang *et al.*, 1996) und dadurch Konformationsänderungen auslöst, die die Kanalpore öffnen und schließen können. Die Pore selbst (H5) mit dem Selektivitätsfilter, der nur bestimmte Ionen durchlässt, wird von den Schleifen zwischen den Segmenten S5 und S6 gebildet (Heinemann *et al.*, 1992). Bei Natrium und Kalziumkanälen werden alle vier zusammenhängenden Untereinheiten durch ein Gen kodiert. Die Untereinheiten sind dabei unterschiedlich. In Kaliumkanälen bilden meist vier identische Untereinheiten eines Gens einen funktionellen Kaliumkanal. Es können aber auch Heteromere aus Untereinheiten verschiedener, aber verwandter Kaliumkanäle geformt werden (Ashcroft, 2000).

Die Inaktivierung ist eine intrinsische Eigenschaft bestimmter spannungsgesteuerter Ionenkanäle, und kann als die Fähigkeit beschrieben werden, nach vorangegangener Öffnung

bei weiterbestehender Depolarisation durch einen anderen Mechanismus wieder zu schließen. Man unterscheidet zwischen einer schnellen N-Typ-Inaktivierung, und einer langsameren C-Typ-Inaktivierung. Bei Kaliumkanälen funktioniert die N-Typ-Inaktivierung nach einem ursprünglich für den Natriumkanal vorgeschlagenen "ball and chain"-Mechanismus (Armstrong und Bezanilla, 1977), bei dem der an einer Proteinkette hängende N-terminale Ball aus ca. 20 Aminosäuren die Pore von der intrazellulären Seite her verschließt (Hoshi *et al.*, 1991). Die Ballstruktur kann alternativ auch in einer β -Untereinheit lokalisiert sein (Rettig *et al.*, 1994), die sich mit den α -Untereinheiten zusammenlagert. Der Rezeptor für diesen Ball wird zumindest teilweise durch die intrazellulär liegende Schleife zwischen den Segmenten S4 und S5 gebildet (Holmgren *et al.*, 1996; Isacoff *et al.*, 1991). Eine andere Art der Inaktivierung ist die langsamere C-Typ-Inaktivierung. So inaktiviert der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv2.1 auch noch nach Deletion des N- und/oder C-Terminus (van Dongem *et al.*, 1990). Weitere Studien zeigten, dass die Porenregion H5 und das S6-Segment entscheidend an dieser Art der Inaktivierung beteiligt sind. Mutationen in diesen Regionen führen zu einer dramatisch veränderten Inaktivierung (Busch *et al.*, 1991; Lopez-Barneo *et al.*, 1993). Liu *et al.* (1996) zeigten schließlich, dass die äußere Pore bei dieser Inaktivierungsart ihre Konformation ändert. Für spannungsabhängige Kaliumkanäle (sogenannte Kv-Kanäle, K für Kalium und v für "voltage") wurden diese beiden Inaktivierungen intensiv in *Shaker*-Kanälen untersucht und werden daher auch als *Shaker*-ähnliche N- und C-Typ-Inaktivierungen bezeichnet. Der *Shaker*-Kaliumkanal ist der erste klonierte spannungsabhängige Kaliumkanal und stammt aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Papazian *et al.*, 1987). Im Menschen entsprechen die Kanäle der Kv1-Familie diesem *Drosophila*-Kanal.

I.A Die Familie der KCNQ-Kaliumkanäle

Kaliumkanäle stellen wahrscheinlich die Klasse von Ionenkanälen mit dem höchsten Grad an Variabilität dar. Das Genom von *Caenorhabditis elegans* kodiert über 60 verschiedene Kaliumkanäle und in Säugern wird eine noch größere Anzahl angenommen (Bargmann, 1998). Es gibt ungefähr zehn Kaliumkanalgene, von denen bekannt ist, dass sie bei bestimmten menschlichen Erbkrankheiten mutiert vorliegen können (Jentsch, 2000). Vier dieser Mutationen kommen in der kleinen Familie der spannungsabhängigen KCNQ-Kanäle vor. Zunächst wurde KvLQT1 (heute KCNQ1 genannt) als ein Kanal identifiziert, der für das Long-QT-Syndrom (LQTS) verantwortlich ist (Jervell und Lange-Nielson, 1957). LQTS ist eine Erbkrankheit, die zu Arrhythmien und plötzlichem Herztod führen kann. Hierbei kommt es zu einer verlängerten QT-Zeit im Elektrokardiogramm durch den Repolarisationsdefekt der Herzmuskelzelle, verursacht durch den eingeschränkt wirksamen Kaliumkanal. Drei weitere

Kanalproteine wurden identifiziert (KCNQ2-4), die spezifisch neuronal exprimiert werden und bei vorliegendem genetischen Defekt alle eine Krankheit induzieren können. So können Mutationen in dieser Gen-Familie auch zu Epilepsie führen (Mutationen in KCNQ2 und KCNQ3, Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998). Das Syndrom wird auch als "benigner Neugeborenenkrampf" bezeichnet (BFNC, steht für benign familial neonatal convulsions). Mutationen in KCNQ4 können eine Zelldegeneration bewirken, die zu progredientem Hörverlust führt (Kubisch *et al.*, 1999).

KCNQ2 und KCNQ3 zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster in verschiedenen Unterregionen des Gehirns (Biervert *et al.*, 1998; Schröder *et al.*, 1998; Yang, Levesque *et al.*, 1998; Wang, Pan *et al.*, 1998; Tinel *et al.*, 1998). Nach Koexpression von KCNQ2 mit KCNQ3 in *Xenopus*-Oozyten kann man mindestens 10-fach größere Ströme messen als nach Expression homomerer KCNQ2-Kanäle. Die Expression von KCNQ3-Homomeren führt dagegen zu Strömen mit kaum messbarer Amplitude (Schröder *et al.*, 1998; Yang, Levesque *et al.*, 1998; Wang, Pan *et al.*, 1998). Nach der Expression von KCNQ2 mit KCNQ3 zeigen die Kanäle auch veränderte biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften, was vermuten lässt, dass sich neue heteromere Kanäle aus KCNQ2- und KCNQ3-Untereinheiten bilden. Die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der Heteromere entsprechen weitgehend denen der Kanäle, die für den des nativen neuronalen M-Strom verantwortlich sind (Wang, Pan *et al.*, 1998; Brown und Adams, 1980), welcher die neuronale Erregbarkeit reguliert. Analog zu dem nativen M-Strom wird die Aktivität von KCNQ2/KCNQ3-Strömen signifikant durch Muscarinrezeptoragonisten wie z.B. Carbachol gehemmt, wenn M₁-muscarinische-Acetylcholinrezeptoren in dem Expressionssystem anwesend sind (Wang, Pan *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 2000; Selyanko *et al.*, 2000; auf dieser Hemmung beruht auch ursprünglich der Name des M-Stroms). Wie schon zuvor erwähnt wurde, können KCNQ2- und KCNQ3-Mutationen Epilepsie verursachen, die durch eine elektrische Übererregbarkeit im Gehirn gekennzeichnet ist. Dass der M-Strom die neuronale Erregbarkeit reguliert und dass M-Strom-Kanäle und KCNQ2/KCNQ3-Heteromere sich in ihren Eigenschaften so ähnlich sind, spricht dafür, dass KCNQ2/KCNQ3-Heteromere den M-Strom im Gehirn bilden.

KCNQ4 zeigt ein von den beiden genannten Schwesterproteinen leicht abweichendes Expressionsmuster. Die Koexpression mit KCNQ3 resultiert aber ebenso in einer vergrößerten Stromamplitude von KCNQ4 (Kubisch *et al.*, 1999), was zu der interessanten Annahme führt, dass unterschiedliche KCNQ-Untereinheiten sich zu verschiedenen M-Kanal-Varianten im Nervensystem zusammenlagern können. KCNQ4 wird wie KCNQ2 und KCNQ3 durch den M₁-Rezeptor moduliert (Selyanko *et al.*, 2000).

KCNQ1 ist der einzige Kanal dieser Familie, der mit keinem anderen Mitglied Heteromere bilden kann. Aber auch er wird durch den M_1 -Rezeptor moduliert (Selyanko *et al.*, 2000). Für KCNQ1 sind zwei kleine, nur eine Transmembrandomäne enthaltende β -Untereinheiten bekannt, die beide einen außergewöhnlichen Effekt auf das Schaltverhalten des Kanals haben. MinK (auch Isk oder KCNE1 genannt, Takumi *et al.*, 1988) vergrößert die Stromamplitude und verlangsamt die Stromkinetik des KCNQ1-Kanals. Für MinK wurde früher vermutet, dass es alleine imstande ist, einen funktionellen Kaliumkanal zu bilden. In *Xenopus*-Oozyten induzierte die Expression dieses Proteins einen langsam aktivierenden Kaliumstrom, der dem I_{Ks} -Strom im Herzen sehr ähnlich war. Später identifizierten Sanguinetti *et al.* (1996) einen endogenen KCNQ1-Kanal in *Xenopus*-Oozyten, dessen Strom erst durch die Interaktion mit MinK messbare Amplituden erreicht. MinK bildet zusammen mit KCNQ1 im Herzen die I_{Ks} -Leitfähigkeit (Sanguinetti *et al.*, 1996; Barhanin *et al.*, 1996; siehe auch Abbildung I.1). KCNE3 (Abbott *et al.*, 1999) ist mit dem MinK-Protein strukturell nahe verwandt. Es wurde vor kurzem von Schröder *et al.* (2000) gezeigt, dass KCNQ1 seine Spannungsabhängigkeit bei Koexpression mit diesem Protein verliert. Es entsteht ein permanent offener Kaliumkanal. Nach *in-situ*-Hybridisierung und dem Vergleich mit nativen Strömen vermuteten die Autoren, dass dieses Heteromer einen für die intestinale Chloridsekretion wichtigen Kaliumkanal darstellt.

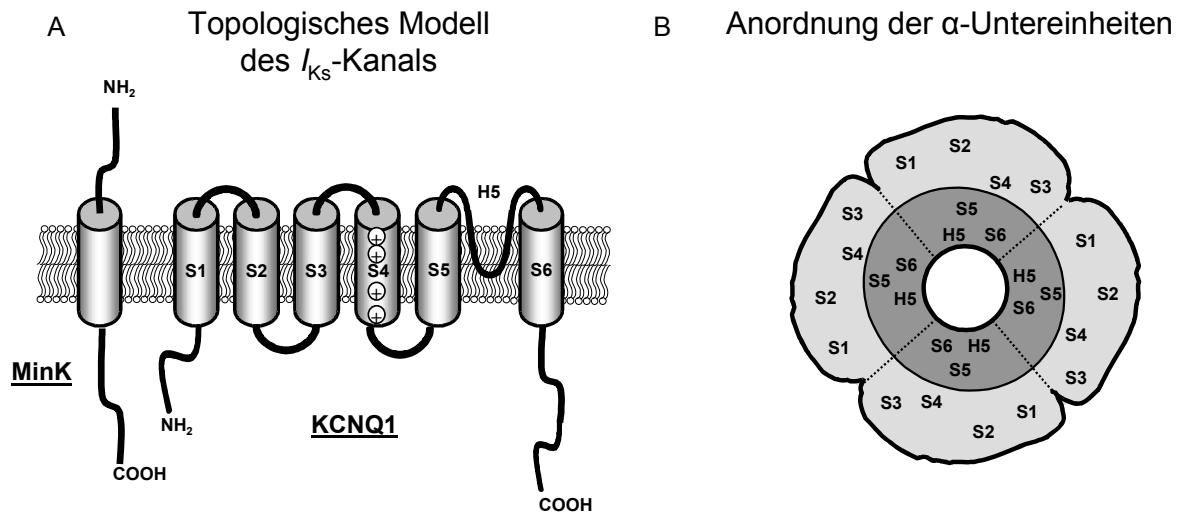


Abbildung I.1: Modell des molekularen Aufbaus des I_{Ks} -Kanals. In **A** ist die Lage der beiden Untereinheiten in der Zytoplasmamembran skizziert. MinK hat dem Modell nach nur eine Transmembrandomäne, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus. KCNQ1 zeigt wahrscheinlich den typischen Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals mit sechs Transmembrandomänen und im Zytosol lokalisierten Termini. Der Spannungssensor wird im S4-Segment durch positive Ladungen gebildet. Zwischen S5 und S6 liegt die Porenschleife H5, die den Selektivitätsfilter in der Pore bildet. In **B** ist die Anordnung der vier KCNQ1-Untereinheiten in einem funktionellen Kanal skizziert. Der innere dunklere Ring stellt die Porenregion dar, in der wahrscheinlich nur S6 und H5 den eigentlichen Ionenpfad umgeben.

Eine weitere Eigenschaft, die innerhalb der KCNQ-Familie bisher nur für den KCNQ1-Kanal beschrieben wurde, ist seine Fähigkeit zu inaktivieren. Diese Inaktivierung kann durch die Interaktion mit MinK aufgehoben werden (Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998; Pusch *et al.*, 1998), und scheint daher für physiologische I_{KS} -Ströme im Herzen keine Rolle zu spielen. Die Inaktivierung unterscheidet sich von der klassischen N- und C-Typ-Inaktivierung in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften. Sie ist schwach spannungsabhängig und unabhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration, während die N-Typ-Inaktivierung spannungsunabhängig eintritt und die C-Typ-Inaktivierung eine starke Abhängigkeit von extrazellulärem Kalium zeigt.

Zu dem ältesten Mitglied der KCNQ-Familie (KCNQ1) sind einige Spezieshomologe kloniert worden (siehe Abbildungen I.2 und I.3). Es ist interessant, dass sich ihre Eigenschaften trotz der hohen Homologie durchaus voneinander abheben. KCNQ1-Kanäle aus dem Hai (sKCNQ1, Waldegger *et al.*, 1999) zeigen eine veränderte Kinetik in Verbindung mit MinK verglichen mit humanen KCNQ1/MinK-Heteromeren. Der Klon aus *Caenorhabditis elegans* (kqt1, Wei *et al.*, 1996) zeigt als Homomer einen sehr langsam aktivierenden Strom. Der Mausklon (mKCNQ1) hingegen verhält sich wie das humane Protein (Barhanin *et al.*, 1996).

KCNQ-Kanäle zeigen ein differentes pharmakologisches Verhalten. Alle werden durch Linopirdin, eine möglicherweise als Antidementivum wirksame Substanz, potent inhibiert (Wang, Pan *et al.*, 1998; Kubisch *et al.*, 1999). Die Substanz wurde zuvor als M-Kanalblocker beschrieben (Lamas *et al.*, 1997). Auch die verwandte Substanz XE991 blockiert KCNQ1-3 in ähnlicher Weise (Wang, Pan *et al.*, 1998). Extrazellulär appliziertes TEA (Tetraethylammonium), ein typischer Blocker von Kaliumkanalporen, inhibiert hingegen sämtliche Kanäle in unterschiedlicher Weise (Hadley *et al.*, 2000). Während KCNQ2 durch 0,3 mM TEA halbmaximal inhibiert wird, wird der gleiche Effekt bei KCNQ4 mit 3,0 mM, bei KCNQ1 mit 5,0 mM und bei KCNQ3 mit $\gg 30$ mM erreicht. Wie schon für *Shaker*-Kaliumkanäle gezeigt wurde (Mackinnon und Yellen, 1990), hängt die TEA-Sensitivität von bestimmten Aminosäuren in der äußeren Porenregion ab. Tatsächlich unterscheiden sich auch die KCNQ-Kanäle an diesen Positionen, und Hadley *et al.* (2000) konnten durch eine entsprechende Punktmutation in KCNQ3 eine vielfach höhere TEA-Sensitivität erzeugen. Da durch einen Defekt in KCNQ2 oder KCNQ3 eine Epilepsie verursacht werden kann, ist zu erwarten, dass eine Aktivierung solcher Ströme *in vivo* antikonvulsiv wirkt. Dies wurde kürzlich bestätigt, da Retigabin, eine Substanz mit antikonvulsiver Potenz, KCNQ2/KCNQ3-Ströme aktiviert (Rundfeldt und Netzer, 2000).

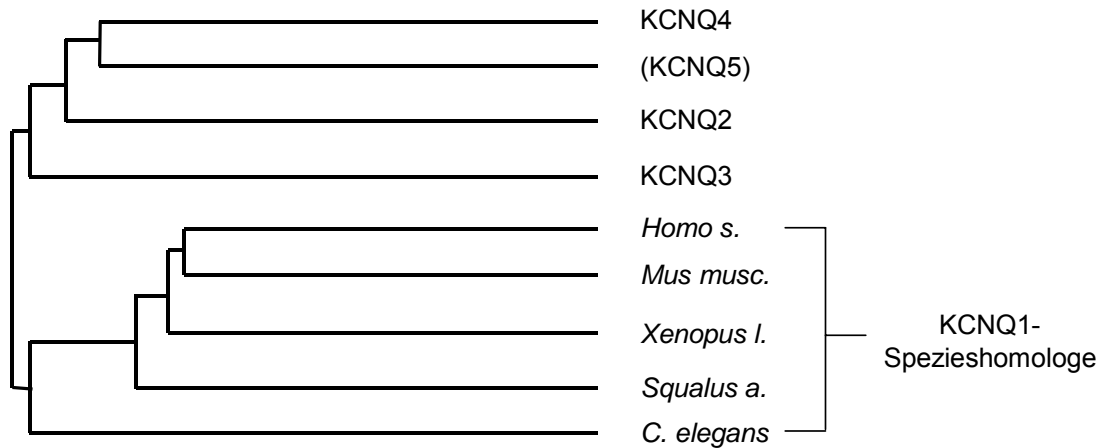


Abbildung I.2: Phylogenetischer Stammbaum der KCNQ-Kanäle (Abkürzungen siehe Abbildung I.3). Die Länge der Balken sagt hier nichts über den Abstammungsgrad aus, der nur durch die Verzweigungen skizziert ist. Der KCNQ5-Kanal wurde innerhalb dieser Arbeit kloniert (siehe Abschnitt III.A.1.b) und zum Zwecke einer besseren Übersicht hier mit eingeführt.

Des Weiteren sind Substanzen bekannt, die die kardiale I_{Ks} -Leitfähigkeit inhibieren (I für Strom, K für Kalium und s für "slow"). Diese Leitfähigkeit bildet zusammen mit I_{Kr} (r für "rapid") den verzögerten Gleichrichter-Strom ("delayed rectifier") im Herzen, der für die späte Phase der Membrandepolarisation während eines Aktionspotentials verantwortlich ist (Sanguinetti und Jurkiewicz, 1990). I_{Kr} -Inhibitoren sind als Klasse-III-Antiarrhythmika auf dem Markt (z.B. Dofetilid, D-Sotalol). I_{Ks} -Blocker wurden schon früh (Sanguinetti und Jurkiewicz, 1991, Sanguinetti *et al.*, 1991; Jurkiewicz und Sanguinetti, 1993) als im Vergleich zu klassischen Substanzen möglicherweise bessere Antiarrhythmika diskutiert. Die I_{Ks} -Komponente ist unter β -adrenerger Stimulation gegenüber der I_{Kr} -Komponente erhöht. Unter solchen Stressbedingungen treten besonders häufig Arrhythmien auf, die ein I_{Ks} -Blocker unterdrücken könnte. Das Chromanol 293B (Lohrmann *et al.*, 1995) sowie eine Klasse von Benzodiazepinen (Selnick *et al.*, 1997) blockieren I_{Ks} -Kanäle potenter als homomere KCNQ1-Kanäle (Busch *et al.*, 1997; Selnick *et al.*, 1997). Zur Blockade anderer KCNQ-Kanäle durch diese Substanzen ist bisher nichts bekannt.

Einleitung

<i>Homo s.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~ M A A A	S S P P R A E R K R	14
<i>Mus m.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	0
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ M S S E Q P A	7
<i>Squalus a.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	M S S E V K S R W S	10
<i>C. elegans</i>	M S Q A S Q E D N D	G G D L L S P E S P	M T P D G M I L A R	M P W H P G L I G N	40

<i>Homo s.</i>	W G W G R L F G A R	R G S A G L A K K C	P F S L E L A E G G	P A G G A L Y A P I	54
<i>Mus m.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	0
<i>Xenopus l.</i>	W T F G L F T P D Q	N K Q A P L E M N E	N A I N S L Y E A I	P L P . . . Q D G S	44
<i>Squalus a.</i>	G S G S Q K S G T A	R K P T M L E M A E	N A A S R H Y E P V	P L P . L Q R S N S	49
<i>C. elegans</i>	W N T V K S V S C S	M L N G D E T D Q A	A P S D E Q Q E A G	S S S A I G Q E S R	80

<i>Homo s.</i>	A P G A P G P A P P	A S P A A . P A A P	P V A S D L G P R P	P V S L D P R V S I	93
<i>Mus m.</i>	~ ~ ~ ~ ~ M	S T P V S . P A . .	P A P A D L G P R P	R V S L D P R V S I	28
<i>Xenopus l.</i>	S N G Q R Q E D R Q	A N S F E . L K R E	T L V A T D P P R P	T I N L D P R V S I	83
<i>Squalus a.</i>	P D S S T D K N P E	S R A A D . S R A E	V I I N P D I P P K	A I A L . P . L S R	86
<i>C. elegans</i>	K T V V F Q E P D I	G F P S E H D Q L T	T L H D S E E G N R	K M S L V G K P L T	120

<i>Homo s.</i>	Y S T R R P V L A R	T H V Q G R V Y N F	L E R P T G W K C F	V Y H F A V F L I V	133
<i>Mus m.</i>	Y S A R R P L L A R	T H I Q G R V Y N F	L E R P T G W K C F	V Y H F T V F L I V	68
<i>Xenopus l.</i>	Y S G R R P L L S R	T N I Q G R V Y N F	L E R P T G W K C F	V Y H F T V F L I V	123
<i>Squalus a.</i>	Y R G R N P F F S K	V N I Q G R T Y N F	L E R P T G W K C F	I Y H F T V F L I V	126
<i>C. elegans</i>	Y K N Y R T D Q R F	R R M Q N K M H N F	L E R P R G W K A A	T Y H L A V L F M V	160

	-----S1-----		-----S2-----		
<i>Homo s.</i>	L V C L I F S V L S	T I E Q Y A A L A T	G T L F W M E I V L	V V F F G T E Y V V	173
<i>Mus m.</i>	L V C L I F S V L S	T I E Q Y A A L A T	G T L F W M E I V L	V V F F G T E Y V V	108
<i>Xenopus l.</i>	L C L I F S V L S	T I Q Q Y N N L A T	E T L F W M E I V L	V V F F G A E Y V V	163
<i>Squalus a.</i>	L V C L I F S V M S	T I E Q Y H Y F A N	R A L V W M E I V L	V V F F G T E Y I V	166
<i>C. elegans</i>	L M C L A L S V F S	T M P D F E V N A T	I V L Y Y L E I V F	V I W L A T E Y I C	200

	-----S3-----				
<i>Homo s.</i>	R L W S A G C R S K	Y V G L W G R L R F	A R K P I S I I D L	I V V V A S M V V L	213
<i>Mus m.</i>	R L W S A G C R S K	Y V G I W G R L R F	A R K P I S I I D L	I V V V A S M V V L	148
<i>Xenopus l.</i>	R L W S A G C R S K	Y V G V W G R L R F	A R K P I S V I D L	I V V V A S V I V L	203
<i>Squalus a.</i>	R L W S A G C R S K	Y V G F W G R L R F	A R K P I S I I D L	I V V V A S V I V L	206
<i>C. elegans</i>	R V W S A G C R S R	Y R G I S G R I R F	A T S A Y C V I D I	I V I L A S I T V L	240

	-----S4-----				
<i>Homo s.</i>	C V G S K G Q V F A	T S A I R G I R F L	Q I L R M L H V D R	Q G G T W R L L G S	253
<i>Mus m.</i>	C V G S K G Q V F A	T S A I R G I R F L	Q I L R M L H V D R	Q G G T W R L L G S	188
<i>Xenopus l.</i>	C V G S N G Q V F A	T S A I R G I R F L	Q I L R M L H V D R	Q G G T W R L L G S	243
<i>Squalus a.</i>	C V G S N G Q V F A	T S A I R G I R F L	Q I L R M L H V D R	Q G G T W R L L G S	246
<i>C. elegans</i>	C L G A T G Q V F A	A S A I R G L R F F	Q I L R M L R I D R	R A G T W K L L G S	280

	-----S5-----				
<i>Homo s.</i>	V V F I H R Q E L I	T T L Y I G F L G L	I F S S Y F V Y L A	E K D A V N E S G R	293
<i>Mus m.</i>	V V F I H R Q E L I	T T L Y I G F L G L	I F S S Y F V Y L A	E K D A V N E S G R	228
<i>Xenopus l.</i>	V V F I H R Q E L I	T T L Y I G F L G L	I F S S Y F V Y L A	E K D A I D S S G E	283
<i>Squalus a.</i>	V V F I H R Q E L I	T T L Y I G F L G L	I F S S Y F V Y L A	E K D A V D D S G S	286
<i>C. elegans</i>	V V W A H R Q E L L	T T V Y I G F L G L	I F S S F L V Y L C	E K N T N D . . .	316

	-----H5-----				
<i>Homo s.</i>	V E F G S Y A D A L	W W G V V T V T T I	G Y G D K V P Q T W	V G K T I A S C F S	333
<i>Mus m.</i>	I E F G S Y A D A L	W W C V V T V T T I	G Y G D K V P Q T W	V G K T I A S C F S	268
<i>Xenopus l.</i>	Y Q F G S Y A D A L	W W G V V T V T T I	G Y G D K V P Q T W	I G K T I A S C F S	323
<i>Squalus a.</i>	Q Q F G S Y A D A L	W W G V V T V T T I	G Y G D K V P Q T W	I G R T I A S C F S	326
<i>C. elegans</i>	. K Y Q T F A D A L	W W G V I T L S T V	G Y G D K T P E T W	P G K I I A A F C A	355

	-----S6-----				
<i>Homo s.</i>	V F A I S F F A L P	A G I L G S G F A L	K V Q Q K Q R Q K H	F N R Q I P A A A S	373
<i>Mus m.</i>	V F A I S F F A L P	A G I L G S G F A L	K V Q Q K Q R Q K H	F N R Q I P A A A S	308
<i>Xenopus l.</i>	V F A I S F F A L P	A G I L G S G F A L	K V Q Q K Q R Q K H	F N R Q I P A A A S	363
<i>Squalus a.</i>	V F A I S F F A L P	A G I L G S G F A L	K V Q Q K Q R Q K H	F N R Q I P A A A S	366
<i>C. elegans</i>	L L G I S F F A L P	A G I L G S G F A L	K V Q Q H Q R Q K H	L I R R R V P A A K	395

Einleitung

<i>Homo s.</i>	L I Q T A W R C Y A	A . . E N P D S S T	W K I Y I R K A P R	S H T L L S P S P K	411
<i>Mus m.</i>	L I Q T A W R C Y A	A . . E N P D S A T	W K I Y V R K P A R	S H T L L S P S P K	346
<i>Xenopus l.</i>	L I Q T A W R C Y A	A . . E N P D S A T	W K I Y I R K Q S R	N H H I M S P S P K	401
<i>Squalus a.</i>	L I Q T S W R C H A	A . . E N H E S A T	W K M Y V R Q P T K	F Y . V A S P S P K	403
<i>C. elegans</i>	L I Q C L W R H Y S	A A P E S T S L A T	W K I H L A R E L P	P I V K L T P N G S	435
<i>Homo s.</i>	P K K S V V V K K K	K F K L D K D N G V	T	P G E K M L T V P H	442
<i>Mus m.</i>	P K K S V M V K K K	K F K L D K D N G M	S	P G E K M F N V P H	377
<i>Xenopus l.</i>	X				402
<i>Squalus a.</i>	T K K S V . G K R K	K L K T D K D N G L	N S E K S L N V P N	432
<i>C. elegans</i>	N N A T G L I N R L	R Q S T K R T P N L	N N Q N L A V N S Q	A T S K N L S V P R	475
<i>Homo s.</i>	I . . T C D . . . P	P E E R R L D H F S	V D G Y D . . . S S	V R K S P T L L E V	474
<i>Mus m.</i>	I . . T Y D . . . P	P E D R R P D H F S	I D G Y D . . . S S	V R K S P T L L E L	409
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	402
<i>Squalus a.</i>	I . . T Y D H V V D	K D D R K F E N S N	I D G Y D . . . S S	V K K S L G I L D V	467
<i>C. elegans</i>	V H D T I S L V S T	S D I S E I E Q L G	A L G F S L G W K S	K S K Y G G S K K A	515
<i>Homo s.</i>	S M P H F M R T N S	F A E D L D . L . E	G E T L L T P I T H	I S Q L R E H H R A	512
<i>Mus m.</i>	S T P H F L R T N S	F A E D L D . L . E	G E T L L T P I T H	V S Q L R D H H R A	447
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	402
<i>Squalus a.</i>	N S G A L S R A N S	Y A D D L D F I . E	G E P V L A P I T H	V S Q L R E S H R V	506
<i>C. elegans</i>	T D D S V L Q S R M	L A P S N A H L D E	E E A V G Y Q P Q T	I E E F T P A L K N	555
<i>Homo s.</i>	T I K V I R R M Q Y	F V A K K K F Q Q A	R K P Y D V R D V I	E Q Y S Q G H L N L	552
<i>Mus m.</i>	T I K V I R R M Q Y	F V A K K K F Q Q A	R K P Y D V R D V I	E Q Y S Q G H L N L	487
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	402
<i>Squalus a.</i>	T V K V I R R M Q Y	F V A K K K F Q Q A	R K P Y D V R D V I	E Q Y S Q G H L N L	546
<i>C. elegans</i>	C V R A I R R I Q L	L V A R K K F K E A	L K P Y D V K D V I	E Q Y S A G H V D L	595
<i>Homo s.</i>	M V R I K E L Q R R	L D Q S I G K P S L	F I S V S E K S K D	R G S N T I G A R L	592
<i>Mus m.</i>	M V R I K E L Q R R	L D Q S I G K P S L	F I P I S E K S K D	R G S N T I G A R L	527
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	402
<i>Squalus a.</i>	M V R I K E L Q R R	L D Q S L G K P T M	F L S V S E K S Q D	R G K N T I G A R L	586
<i>C. elegans</i>	Q S R V K T V Q A K	L D F I C G K N I E K I	E P K I S M F T R I	627
<i>Homo s.</i>	N R V E D K V T Q L	D Q R L A L I T D M	L H Q L L	S L H G G S T P G S	627
<i>Mus m.</i>	N R V E D K V T Q L	D Q R L V I I T D M	L H Q L L	S M Q Q	556
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	402
<i>Squalus a.</i>	N R V E E K F V H M	D Q K L N T I T D M	L H H L V	A H Q Q G H P H P Q	621
<i>C. elegans</i>	A T L E T T V G K M	D K K L D L M V E M	L M G R Q A S Q R V	F S Q N T S P R G E	667
<i>Homo s.</i>	G G P P R E G G A H	I T Q P C G S G G S	V D P E L F L P S N	T L P T Y E Q L T V	667
<i>Mus m.</i>	G G P T C N S R S Q	V V . A S N E G G S	I N P E L F L P S N	S L P T Y E Q L T V	595
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	402
<i>Squalus a.</i>	T Q P Q A Q G T	V V Q A V A S T H S	S L P S Y E Q L T V	649
<i>C. elegans</i>	F S E P T S A R Q D	L T R S R R S M V S	T D M E M Y T A R S	H S P G Y H G D A R	707
<i>Homo s.</i>	P R R G P D E G S *	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	676
<i>Mus m.</i>	P Q T G P D E G S *	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	604
<i>Xenopus l.</i>	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	402
<i>Squalus a.</i>	R R K D Q D N Q P D	L * ~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	660
<i>C. elegans</i>	P I I A Q I D A D D	D D E D E N V F D D	S T P L N N G P G T	S S C * 740	

Abbildung I.3: Proteinsequenzvergleich homologer KCNQ1-Kanäle verschiedener Spezies. In der Reihenfolge Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*), Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), Hai (*Squalus acanthus*) und Wurm (*Caenorhabditis elegans*) sind die Sequenzen untereinander aufgeführt. Die Sequenz des Krallenfrosches ist bisher nur partiell veröffentlicht. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. Die Transmembranregionen und die Porenschleife sind gekennzeichnet. KCNQ-Kanäle besitzen verglichen mit anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen einen kurzen N-, aber einen langen, teilweise hochkonservierten C-Terminus.

I.B Das LQT-Syndrom

Unter dem LQT-Syndrom versteht man eine vererbte Störung der kardialen Erregungsleitung, unter anderem mit Verlängerung der QT-Zeit im EKG (Elektrokardiogramm), nicht selten verbunden mit synkopalen Anfällen, die zum Kammerflimmern führen können. Dabei gibt es sowohl autosomal dominante, als auch autosomal rezessive Formen dieser Erkrankung. Das autosomal rezessive LQT-Syndrom (auch bekannt als Jervell-Lange-Nielson-Syndrom) tritt zusammen mit einer angeborenen Innenohr-Schwerhörigkeit auf. Diese Form des LQT-Syndroms ist selten (Jervell und Lange-Nielson, 1957). Das autosomal dominant vererbte LQT-Syndrom (Romano-Ward-Syndrom) ist häufiger und nicht mit anderen phänotypischen Abnormalitäten assoziiert (Ward, 1964; Romano, 1965).

Daneben gibt es auch das erworbene LQT-Syndrom. Die Ursachen des erworbenen LQT-Syndroms sind vielschichtig und reichen von Elektrolytstörungen (Hypokaliämie, Hypomagnesiämie, Hypokalziämie) über bestimmte Gifte (Arsen, Organophosphate) und einige Herzkrankheiten (z.B. Myokarditis, Bradykardie) bis zu bestimmten Arzneistoffen (Metzger und Friedman, 1993). Dies können z.B. Antiarrhythmika der Klassen IA (z.B. Chinidin) und III (z.B. Sotalol, Amiodaron), nicht-sedierende Antihistaminika (Terfenadin, Astemizol), das Butyrophenon Haloperidol und Phenothiazine (z.B. Thioridazin) sein. Eine detaillierte Übersicht geben Hunt und Stern (1995). Vererbte und erworbene LQT-Syndrome, können mit so genannten Torsades-de-pointes verbunden sein, einer ventrikulären Tachykardie mit passagerem Kammerflimmern.

Die genetische Ursache des vererbten LQT-Syndroms ist nicht einheitlich, sondern auf mehrere Chromosomen verteilt. So hat das LQT1-Syndrom seine Ursache in einem Defekt auf Chromosom 11p15.5 (Keating *et al.*, 1991). LQT2-, LQT3- und LQT4-Syndrom sind mit einem Defekt auf den Chromosomen 7q35-36, 3p21-24 bzw. 4q25-27 assoziiert (Jiang *et al.*, 1994; Wang, Curran *et al.*, 1996; Schott *et al.*, 1995). Der Gen-Defekt des LQT5-Syndroms ist auf dem Chromosom 21p22 und der des LQT6-Syndroms in unmittelbarer Nähe auf Chromosom 21p22.1 lokalisiert.

Curran *et al.* (1995) zeigten, dass Mutationen im Kaliumkanal-Gen HERG (human ether-a-go-go related gene), das auf Chromosom 7 liegt (Warmke und Ganetzky, 1994), die Ursache für das vererbte LQT2-Syndrom bilden. HERG-Kanäle sind an der Repolarisationsphase des Aktionspotentials im Herzen beteiligt. Sie bilden wahrscheinlich gemeinsam mit dem KCNE2-Protein (MirP1) die kardiale I_{Kr} -Leitfähigkeit (Sanguinetti und Jukiewicz, 1990; Abbott *et al.*,

1999). LQT2-Syndrom-assoziierte-Mutationen in HERG resultieren in einer verminderten Kanalfunktion, was zu einer Verlängerung des Aktionspotentials führt.

Auch die molekulare Ursache für das LQT3-Syndrom scheint geklärt. George *et al.* (1995) konnten zeigen, dass das SCN5A-Gen, das für einen kardialen Na⁺-Kanal kodiert (Gellens *et al.*, 1992), auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist. Wang *et al.* (1995) untersuchten daraufhin Familien mit angeborenem LQT3-Syndrom und fanden Punktmutationen in Regionen des SCN5A-Gens, die wichtig für die Na⁺-Kanal-Inaktivierung sind.

Schließlich gelang Wang, Curran *et al.* (1996) der Nachweis, dass Deletionen und verschiedene Punktmutationen im *KVLQT1*-Gen die Ursachen für das LQT1-Syndrom sind. Das *KVLQT1*-Gen liegt auf Chromosom 11 und kodiert für einen K⁺-Kanal (Wang, Curran *et al.*, 1996). Dieser bildet zusammen mit dem MinK-Protein die langsam aktivierende I_{Ks} -Leitfähigkeit in Herzmuskelzellen (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996), die sehr wichtig bei der Repolarisation der Membran beim Ablauf eines Aktionspotentials ist. Mutationen im *KVLQT1*-Gen sind die häufigste Ursache für angeborene kardiale Arrhythmien (Wang, Curran *et al.*, 1996). In KCNQ1 sind auch die rezessiven Jervell-Lange-Nielson-Mutationen bekannt, die zusätzlich zu der beschriebenen Schwerhörigkeit führen (Neyroud *et al.*, 1997).

Für das LQT4-Syndrom, dessen Ursache auf dem Chromosom 4 lokalisiert ist (Schott *et al.*, 1995), konnte das dazugehörige Gen noch nicht identifiziert werden.

Als LQT5-Syndrom werden Mutationen in der I_{Ks} -Untereinheit MinK bezeichnet, die zu einem defekten Kaliumkanal führen (Schulze-Bahr *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997; Duggal *et al.*, 1998). Auch hier ist die repolarisierende Komponente im Herzen verringert und es kommt zum LQT-Syndrom, teilweise auch mit zusätzlicher Schwerhörigkeit (Jervell-Lange-Nielson-Syndrom, Schulze-Bahr *et al.*, 1997).

Als LQT6-Syndrom wird die wohl schwächste Form des LQT-Syndroms bezeichnet mit Mutationen in MirP1 (MinK related protein1, auch KCNE2; Abbott *et al.*, 1999). Dieses MinK-verwandte Protein interagiert mit HERG-Kanälen und ist so an der Ausbildung der kardialen I_{Kr} -Leitfähigkeit beteiligt. Abbott *et al.* (1999) beschrieben drei Mutationen in diesem Protein mit jeweils schwachen Effekten auf die Kinetik von HERG/MirP1(I_{Kr})-Kanälen. Interessant war, dass eine Mutation am extrazellulären N-Terminus des Proteins die Sensitivität von I_{Kr} -Kanälen gegenüber Clarithromycin erhöhte, weshalb eine Patientin mit dieser Mutation ein LQT-Syndrom nach Clarithromycineinnahme entwickelte.

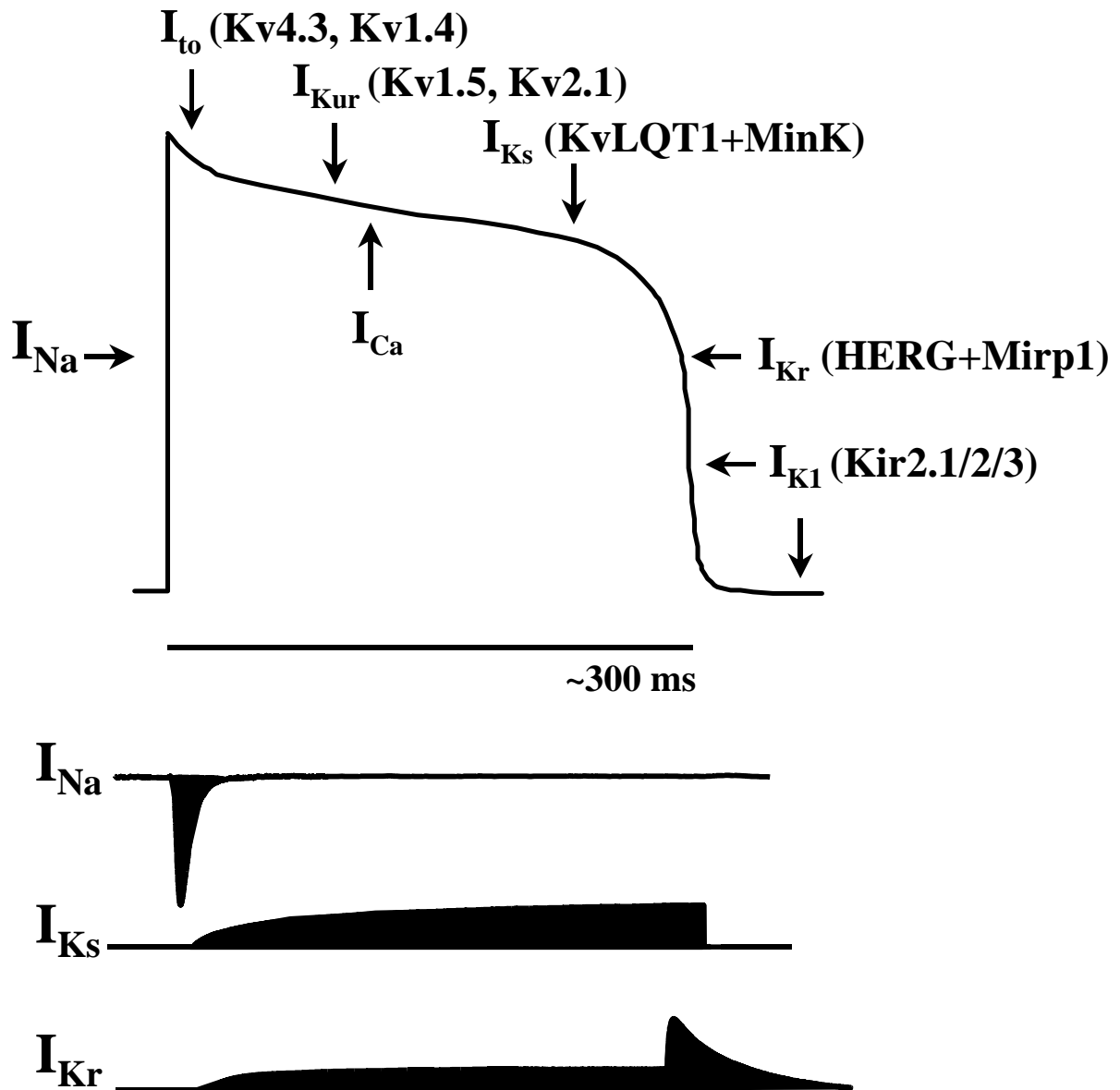


Abbildung I.4: Das kardiale Aktionspotential mit den dazu beitragenden Strömen (nach Snyders, 1999). Der Natriumeinwärtsstrom bestimmt den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials, der durch die Inaktivierung der Natriumkanäle und schnell öffnende Kaliumkanäle (Kv4.3 und Kv1.4 bilden den I_{to} , wobei "to" "transient outward" bedeutet) beendet wird. In der Plateauphase halten sich Kaliumauswärtsströme (Kv1.5- und Kv2.1-Kanäle bilden wahrscheinlich die I_{Kur} -Leitfähigkeit, "ur" bedeutet "ultrarapid") und Kalziumeinwärtsströme (L- und T-Typ-Kalziumkanäle) das Gleichgewicht. I_{Ks} und I_{Kr} sind für die Repolarisation der Zelle verantwortlich, wie auch der I_{K1} -Strom, der durch die einwärts rektifizierenden (inward rectifier) Kir2-Kanäle gebildet wird. Unter dem Aktionspotential sind die in das LQT-Syndrom involvierten Ströme und ihre Quantität in zeitlicher Abhängigkeit skizziert (Flächen unterhalb der Basislinie bedeuten Einwärtsströme, Flächen oberhalb bedeuten Auswärtsströme). Weitere Erklärungen siehe Text.

I.C Problemstellung und angewendete Techniken

Der KCNQ1-Kanal besitzt innerhalb der KCNQ-Familie eine Sonderstellung. Er bildet mit keinem der anderen Proteine funktionelle Heteromere, er inaktiviert auf eine bisher unbekannte Art und er stellt ein attraktives Ziel für möglicherweise antiarrhythmisch wirkende Substanzen dar, von denen eine das Chromanol 293B ist. Zusätzlich gibt es einige Spezieshomologe zu dem humanen KCNQ1 (hKCNQ1), die sich trotz hoher Homologie in ihren Eigenschaften unterscheiden. Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften des Kanals auf molekularer Ebene aufzuklären. Der Schwerpunkt sollte auf der Identifizierung der Bindungsstelle des Chromanols 293B im I_{Ks} -Kanal liegen. Es sollte auch untersucht werden, ob es bisher unbekannte Mitglieder der KCNQ-Familie gibt, die mit diesem Kanal interagieren und so die Pharmakologie beeinflussen könnten.

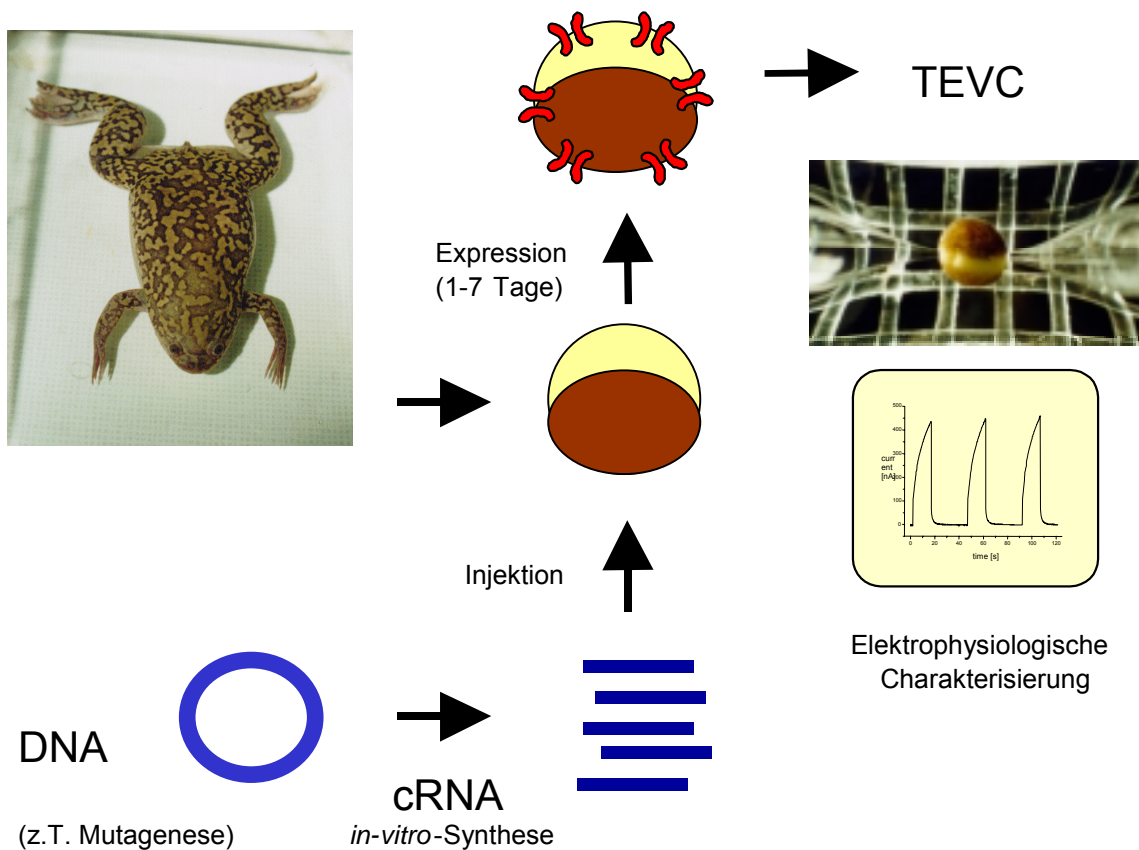


Abbildung I.5: Diese Abbildung zeigt die Verknüpfung der angewendeten Methoden. DNA wurde durch Mutagenese verändert und in cRNA umgeschrieben. Diese wurde in *Xenopus*-Oozyten injiziert, um die entsprechenden Proteine zu exprimieren. Die Wild-Typen- oder die Mutanten-Kanäle wurden mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) charakterisiert.

II Material und Methoden

II.A Molekularbiologische Methoden

II.A.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

II.A.1.a Gewinnung von Plasmid-DNA

Je nach gewünschter Menge und Verwendung der zu isolierenden Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Ansätze zu deren Isolierung und Reinigung gewählt. Die Plasmid-DNA aus den "Minipräparationen" wurde für Restriktionsanalysen und als PCR-Mutterstrang-DNA (Matrize) für Sequenzierungen und Mutagenese eingesetzt. Die DNA aus "Midipräparationen" wurde neben den genannten Verwendungsarten auch zur Herstellung von cRNA benutzt. Die DNA-Menge bzw. -Qualität wurde nach den jeweiligen Präparationen photometrisch und durch Auftragung auf ein Agarosegel bestimmt.

Minipräparation

Für die Minipräparation von DNA aus einer Bakterienkultur wurde der QIAprep-Spin-Miniprep-Kit der Firma QIAGEN (Kat. Nr. 27104, Pufferzusammensetzung siehe Handbuch) verwendet. Das Prinzip von Gewinnung und Reinigung der Plasmid-DNA beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Adsorption der DNA an ein Silicagel in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration (Vogelstein und Gillespie, 1979).

Von Einzelkolonien transformierter Bakterien wurde eine 3-ml-Kultur über Nacht (12-14 h) in mit 200 mg/l Ampicillin versetztem 2YT-Medium angesetzt [10 g NaCl (Firma Merck), 16 g Trypton (durch eine Behandlung von Casein mit Pankreas-Enzymen erhalten) und 10 g Hefeextrakt (beides Firma DIFCO) in 1 l H₂O]. 1,5 ml dieser Kultur wurden 1 min (wie alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte bei 13000 rpm mit der Heraeus-Tischzentrifuge Biofuge Pico) abzentrifugiert, der Überstand gründlich entfernt und verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 (enthält RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 (enthält NaOH) und nach mehrmaligem Umdrehen des Präparationsgefäßes wurden die Bakterien bis zum Aufklaren der Suspension lysiert, jedoch nie länger als 5 min (um das Scheren genomischer Bakterien-DNA zu verhindern). Die Zugabe von 350 µl Puffer N3 (enthält chaotropische Säure) neutralisierte das Reaktionsgemisch, und Zellfragmente und genomische DNA fielen nach vorsichtigem Schütteln aus. Das Präzipitat wurde 10 min

abzentrifugiert und der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand auf eine QIAprep-Säule gegeben und 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde mit 750 µl Puffer PE (enthält 70% Ethanol, um ein Herunterwaschen der DNA zu verhindern) gewaschen und 1 min zentrifugiert. Zum Entfernen größerer Mengen Ethanol wurde die Säule nochmals 1 min zentrifugiert und die DNA anschließend mit 50 µl Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) in der Tischzentrifuge eluiert.

Midipräparation

Für die Midipräparation von DNA wurde der QIAfilter-Plasmid-Midi-Kit der Firma QIAGEN verwendet (Kat. Nr. 12245, genaue Pufferzusammensetzung siehe Handbuch). Das Prinzip entspricht weitestgehend dem der oben beschriebenen Minipräparation. Die Adsorption der negativ geladenen DNA erfolgt an ein positiv geladenes Anionen-Austauscher-Harz unter geeigneten niedrig-Salz- und pH-Bedingungen (an der Harzoberfläche befinden sich Diethylaminogruppen, die pH-abhängig geladen sind). RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch Waschen mit höherer Salzkonzentration entfernt. Die Plasmid-DNA wird letztlich in Gegenwart einer sehr hohen Salzkonzentration eluiert und die Lösung durch eine Isopropanolfällung entsalzt und konzentriert.

25 ml einer über-Nacht-Bakterienkultur in 2YT-Medium plus Ampicillin (200 mg/l) wurden 10 min bei 5000 rpm (Sorvall-Standzentrifuge RC-5B, Rotor SS-34) abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. 4 ml Puffer P1 und 4 ml Puffer P2 wurden analog zur Minipräparation hinzugefügt und das erhaltene Zelllysate wurde mit auf 4°C gekühltem Puffer P3 (3 M KAcO) gefällt, vorsichtig geschüttelt und zum Abtrennen des Präzipitats durch eine "QIAfilter-Cartridge" (Filterspritze) filtriert. Das Filtrat wurde auf eine auf 0,75 M NaCl, pH 7,0 (4 ml Puffer QBT) eingestellte Harzsäule appliziert und zweimal mit 10 ml Puffer QC (1,0 M NaCl, pH 7,0) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 ml Elutionspuffer (1,25 M NaCl, pH 8,5) heruntergewaschen, mit 3,5 ml Isopropanol (Merck) gefällt und 35 min bei 11000 rpm (Sorvall Standzentrifuge) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet, in 400 µl H₂O aufgenommen und mit Ethanol gefällt (siehe Abschnitt II.A.1.b).

II.A.1.b Reinigen von Nukleinsäuren

DNA-Präzipitation

Durch die DNA-Präzipitation wird eine Konzentrierung der DNA und eine Verringerung der Salzkonzentration erreicht. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 und 2,5 Volumeneinheiten 96%igem Ethanol (Merck) versetzt. Danach wurde der Ansatz mindestens 20 min bei 10000 × g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das DNA-Sediment

wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, 2 min in der Vakuumzentrifuge (Savant, Speed Vac Plus SC 11A und Refrigerated Vapor Trap RVT 100) getrocknet und in einem geeignetem Volumen H₂O aufgenommen.

Einzelsträngige Oligonukleotide wurden in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ (Merck) und 70%igem Ethanol eine Stunde auf Eis gefällt, anschließend gewaschen und getrocknet.

RNA-Präzipitation

RNA-Lösungen wurden mit 1/10 Volumen 5 M NH₄OAc und einem Volumen Isopropylalkohol gefällt. Zur verbesserten Präzipitation wurde die Reaktion mindestens 15 min bei -20°C gekühlt und die RNA anschließend bei 4°C und 10000 × g 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet 2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in einem geeignetem Volumen DMPC-H₂O (siehe Abschnitt II.A.1.e) aufgenommen.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur besonders gründlichen Entfernung von Proteinen wurden DNA- und RNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen einer mit TE-Puffer gesättigten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1)-Lösung (Gibco BRL) und anschließend mit Chloroform (Gibco BRL) bei Raumtemperatur ausgeschüttelt. Nach dem Ausschütteln wurde jeweils bei 10000 × g 5 min zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen. DNA wurde zweimal, RNA nur einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Anschließend folgte die Chloroformbehandlung zum Herauslösen von Phenolresten, wobei ebenfalls nach dem Ausschütteln die wässrige Phase aufbewahrt wurde, die durch Präzipitation entsalzt und eingengt wurde (Sambrook *et al.*, 1989).

Aufreinigen von DNA aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen über Qiagensäulen

Um Enzyme, Salze, Nukleotide, Agarose und Oligonukleotide von DNA zu trennen, wurden je nach Bedarf verschiedene Kits aus der Reihe QIAquick der Firma QIAGEN nach den Angaben im Herstellerprotokoll verwendet. QIAquick-Kits arbeiten mit Säulen, die mithilfe einer Silicamembran sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA bei hoher Salzkonzentration binden. Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, nicht eingebaute Nukleotide, Agarose oder Farbstoffe werden durch Zentrifugation (Heraeus, Biofuge Pico) entfernt. Die Aufreinigung der gewünschten DNA erfolgt in drei Schritten über Bindung, Waschen (mit 70%igem Ethanol) und

Elution (mit H₂O). Je nach spezieller Anwendung, werden betreffend in ihrer Salz- und Protonenkonzentration verschiedene Puffer verwendet:

- Der QIAquick-PCR-Purification-Kit (Kat. Nr. 28106) bindet DNA ≥ 100 bp und entfernt Oligonukleotide ≤ 40 bp. Er wurde daher zur Isolierung von PCR-Produkten aus PCR-Gemischen und zum Entfernen von Linkern aus Klonierungsexperimenten verwendet.
- Der QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit (Kat. Nr. 28306) entfernt Oligonukleotide ≤ 17 bp, und wurde daher zur Isolierung von größeren DNA-Fragmenten aus enzymatischen Reaktionsansätzen wie z.B. nach Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Auffüllreaktionen verwendet.
- Der QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Kat. Nr. 28706) solubilisiert Agarosegelbanden und bindet die darin enthaltene DNA an die Säulen. Die zu isolierende DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (1%iges Gel) aufgetrennt. Die entsprechende DNA-Bande wurde mit dem Skalpell möglichst umrissgenau ausgeschnitten und die DNA nach den Herstellerangaben isoliert.

Die abschließende Elution der DNA erfolgte bei allen Kits mit einem Volumen von 30-50 μ l H₂O. 3-5 μ l der gewonnenen DNA wurden bei Bedarf zur Mengenbestimmung auf einem analytischen Gel mit DNA-Proben bekannter Konzentration verglichen.

II.A.1.c Analyse von Nukleinsäuren

Enzymatische Restriktion

(Sambrook *et al.*, 1989)

Alle Restriktionsenzyme wurden gemäß den Herstellerangaben (Boehringer, NEB oder GIBCO) eingesetzt. Analytische Restriktionen wurden 0,5 – 1 h, präparative Restriktionen ca. 2 h, PCR-Produkte mit nur 4 – 10 überstehenden Basenpaaren 3 - 6 h inkubiert. In der Regel wurden die Endonukleasen durch 50 mM EDTA deaktiviert, hitzeinaktiviert oder durch den QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit entfernt, wenn es zur Weiterbehandlung erforderlich war. Die geschnittene DNA konnte durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert werden.

Quantitative und qualitative photometrische Analyse

Zur Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung bei 260 nm bestimmt (Pharmacia Biotech, Genequant II). Unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes ließ sich die Konzentration aus gemessener Absorption und bekanntem Extinktionskoeffizienten berechnen, wobei die Optische Dichte = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. ~33 µg/ml einzelsträngigen Oligonukleotiden entsprach. Um die Reinheit der DNA-Lösung abschätzen zu können, wurde der Quotient aus A_{260} und A_{280} (Richtwert für den Proteinanteil in der Lösung) unter Berücksichtigung der H₂O-Absorption ermittelt. Bei einem Quotienten zwischen 1,6 und 2,0 betrachtete man die Nukleinsäuren als gut aufgereinigt.

DNA-Agarosegelelektrophorese

Um die Qualität und die Menge von DNA einschätzen zu können, oder um Fragmente nach deren Größe zu trennen, wurde eine Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel durchgeführt. Agarose (Gibco BRL) wurde in TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat (Merck), 1 mM EDTA (Merck), pH 8,0] aufgekocht, und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (Firma Gibco BRL) zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Ladepuffer [30% (v/v) Glycerin (Gibco BRL), 0,25% (w/v) Bromphenolblau (Gibco BRL)] versetzt. Neben den zu analysierenden Proben wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard bzw. ein DNA-Mengenstandard parallel aufgetragen. Die angelegte Spannung und die Dauer der Gelelektrophorese wurden der benötigten Trennschärfe angepasst (1-3 h, 80-140 V). Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA konnte diese bei UV-Anregung auf einem Transilluminator (Biometra TI1) sichtbar gemacht und analysiert werden (Sambrook *et al.*, 1989).

RNA-Agarosegelelektrophorese

Das Gel wurde immer frisch hergestellt und möglichst dünn gegossen. Auch der Ladepuffer wurde frisch angesetzt, da es bei Lagerung des Puffers zu einer Reaktion zwischen Formamid und Formaldehyd kommt, die zur Degradierung der RNA führt.

Die *in vitro* transkribierte RNA (2-5 µg, siehe Abschnitt II.A.1.e) wurde mit dem Ladepuffer gemischt (1 Volumenteil RNA und 2-3 Volumenteile Ladepuffer) und die RNA 10 min bei 65°C denaturiert. Die denaturierte RNA wurde sofort auf Eis gestellt. Da im Ladepuffer auf Glycerin-Zusatz verzichtet wird (Gefahr der RNase-Kontamination), wurde das Gel trocken beladen. Die

Material und Methoden

Proben wurden in die Taschen pipettiert und bei Bedarf mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Laufpuffer wurde bis zur Geloberkante in die Kammer eingefüllt, ohne das Gel zu überfluten. Die Proben liefen bei hoher Spannung kurz in das Gel ein (80 mV, 10 min). Anschließend wurde mit Laufpuffer bis oberhalb der Geloberkante aufgefüllt und die Auftrennung über Nacht bei 15-25 mV durchgeführt (der lange Gellauf ergibt eine bessere Auftrennung als kürzere Laufzeiten bei höherer Spannung). Das Gel wurde auf einem Transilluminator analysiert.

Die Puffer waren wie folgt zusammengesetzt:

Puffer	Substanzen	Hersteller
Ladepuffer	250 µl Formamid 83 µl Formaldehyd (37%) 50 µl 10x MOPS-Puffer 0,01% Bromphenolblau wenn notwendig: Ethidiumbromid (3 µl)	Calbiochem Merck siehe unten Gibco BRL BioRad
Laufpuffer	1 x MOPS	siehe unten
10 x MOPS	200 mM Morpholinopropan- sulfonsäure (MOPS) <i>41,86 g</i> 50 mM NaAcO <i>4,1 g</i> 10 mM EDTA <i>20 ml 0,5 M EDTA-Lsg.</i> <i>ad 1l Aqua Millipore</i> pH 7,0 einstellen, autoklavieren	Sigma Merck Merck Merck
Gel	1 g Agarose 10 ml 10x MOPS 84,5 ml DMPC-Wasser aufkochen, abkühlen lassen auf 50-60°C 5,5 ml Formaldehyd 37%	BioRad siehe Abschnitt II.A.1.e

Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzbestimmung von DNA wurde der BigDye-Terminator-Ready-Reaction-Kit in Verbindung mit einem ABI-Prism-310-Genetic-Analyzer verwendet (beides Perkin Elmer - Applied Biosystems). Das Prinzip des Kits beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger

et al. (1977). Die durch den Kettenabbruch entstandenen Fragmente werden in dem Genetic Analyzer durch Gelelektrophorese (Polyacrylamid) aufgetrennt und spektroskopisch ausgewertet. Der Kettenabbruch wird durch modifizierte Didesoxynukleotide herbeigeführt, die an Farbstoffe mit einem jeweils für eine Base spezifischen Emissionsspektrum gebunden sind. Die Anregung des Donorfarbstoffes (Fluoresceinderivat) der veränderten Dideoxynukleotide erfolgt durch einen Argonionenlaser. Die Energie wird auf den jeweiligen Akzeptorfarbstoff (Dichlororhodaminderivate) übertragen, der nach dieser Anregung Licht mit charakteristischer Wellenlänge emittiert (siehe Handbuch).

Für die Sequenzierungs-PCR (Thermocycler, PE-Biosystems) wurden als Matrizen-DNA ("Template") 2 µl Miniprep- oder 0,5 µg Midiprep-Plasmid-DNA eingesetzt. Die Primer bestanden aus 22-24 Nukleotiden, endeten am 3'-Ende mit G oder C und hatten idealerweise eine Schmelztemperatur von 55°C. Die Primerkonzentration in der Reaktion betrug 0,5 µM. Zusätzlich wurden 4 µl des BigDye-Terminator-Reaktionsmixes und besonders aufgereinigtes Wasser (Lichrosolv-H₂O, Merck) ad 20 µl addiert.

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
25	96°C 50°C 60°C	10 s 5 s 4 min

Bei besonders GC-reichen Matrizen wurden 5% DMSO beigelegt und der Reaktionsansatz 5 min bei 98°C vorinkubiert.

Die PCR-Produkte wurden mithilfe des QIAGEN-DyeEx-Spin-Kits (Kat. Nr. 63106) nach den Herstellerangaben aufgereinigt. Der Kit trennt die synthetisierten DNA-Stränge von den kleineren, nicht eingebauten Nukleotiden und Farbstoffen durch Gelfiltrationschromatographie über Säulen in der Mikrozentrifuge. Die größeren DNA-Stränge werden durch Zentrifugalkraft eluiert, während die kleineren einzelnen Bausteine in Poren des Gelfiltrationsmaterials zurückgehalten werden. Das Eluat wurde 2 min bei 95°C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen, und mithilfe des ABI-Prism-310 analysiert.

Die Elektropherogramme wurden visuell und die Sequenzen unter Verwendung von GCG-Software (Programme Pileup oder Gap) ausgewertet.

II.A.1.d Modifikation von DNA

Linearisierung von Plasmid-DNA zur cRNA-Synthese

Für eine *in-vitro*-Transkription zur cRNA-Synthese wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Restriktionsansatz geschnitten. In der Regel wurde die Restriktion in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Nach der Inkubation bei der dem Enzym entsprechenden Temperatur wurde die Vollständigkeit der Linearisierung auf einem Agarosegel überprüft. Anschließend wurde die geschnittene DNA nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit Natriumacetat gefällt und nach dem Trocknen in 20 µl DMPC-H₂O (siehe Abschnitt II.A.1.e) aufgenommen. Die Endkonzentration der Lösung wurde photometrisch bestimmt.

Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Die Dephosphorylierung dient dem Zweck, eine intramolekulare Selbstligation eines Vektorfragmentes zu verhindern. Zwei dephosphorylierte Enden können nicht religieren.

Zur Dephosphorylierung wurde der mithilfe des QIAquick-Nucleotide-Removal-Kits (Elution mit 50 µl Elutionspuffer) gereinigte Restriktionsansatz mit Dephosphorylierungspuffer und Calf Intestine Alkaline Phosphatase [CIAP, beides Gibco BRL, Mengen wie nach Herstellerprotokoll empfohlen; meist 28 µl Eluat (~1,5 µg DNA), 3,5 µl Puffer, 2 µl Dilutionspuffer und 1,5 µl CIAP] 30 min bei 37°C und 30 min bei 50°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 70°C inaktiviert und der Reaktionsansatz mithilfe des QIAquick-Nucleotide-Removal-Kits gereinigt (Elution mit 30 µl Elutionspuffer).

Ligation von DNA-Fragmenten

Je nach Klonierungsstrategie wurden zwei bis drei unterschiedliche DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden, die zuvor durch Restriktionsverdau generiert wurden, ligiert. Ca. 200 ng meist dephosphoryliertes Vektorfragment, das die Antibiotikaresistenz trägt, wurden mit zehnfachem molarem Überschuss an Insert-Fragmenten (zur Reinigung und zum Einengen des Ansatzes) gefällt. Für die Ligation (10 µl Ansatz) wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Blunt-end-Fragmente wurden über Nacht bei 16°C ligiert.

Ligationsansatz	2 µl 5x Ligationspuffer, enthält MgCl ₂ , DTT, ATP 1 µl T ₄ -DNA-Ligase DNA-Fragmente, in 7µl H ₂ O gelöst	Gibco BRL Gibco BRL
-----------------	--	----------------------------

Reaktionsansatz für die Ligation: DTT, Dithiothreitol; ATP, Adenosintriphosphat; die T₄-DNA-Ligase stammt aus dem Bakteriophagenstamm T₄

Der ligierte DNA wurde entweder durch Elektroporation oder durch Hitzeschock in Bakterien transformiert (siehe Abschnitt II.A.1.f).

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Watson *et al.*, 1992) dient der Vervielfältigung und der zielgerichteten Veränderung (site-directed-mutagenesis) von doppelsträngiger DNA. Es ist eine sich wiederholende drei-Schritt-Reaktion. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang durch Hitze (94-98°C) getrennt (Denaturierung), wodurch es speziell entworfenen Primern im zweiten Schritt ermöglicht wird, bei niedrigerer und für die Zusammensetzung und Länge der Primer spezifischen Temperatur an jeweils einen Einzelstrang komplementär zu binden (Annealing). Im dritten Schritt (Synthese) wird der Komplementärstrang ausgehend vom 3'-Ende der Primer bei der für die Polymerase spezifischen Temperatur (meist 68-72°C) synthetisiert.

Auf diese Weise kann man entweder am 5'-Ende der Primer eine neue Sequenz anfügen [die Länge der identischen Komplementärsequenz betrug dann mindestens 12 Basenpaare (bp)] oder in der Mitte der Primer einzelne oder mehrere Basen verändern (rechts und links der veränderten Sequenz befanden sich mindestens 10 zum Mutterstrang identische Basenpaare). Die für die Primer charakteristische Schmelztemperatur T_m wurde bis zu 20 bp mit der Formel

$$T_m[^\circ\text{C}] = 2(N_A + N_T) + 4(N_G + N_C)$$

berechnet oder mit dem Programm Prime (GCG, Wisconsinpackage) bestimmt. Die geeignete Temperatur zum Binden der Primer ("Annealingtemperatur") liegt 5°C unter der Schmelztemperatur und richtet sich nach dem Primer mit dem höheren Wert. Die Länge des dritten Schrittes (Syntheseschritt) der PCR-Reaktion richtete sich nach der Größe des zu vervielfältigenden DNA-Stücks. Die ausschließlich verwendete *Pfu*-Polymerase der Firma Stratagene benötigt ca. 1 min, um einen 0,5-kb-Komplementärstrang zu synthetisieren und arbeitet optimal bei 72°C.

Material und Methoden

Bei besonders GC-reichen Sequenzen wurde die Denaturierungstemperatur auf bis zu 98°C erhöht und Formamid (bis zu 4%), Glycerol (bis zu 1%) oder DMSO (bis zu 5%, alles Sigma) zur Reaktion addiert.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt (PCR-Gerät: T₃-Thermocycler, Biometra):

100 ng	Matrizen-DNA
5 µl	Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM MgSO ₄ ; 100 mM KCl; 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1% Triton X-100; 1 mg/ml BSA)
4 µl	Desoxyribonukleotidmix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; gesamt 10 mM)
je 3 µl	Primer (jeweils 10 µM)
1 µl	cloned <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O

BSA: Rinderserumalbumin

Zyklusparameter für eine PCR mit der cloned *Pfu*-Polymerase:

Segment	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	94-98°C	45 s
2	20-30	94-98°C Primer T _m -5°C 72°C	45 s 45 s 2 min/kb PCR-Sequenz
3	1	72°C	10 min

Die Oligonukleotide zum Sequenzieren und für die Mutagenese (siehe Abschnitt II.A.2.a) wurden von der Firma ARK-Scientific-Biosystems (Darmstadt) synthetisiert.

II.A.1.e cRNA-Synthese

Zur Charakterisierung von Kanalproteinen kann die DNA dieser Proteine *in vitro* in cRNA umgeschrieben und im Oozytensystem exprimiert werden (siehe Abschnitt I.B.2). Um die Expression besonders der modifizierten und daher oft schlecht exprimierbaren Proteine in den Oozyten zu optimieren, wurden verschiedene Methoden angewendet:

- hKCNQ1, hKCNQ2, rKCNQ3, hKCNQ5, kqt1 (*Caenorhabditis elegans*), hKv1.5 und von diesen abgeleitete Mutanten und Chimären wurden in sogenannte Oozyten-expressionsvektoren subkloniert (pSGEM, Hollmann *et al.*, 1994 und pTLN, Lorenz *et al.*, 1996). Diese Vektoren enthalten untranslatierte Regionen des *Xenopus*/β-Globin-Gens (Busch *et al.*, 1996a), die zur Stabilisierung der RNA in den Oozyten beitragen.
- Die oben beschriebenen Vektoren und alle Vektoren, in welche hMinK, rMinK, HERG und deren Mutanten einkloniert wurden, enthalten eine poly-A-Sequenz, die der transkribierten RNA in Eukaryonten angehängt wird und wahrscheinlich der Protektion vor RNA-degradierenden Enzymen dient.
- Für KCNQ1 und KCNQ2 wurde die Basenfolge um das Startcodon ATG des Konstrukts unter Erhalt der Aminosäuresequenz so geändert, dass eine für die Translationseffizienz optimale Sequenz entstand mit Adenin oder Guanin in –3 Position und Guanin in +1 Position relativ zum ATG.
- Die *in-vitro*-Transkription der cRNA wurde am 5'-Ende mit 7-Methylguanositriphosphat begonnen, welches den Ribosomen anzeigt, an dieser Stelle mit der Translation zu beginnen (Watson *et al.*, 1992).

Allgemein wurde bei der Synthese und weiteren Behandlung von cRNA immer H₂O verwendet, in dem die RNase mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC, Sigma) zerstört wurde (Sambrook *et al.*, 1989). Das Wasser wurde zu diesem Zweck zwei Stunden mit 0,1% DMPC bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren inkubiert und nachfolgend autoklaviert.

Zur Herstellung von cRNA durch *in-vitro*-Transkription wurde wie folgt angesetzt (mMessage-mRNA-Machine-Kit, Ambion):

1 µg	Linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	Transkriptionspuffer (enthält DTT, MgCl ₂ , Puffer)
10 µl	Ribonukleotidmix SP6: 10 mM ATP, CTP, UTP; 2 mM GTP; 8 mM m ⁷ G(5')ppp(5')G T7,T3: 15 mM ATP, CTP, UTP; 3 mM GTP; 12 mM m ⁷ G(5')ppp(5')G
2 µl	Enzymmix (enthält RNA-Polymerase, RNase-Inhibitor)
ad 20 µl	H ₂ O

Bei diesem Reaktionsansatz wurden die DNA-abhängigen-RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T7, T3 oder SP6 eingesetzt (Ambion Kat. Nr. 1344, 1348 bzw. 1340). Die Wahl der Polymerase bezog sich auf den Vektor, der für die Klonierung des zu exprimierenden Proteins gewählt worden war.

Inkubiert wurde bei 37°C für 1 h oder bei Verwendung der SP6-Polymerase für 2 h. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für weitere 15 min mit 1 µl RNase-freier-DNAse I (2 Einheiten/µl) bei 37°C inkubiert, um die DNA-Matrize zu entfernen. Der Ansatz wurde Phenol/Chloroform extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Die RNA wurde auf einem Gel und photometrisch analysiert, auf 200 ng/µl (Mutanten und Chimären auf 1 µg/µl) eingestellt und zu 3-µl-Aliquots bei -20°C bzw. langfristig bei -80°C eingefroren.

II.A.1.f Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Als Bakterienstamm wurde XL1-Blue der Firma Stratagene, ein Abkömmling des *E. coli* Sicherheitsstammes K12 verwendet (Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 suppE44 relA1 lac [F'proAB laq^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*^c, Sambrook *et al.*, 1989).

Bei der Herstellung kompetenter Bakterien und bei der Transformation wurden ausschließlich autoklavierte (Autoklav der Firma H+P) bzw. sterile Materialien und Reagenzien verwendet. Die Inkubation von Bakterienkulturen erfolgte stets bei 37°C und 225 rpm (Inkubator Certomat HK) und die Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert (Heräus, Typ B5028).

Elektroporation

Um elektrokompetente Bakterienzellen herzustellen, wurde eine XL1-Blue-Stammlösung auf einer 2YT-Agarplatte (15 g/l Bactoagar (DIFCO) in 2YT-Medium) plus 10 mg/l Tetracyclin (Firma Sigma) ausplattiert und über Nacht inkubiert. 10 ml LB-Medium (10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) wurden in Gegenwart von 10 mg/l Tetracyclin mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde 1 l LB-Medium angeimpft und 3-5 h inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht war. Die Kultur wurde in vorgekühlte Zentrifugenbecher (Sorvall) überführt, 20 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 3000 rpm (GS3-Rotor, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abdekantiert, und die Zellen wurden in 1 l eisgekühltem H₂O resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert und in 400 ml 10%igem Glycerol (w/v) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden das Bakterienpellet in 40 ml und nach einem wiederholten Zentrifugationsschritt in 5 ml 10%igem Glycerol aufgenommen. Diese Bakteriensuspension wurde zu 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die elektrokompetenten Bakterien wurden mit 1 µl Ligationsansatz oder mit 1 ng Plasmid-DNA bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV im GenePulser der Firma BioRad transformiert. Die Bakterien wurden in 1 ml 2YT-Medium ohne Antibiotikum suspendiert und 15 min bei 37°C geschüttelt, wovon 100 µl (Plasmid-DNA) bis 300 µl (Ligationsansatz) auf 2YT-Agarplatten (200 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht inkubiert wurden. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer hohen Transformationsrate (Sambrook *et al.*, 1989).

Hitzeschock

Das Herstellen hitzeschockkompetenter Bakterien erfolgte nach folgendem Protokoll. Mit einer Einzelkolonie XL1-Blue-Bakterien wurden 50 ml TYM-Medium (20 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 5,54 g/l NaCl, 2,54 g/l MgSO₄ x 7H₂O) angeimpft, mit 10 mg/l Tetracyclin versetzt und über Nacht inkubiert. Mit 5 ml der Vorkultur wurden 150 ml Medium am darauffolgenden Tag angeimpft und weitere 3 h inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht war. Der Kolben wurde 2 min auf Eis gekühlt, die Kultur auf 4 kalte SS34 Röhrchen aliquotiert und 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall Standzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde jeweils in 10 ml kaltem TBF1-Puffer (30 mM KAcO, 50 mM MgCl₂ x 6H₂O, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂ x 2H₂O, 0,2 mM EDTA, alles Firma Merck, und 15% Glycerin) resuspendiert, jeweils zwei Röhrchen wurden vereint und 8 min zentrifugiert. Die Bakterien wurden in je 2,4 ml TBF2-Puffer (10 mM Na-MOPS (Merck) pH 7,0, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% Glycerin) resuspendiert, zu 50 µl aliquotiert und schockgefroren.

Die hitzeschockkompetenten Bakterien wurden mit 3 µl Ligationsansatz oder 1-5 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 45 s in einem Wasserbad (42°C) Hitzeschock-behandelt. Danach wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und 30 min in 1 ml 2YT-Medium geschüttelt. Von dieser Suspension wurden wie bei der Elektroporation 100 bis 300 µl ausplattiert. Modifiziert kann diese Methode durch einfaches Inkubieren der Zellen mit der gewünschten DNA für 5 bis 30 min und anschließendem sofortigen Ausstreichen aller Bakterien als einfache und schnelle, aber weniger effiziente Transformationsmethode angewendet werden (Sambrook *et al.*, 1989).

II.A.2 Spezielle molekularbiologische Methoden

II.A.2.a Einführung einer Punktmutation

Zur Einführung einer Punktmutation wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen mit je einem Mutageneseprimer und je einem Wild-Typ-Primer durchgeführt (siehe Abbildung II.1 und Abschnitt II.A.2.d). Die beiden komplementären Mutageneseprimer enthielten die gewünschten Basenfehlpaarungen zum Ändern der Aminosäuresequenz oder zum Einführen einer Restriktionsschnittstelle. Die Wild-Typ-Primer lagen jenseits einer nach Möglichkeit innerhalb der Plasmid-DNA unikalen Restriktionsschnittstelle. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt II.A.2.c) und aus der Agarose extrahiert (siehe Abschnitt II.A.1.b, Elution mit 50 µl H₂O). In einer dritten, rekombinanten PCR wurden diese beiden Fragmente (je 5 µl Eluat), die an der Mutationsstelle um etwa 20 bis 24 Basen überlappten, als Matrize mit den Wild-Typ-Primern der ersten PCRs amplifiziert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und eluiert. Das PCR-Fragment und die Wild-Typ-cDNA wurden mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und ligiert. Die Mutation und die korrekte Sequenz der durch die Polymerase synthetisierten DNA wurden durch Sequenzanalyse (siehe Abschnitt II.A.2.c) kontrolliert.

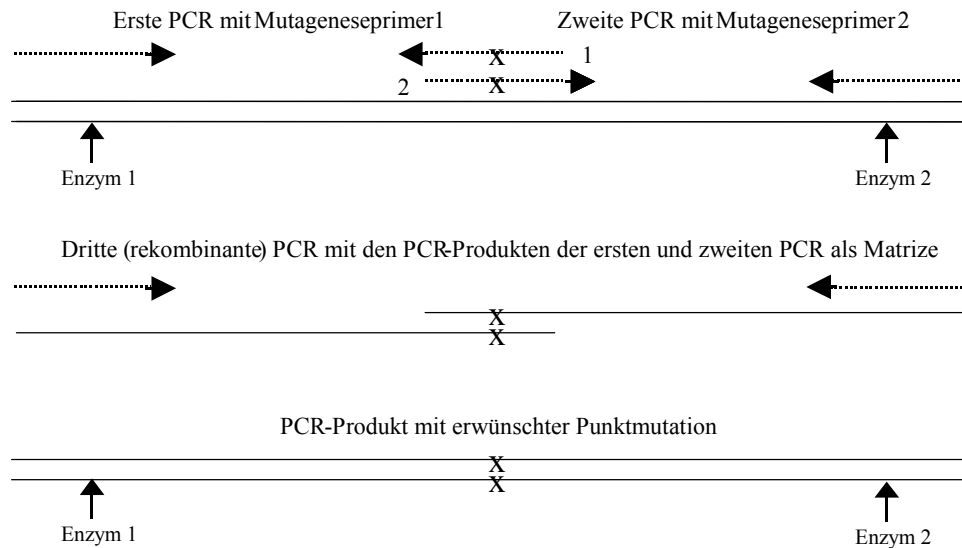


Abbildung II.1: Zielgerichtete Mutagenese durch rekombinante PCR. Durch Mutageneseprimer wird eine Punktmutation in zwei überlappenden DNA-Molekülen eingeführt. Diese werden in einer darauffolgenden, rekombinanten PCR vereinigt. Das entstandene PCR-Fragment mit der erwünschten Punktmutation wird über Restriktionsschnittstellen 5'- und 3'-wärts der Mutation in die Wild-Typ-DNA eingesetzt. Auf diese Weise können auch kurze DNA-Sequenzen, in der Mitte der Mutageneseprimer liegend, eingeführt werden.

II.A.2.b Konstruktion chimärer Proteine

In chimären Proteinen sind Bereiche eines Proteins durch die analogen Sequenzen eines meist nahe verwandten Proteins ausgetauscht. Der Austausch erfolgte auf cDNA-Ebene. Zunächst wurden in das cDNA-Konstrukt des zu verändernden Proteins zwei geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt, die die Proteinsequenz nicht veränderten (sogenannte stille Mutationen). Wenn die cDNA des verwandten Proteins mit der einzusetzenden Sequenz dieselben Schnittstellen enthielt, wurden beide Konstrukte mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und das kleinere DNA-Fragment hineinsubstituiert. Waren keine Schnittstellen vorhanden oder war der zu substituierende Teil sehr kurz (≤ 70 bp), wurde das Substitut durch PCR generiert mit zwei Primern, die an ihren Enden die geforderten Schnittstellen einführten. Das geschnittene PCR-Fragment konnte in die Wild-Typ-DNA inkloniert werden.

Im folgenden soll die Konstruktion chimärer Proteine zwischen KCNQ1 und KCNQ2, die innerhalb dieser Arbeit entstanden und analysiert wurden, näher beschrieben werden. In die beiden cDNAs wurden innerhalb des Porenbereichs an sich entsprechenden Aminosäuren Schnittstellen eingeführt (vergleiche hierzu auch die Abbildung III.4): Eine SacI-Schnittstelle zu Beginn der DNA-Sequenz, die für die Transmembrandomäne S5 codiert, an den Aminosäuren

EL (KCNQ1 261/262; KCNQ2 231/232), eine NsiI-Schnittstelle zu Beginn der Porenschleife H5 an den Aminosäuren DAL (KCNQ1 301-303; KCNQ2 266-268) und eine BamHI-Schnittstelle am Ende der Transmembrandomäne S6 an den Aminosäuren GS (KCNQ1 348/349; KCNQ2 313/314). Zusätzlich wurden in KCNQ1 noch eine XhoI-Schnittstelle an den Aminosäuren FSS (275-277, am Ende von Transmembrandomäne S6) und eine KpnI-Schnittstelle an den Aminosäuren KV (318/319, am Ende der Porenschleife H5) eingeführt. Zusätzlich wurde eine natürlich vorkommende Sall-Schnittstelle an den Aminosäuren VD (241/242) in KCNQ1 ausgenutzt, um Chimären herzustellen. Mit Ausnahme der Sall-Schnittstelle waren alle genannten Schnittstellen unikal in den jeweiligen Konstrukten.

II.A.2.c Klonierung des hKCNQ5

Eine Suche auf Homologiebasis zu den bekannten KCNQ-Kanälen in der GenBank™-Datenbank brachte eine human-bacterial-artificial-chromosome(BAC)-end-Sequenz hervor (accession number AQ344243). Die Sequenz war hoch homolog zu dem Ende von Exon 4 von KCNQ4. Ein Screening mithilfe dieser Sequenz einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek (Edge BioSystems) führte zu sechs verschiedenen Klonen, die sich in ihrer Sequenz von den bisher bekannten KCNQ-Kanälen unterschieden, in sich aber übereinstimmende Basenfolgen aufwiesen. Aus zwei überlappenden Sequenzen, wurde mithilfe natürlich vorkommender Restriktionsschnittstellen ein Klon mit einem offenen Leseraster (ORF, "open reading frame") generiert. Dieser vollständige cDNA-Klon wurde in den Oozytenexpressionsvektor pSGEM (Hollmann *et al.*, 1994) subkloniert und durchsequenziert.

II.A.2.d Northern-Blot-Analyse

Eine Digoxigenin(DIG)-markierte-RNA-Sonde von 1,6-kb-Länge, die meistenteilig eine C-terminale, das heisst mit anderen KCNQ-Kanälen wenig übereinstimmende, Sequenz enthielt, wurde mithilfe des DIG-RNA-Labeling-Kits (Roche Molecular Biochemicals) entsprechend den Herstellerangaben synthetisiert. Die Sonde wurde mit verschiedenen RNA-Blots (Clontech) über Nacht den Herstellerangaben folgend hybridisiert, und die Membranen wurden ca. 4 min auf einem Lumi-Imager (Roche - Molecular Biochemicals) detektiert.

II.B Oozytenpräparation

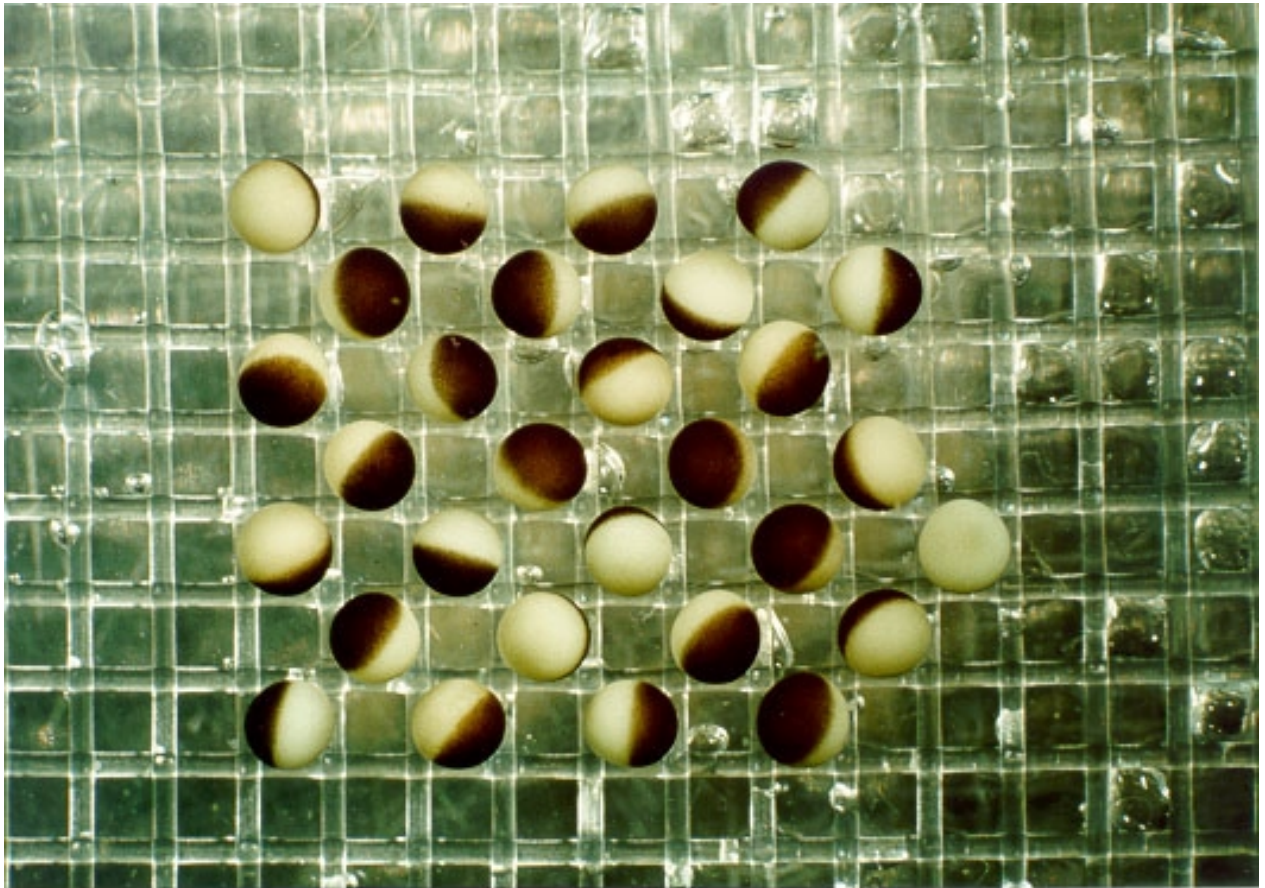
II.B.1 Oozytenisolierung

Zur Entnahme der Oozyten aus *Xenopus-laevis*-Fröschen (bezogen von Firma Kähler, Hamburg) wurde zunächst zur Betäubung ein erwachsener, weiblicher Frosch in 1 Liter einer 0,1%igen 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung [=Tricain, Sigma; (G/G)] für ca. 15 min gelegt. Die Vollständigkeit der Narkose konnte dabei anhand der totalen Erschlaffung der Beinmuskulatur des Frosches überprüft werden. Anschließend wurde der Frosch mit dem Rücken auf Eis gelegt und möglichst weit mit Eis bedeckt, um einerseits die Narkose aufrecht zu erhalten und andererseits mögliche Blutungen zu minimieren. Dann wurde die Froschhaut an der späteren Schnittstelle zur Desinfektion und zur Entfernung des Schleimes mit 70%igem Ethanol gereinigt. Mit einem sterilen Skalpell wurde dann jeweils eine ca. 1 cm lange Öffnung durch Bauchhaut, Muskelfaszie und Muskelschicht geschnitten. Durch den so geschaffenen Zugang zum Bauchraum des Frosches konnten mit Pinzette und Skalpell die Ovarialsäcke entnommen werden und die Wunde mit resorbierbarem chirurgischem Nahtmaterial (Firma Ethicon, Norderstedt) vernäht werden. Bis zur vollständigen Rückerlangung des Reaktionsvermögens wurde das Froschweibchen in einen Behälter mit wenig Leitungswasser gesetzt.

Die entnommenen Ovarialsäcke, in denen Oozyten aller Reifestadien enthalten waren, wurden dann in OR-2-Lösung mit Pinzette und Schere mechanisch zerteilt, um den späteren Kollagenaseverdau zur Vereinzelung und Defollikulierung der Oozyten zu erleichtern. Nach mehrmaligem Waschen mit OR-2-Lösung wurden die Oozyten mit 20 ml Kollagenase-Lösung versetzt (40 mg Kollagenase der Firma Worthington - Biochemical Corporation, Lakewood USA, auf 20 ml OR-2). Die Kollagenasebehandlung erfolgte bei 18°C unter leichtem Schütteln. Die Verwendung der Ca²⁺-freien OR-2-Lösung bewirkte eine erleichterte Zellseparation und Defollikulierung (Masui, 1967). Die Dauer dieses Kollagenaseverdaus betrug zwischen 120 und 150 Minuten. Nachdem ein Großteil der Oozyten vereinzelt und defollikuliert war (Kontrolle unter dem Stereomikroskop), wurde die Kollagenasebehandlung abgebrochen, und die Oozyten wurden bis zur vollständigen Entfernung der Kollagenase mit ND-96 Lösung gewaschen.

Aus dem Gemisch der so erhaltenen Oozyten unterschiedlicher Wachstums- und Reifestadien wurden nun unter einem Stereomikroskop die vollausgewachsenen und unbeschädigten Oozyten des Reifestadiums VI aussortiert (Dascal, 1987; siehe Abbildung II.2). Die aussortierten Oozyten wurden in Gruppen von jeweils ca. 20 Stück in Kulturschälchen mit

antibiotikahaltiger ND-96-Lösung aufbewahrt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 18°C auf einem Schüttler (20 Umdrehungen/Minute), um ein Aneinanderhaften und/oder eine Deformierung der Oozyten zu verhindern. Um das Risiko eines Keimbefalls zu minimieren, wurde die antibiotikahaltige ND-96-Lösung alle 2 Tage gewechselt. Dabei wurden auch die zwischenzeitlich beschädigten Oozyten aussortiert.



1 mm

Abbildung II.2: *Xenopus*-Oozyten des Entwicklungsstadiums VI

Die verwendeten Kulturmedien für die *Xenopus*-Oozyten waren wie folgt zusammengesetzt: Angaben jeweils in mmol/l, wenn nicht anders angegeben. HEPES steht für N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

Substanz	Firma	ND-96	antibiotikahaltige ND-96	OR-2
NaCl	Merck	96	96	82,5
KCl	Merck	2	2	2
CaCl ₂ *6H ₂ O	Merck	1,8	1,8	0
MgCl ₂ *6H ₂ O	Merck	1	1	1
HEPES	Sigma	5	5	5
Natriumpyruvat	Sigma	0	2,5	0
Theophyllin	Sigma	0	0,5	0
Gentamicin	Sigma	0	50 µg/ml	0
pH-Wert (eingestellt mit NaOH)	Merck	7,5	7,5	7,5

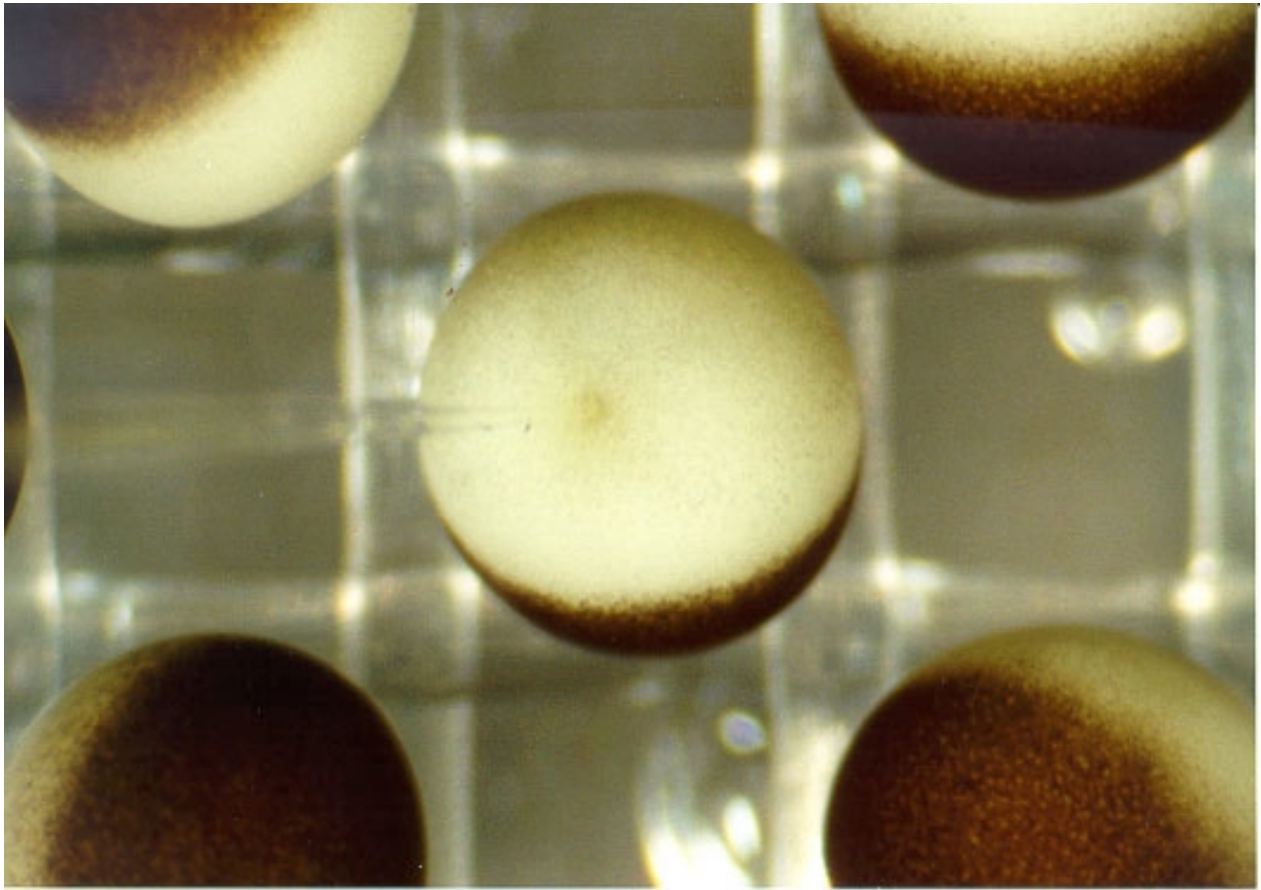
II.B.2 Injektion von cRNA in Oozyten

Die Injektion der cRNA in die Oozyten erfolgte unter einem Stereomikroskop (Zeiss) am Tag nach der Entnahme aus dem Frosch. Wegen der Empfindlichkeit der cRNA wurde dabei mit Latex-Handschuhen (Unigloves; Troisdorf) gearbeitet, alle Gerätschaften wurden vorher mit Incidur-Spray (Braun; Melsungen) desinfiziert und RNase-freie Injektionskapillaren, Kulturschälchen und Pipettenspitzen verwendet. Die Injektionskapillaren wurden folgendermaßen hergestellt: Zunächst wurden Borosilikatglaskapillaren (World Precisions Instruments, Inc. Sarasota, USA) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm mithilfe eines Mikroelektrodenpullers (DMZ-Universal-Puller der Firma Zeitz-Instrumente, Augsburg) zu Mikroelektroden mit langer Spitze gezogen. Ein Teil der Spitze wurde unter dem

Stereomikroskop abgebrochen und mithilfe eines Heizdrahtes spitz in die Länge gezogen. Dies sollte gewährleisten, dass der Durchmesser der Kapillarenspitze zwar groß genug war, um cRNA aufzusaugen und beim Injizieren wieder abzugeben, andererseits möglichst so klein und rund geformt war, dass eine Verletzung der Oozytenmembran beim Injizieren verhindert werden konnte (Durchmesser $\sim 10\text{-}15\ \mu\text{M}$). Die Injektion erfolgte mit Hilfe eines vollautomatischen Nanoliterinjektors der Firma World Precisions Instruments (Sarasota, USA), der in einem Mikromanipulator eingespannt war. Die Injektionskapillare wurde zunächst mit Paraffinöl (Sigma 400-5 heavy white oil, $\delta = 0,88\ \text{g/ml}$) gefüllt und über den Kolben des Nanoliterinjektors gezogen. Das Paraffinöl diente zur Abdichtung und Vermeidung von Luftblasen und gewährleistete damit die Genauigkeit des Nanoliterinjektors. Dann wurden ca. 3 μl der entsprechenden cRNA-Lösung (siehe Abschnitt I.A.1.e) aufgetaut und in die Injektionskapillare aufgezogen. Die zu injizierenden Oozyten wurden in ND-96-Lösung liegend auf einem Gitternetz fixiert und die Injektionskapillare wurde in einem Winkel von ca. 45° an die Oozyten herangeführt und eingestochen (siehe Abbildung II.3).

In jede Oozyte wurden 50 nl cRNA-Lösung in die vegetale (= weisse; siehe Abbildung II.3) Hemisphäre injiziert (auf der animalen Hemisphäre befindet sich der Zellkern, der unbeschädigt bleiben sollte). Bei einer Konzentration der cRNA-Lösung von 200 ng/ μl entsprach dieses Volumen $\sim 10\ \text{ng}$ cRNA. Um Mutanten zu exprimieren, die bei dieser injizierten cRNA-Menge noch keinen veränderten Strom in Oozyten bewirkten, verglichen mit einer nicht injizierten Oozyte, wurde die injizierte cRNA-Menge bis zu 5-fach erhöht. Die Koexpressionen von KCNQ1, KCNQ2, KCNQ5, HERG und Kv1.5 mit den β -Untereinheiten MinK, KCNE2, KCNE3 und KCNE4 erfolgten durch Koinjektion von 10 ng α -Untereinheit-cRNA und 5 ng β -Untereinheit-cRNA. Koexpressionen zweier α -Untereinheiten (KCNQ2 und KCNQ3; KCNQ3 und KCNQ5) erfolgten durch Koinjektion von je 5 ng cRNA.

Nach der Injektion wurden die Oozyten in 24-Loch-Gewebekulturplatten (Greiner, Frickenhausen) vereinzelt und in antibiotikahaltiger ND-96-Lösung bei 18°C aufbewahrt. Nach 1-6 Tagen waren genügend Proteine der jeweiligen cRNA exprimiert und es konnten die entsprechenden Ströme gemessen werden.



0.2 mm

Abbildung II.3: *Xenopus*-Oozyte während der Injektion von mRNA, Injektionskapillare von links kommend

II.C *Elektrophysiologische Methoden*

II.C.1 **Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp-Methode**

Der Gesamt-Strom einer Oozyte kann unter konstanten intrazellulären Bedingungen mit der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmen-Methode (=Two-Electrode-Voltage-Clamp-Method = TEVC-Methode) gemessen werden. Bei dieser Methode wird das Membranpotential einer Zelle auf einen bestimmten, vom Experimentator vorgegebenen Wert geklemmt und der Strom gemessen, der appliziert werden muß, um die Zelle auf dem gewünschten Potential zu halten (Hodgkin *et al.*, 1952; Bezanilla *et al.*, 1982; Finkel und Gage, 1985).

Abbildung II.4 zeigt den schematischen Aufbau der Messanordnung für Voltage-Clamp-Messungen an *Xenopus*-Oozyten:

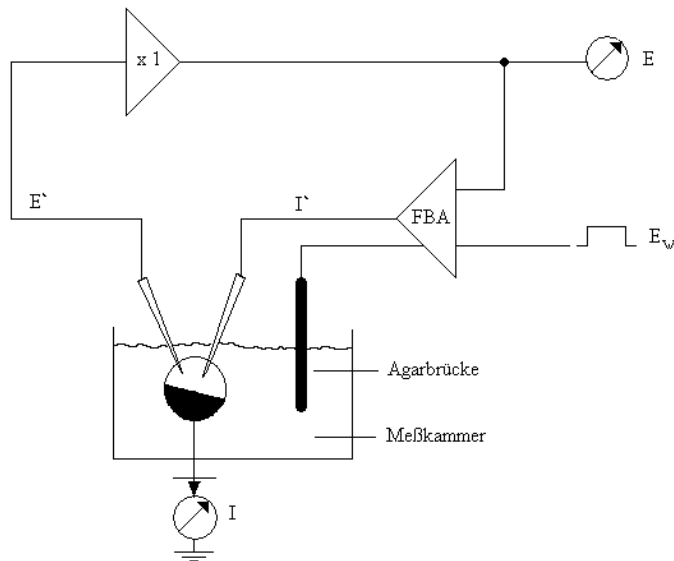


Abbildung II.4: Schematische Darstellung der TEVC-Methode.

Dabei wird mit zwei intrazellulären Mikroelektroden gearbeitet. Die Elektrode E' misst das Membranpotential E gegen eine geerdete Referenzelektrode im Bad (Agarbrücke oder Salzpellet). Im Rückkopplungsverstärker (FBA) wird das Membranpotential mit dem gewünschten Potential E_w verglichen und über die Elektrode I' kann dann der Strom I appliziert werden, um E_w zunächst zu erreichen und dann zu halten. Die Aufgabe des Rückkopplungsverstärkers besteht dann also darin, die durch einen fließenden Strom bedingte Spannungsänderung (z.B. einen Ionenstrom durch Ionenkanäle) durch Anlegen eines spiegelbildlichen Stroms zu verhindern. Durch Messen des Stroms I, den der Verstärker liefert, ist somit indirekt auch eine Messung des Nettostroms von Ein- und Ausströmen in bzw. aus der Oozyte möglich.

Bei elektrophysiologischen Messungen wird die Stromrichtung konventionsgemäß durch die Richtung des Kationenflusses definiert. Ein positiver Strom kann demnach durch einen Ausstrom von Kationen aus der Zelle und/oder einen Einstrom von Anionen in die Zelle hervorgerufen werden. Wird die Spannung bei TEVC-Experimenten auf einen positiven Wert geklemmt, so bedeutet dies, dass die Zellinnenseite gegenüber der Zellaußenseite ein positives Potential besitzt.

II.C.2 Aufbau des elektrophysiologischen Messstandes

Der TEVC-Messstand (siehe Abbildung II.5) bestand aus einem speziell konstruierten Experimentiertisch (Vibraplane, Kinetic Systems) (**D**): Die stählerne Tischplatte lag dabei auf luftgefüllten Dämpfungspuffern, um möglichst schwingungs- und erschütterungsfreie Messungen zu ermöglichen. Der gesamte Messstand war durch einen Faradayschen Käfig geschützt, um elektrische Störungen bei der Messung zu minimieren. Alle Metallgeräte innerhalb des Messstandes waren mit Erdungskabeln geerdet.



Abbildung II.5: Aufbau des elektrophysiologischen Messstandes. Die Beschriftung wird im Text erläutert.

Die speziell angefertigte Messkammer aus Plexiglas (**A**) befand sich in der Mitte des Experimentiertisches und fasste 3,5 ml Badlösung. Während der Messung wurde die Oozyte in der Messkammer ständig mit der jeweiligen Badlösung umspült. Der Zulauf erfolgte aus entsprechenden Badlösungs-Vorratsbehältern (nicht auf der Abbildung zu sehen), aus denen aufgrund des hydrostatischen Druckes die Lösungen über einen Silikonschlauch in die Messkammer geleitet werden konnten. Die Flussgeschwindigkeit der jeweiligen Badlösung betrug 20 ml/min, so dass in 10 - 15 Sekunden die Messkammerlösung komplett ausgetauscht war. Zur Absaugung diente ein Silikonschlauch, der über eine Waschflasche mit einer elektrischen Pumpe (Neuberger) (**E**) verbunden war.

Rechts und links der Messkammer befanden sich zwei manuelle Mikromanipulatoren (World Precision Instruments, Berlin) (**C**), an denen jeweils eine HS-2A-Headstage (Firma Axon Instruments Inc.; Foster City, CA (USA)) (**F**) befestigt war. Diese waren mit dem Rückkopplungsverstärker (TURBOTEC-10CX, npi electronic, Tamm) (**H**) verbunden. An den Headstages befanden sich Elektrodenhalter und ein Ag/AgCl-Elektroden Draht. Zum Einstechen in die Oozyte wurden mit einem DMZ-Universal-Puller (Firma Zeitz; Augsburg) Mikroelektroden aus Borosilikatglas (GC 150TF-15, 1,5 mm Außendurchmesser, 1,17 mm Innendurchmesser, dünnwandig mit Innenfilament, Firma Clark - Elektromedical Instruments; Pangbourne, England) gezogen, die mit 3 M KCl-Lösung gefüllt wurden, in die die Ag/AgCl-Elektroden Drähte eintauchten. Die Mikroelektroden hatten bei allen Versuchen einen Widerstand zwischen 0,3 und 1,3 MΩ.

Das Potential der Badlösung wurde mithilfe zweier Agarbrücken (3% Agar in 3M KCl-Lösung) oder zweier Salzpellets über eine VG-2A-BathClamp-Headstage der Firma Axon Instruments Inc. aktiv auf 0 mV geklemmt.

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur (21-23°C) durchgeführt. Oberhalb der Messkammer befand sich ein Stereomikroskop (Firma Zeiss) (**B**), um das kontrollierte Einstechen in die Oozyte zu gewährleisten. Zur Beleuchtung diente eine Gleichstrom-betriebene Halogenlampe (Firma Schott).

Alle Daten wurden über den Rückkopplungsverstärker und über ein ITC-16-Interface (Instrutec Corporation, Long Island; NY; USA) (**G**) in einem IBM-Pentium-II-Computer (**I**) aufgenommen und ausgewertet (Pulse- und Pulsefit-Software der Firma HEKA elektronik, Lambrecht). Diese Geräte standen außerhalb des Faradayschen Käfigs.

II.D Datenauswertung und Statistik

II.D.1 Datenauswertung

Zur Beschreibung der Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen wurde folgende Gleichung verwendet:

$$I(C) = I_{\max} * \frac{C}{C + IC_{50}}$$

I = gemessener Effekt nach Gabe von C

I_{\max} = maximale Inhibition, wurde im allgemeinen = 100 gesetzt

C = gegebene Substratkonzentration

IC_{50} = Substratkonzentration, bei der halbmaximale Inhibition eintritt

Die Charakterisierung der Strom-Spannungsbeziehungen wurde mit Origin Version 5.0 (Microcal Software) unter Verwendung einer Boltzmann-Funktion durchgeführt.

Die kinetische Analyse der Stromkurven erfolgte mithilfe des Pulse-Programmes (HEKA). Die angelegten berechneten Funktionen ("Fits") waren Exponentialfunktionen 1. oder 2. Ordnung:

Funktionen 1. Ordnung:

$$A(t) = A_0 + A_1 \cdot \exp(-t/\tau)$$

Funktionen 2. Ordnung:

$$A(t) = A_0 + A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2)$$

A: Strom zur Zeit t

A_0 : Strom-Endwert ("steady-state")

A_1, A_2 : Amplituden der Transienten

t: Zeit

τ_1, τ_2 : Zeitkonstanten

II.D.2 Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden, falls nicht anders beschrieben, als Mittelwerte und dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben (s.e.m. für standard error of the mean). Die Anzahl der Experimente wurde mit "n" angegeben.

$$SEM = \sqrt{((\sum x_i^2) - n(x)^2)/(n-1))}/(\sqrt{n})$$

x_i = Einzelwerte

n = Anzahl der Einzelwerte

x = Mittelwert

Die Werte wurden mit dem gepaarten Student t-Test auf Signifikanz geprüft ($P < 0,05$). Signifikanz ist im folgenden mit einem Sternchen * gekennzeichnet.

II.E Computer-gestützte Proteinmodellierung

Die vergleichende Proteinmodellierung ("comparative protein modeling", Guex und Peitsch, 1997) wurde mithilfe der im Internet frei verfügbaren Swiss-Model-Software durchgeführt. Als Matrize diente die bekannte Röntgenstruktur des KcsA-Kaliumkanals aus *Streptomyces lividans* (Protein data bank code 1BL8). Die von dem Modelling-Server errechneten Koordinaten wurden wie folgt weiterverarbeitet: Zur Visualisierung der dreidimensionalen Strukturen wurde das Molekülgraphikprogramm Sybyl6.6 genutzt (TRIPOS Associates Inc. St. Louis, MO, USA). Das generierte Strukturmodell wurde mit dem in Sybyl6.6 implementierten Kollmann-Kraftfeld optimiert, um sterisch ungünstige Kontakte aufzuheben bzw. die Geometrie des Modells zu validieren. Während des Optimierungsprozesses beruhten die elektrostatischen Wechselwirkungen auf der Kollman-Partialladungsverteilung. Es wurde eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 4r$ und ein cut-off-Wert von 8 Å bei der Berechnung der nicht-bindenden Interaktionen zwischen den Atomen verwendet.

Bindungswinkel, -längen und Torsionswinkel müssen für eine zuverlässige Verwendung von Proteinmodellen so exakt wie möglich sein. Laskowski *et al.* (1993) analysierten Torsionswinkel, die Peptidplanarität, Bindungslängen, -winkel sowie die Seitenkettenkonformation von bekannten Proteinstrukturen als Funktion zu ihrer kristallographischen Auflösung. Resultierend aus diesen Daten leiteten sie Werte abhängig von ihrer Auflösung der 3D-Strukturen ab. Das Programm PROCHECK gibt visuelle und quantitative Informationen über diese Merkmale des Strukturmodells wieder [wie z.B. Verteilung der (φ, ψ) -Torsionswinkel, Bindungswinkel und -länge, Qualität der Peptidbindungen, Seitenkettenkonformation]. Bezug nehmend auf diese Kriterien wurde das Strukturmodell von KCNQ1 in seiner Geometrie analysiert.

Der Ligand (293B) wurde manuell in eine potentielle Bindungsstelle gedockt. Aufgrund der Ausrichtung der Aminosäuren innerhalb des K^+ -Kanals bilden sich so genannte attraktive Interaktionen zwischen dem Liganden und KCNQ1 aus.

III Ergebnisse

III.A Molekulare Charakterisierung der Blockade von KCNQ1 und I_{Ks} durch das Chromanol 293B

Wie die Arbeitsgruppe um Prof. R. Greger zeigte, wird die Chloridsekretion in Kolonkrypten des Kaninchens und der Ratte durch die Leitsubstanz 293B und andere verwandte Chromanole inhibiert (Lohrmann *et al.*, 1995; Ecke *et al.*, 1995). Sie nahmen an, dass dies durch die Blockade eines cAMP-regulierten-Kaliumkanals vermittelt wird. Suessbrich *et al.* (1996b) zeigten in *Xenopus*-Oozyten eine Blockade des ebenfalls durch cAMP regulierten I_{Ks} -Kanals (Blumenthal und Kaczmarek, 1992), dessen β -Untereinheit MinK außer im Herzen auch in Epithelien exprimiert ist (Takumi *et al.*, 1988). Busch *et al.* (1996b) konnten diese Experimente in Kardiomyozyten vom Meerschweinchen bestätigen, indem sie native I_{Ks} -Ströme durch 293B blockierten. Die molekulare Struktur des I_{Ks} -Kanals (Zusammenlagerung von KCNQ1 und MinK) war zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt. Schröder *et al.* (2000) zeigten kürzlich durch *in-situ*-Hybridisierung die Koexistenz von KCNQ1 und MirP2 (MinK related protein 2, KCNE3, Abbott *et al.*, 1999) in diesen Kolonkrypten und deren funktionelle Interaktion. Die beiden Proteine bilden einen permanent offenen, selektiven Kaliumkanal, der durch das Chromanol 293B in *Xenopus*-Oozyten inhibiert wird und ebenfalls durch cAMP reguliert ist. Der Strom durch diesen Kanal aus KCNQ1/MirP2 entspricht weitgehend dem nativen Strom in den Kolonkrypten. Da KCNQ1/MirP2-Kanäle im Gegensatz zu I_{Ks} -Kanälen auch bei Ruhemembranpotentialen geöffnet sind und somit für den transepithelialen Transport geeignet scheinen, wird der Strom durch KCNQ1/MirP2-Kanäle nun als die treibende Kraft für die Chloridsekretion im Dickdarm angenommen.

Nach der Aufklärung des Aufbaus des kardialen I_{Ks} -Kanals durch Barhanin *et al.* (1996) und parallel durch Sanguinetti *et al.* (1996) zeigten Busch *et al.* (1997), dass in *Xenopus*-Oozyten homomere KCNQ1-Kanäle und der aus KCNQ1 und der funktionellen β -Untereinheit MinK gebildete I_{Ks} -Kanal mit jeweils unterschiedlichen IC_{50} -Werten inhibiert werden. Da I_{Ks} -Blocker aus den genannten Gründen (Abschnitt I, Einleitung) viel-versprechende, neuartige Antiarrhythmika darstellen könnten, sollte die Spezifität des Chromanols 293B getestet werden. Zusätzlich schien es relevant, den Einfluss von MinK auf die Pharmakologie anderer Kaliumkanäle, für die eine Interaktion mit MinK postuliert worden war, zu untersuchen. Letztlich sollte der Einfluss beider Untereinheiten auf die Inhibition auf molekularer Ebene aufgeklärt werden.

III.A.1 Spezifität der Blockade durch 293B und der Einfluss von Mink

Wie Suessbrich *et al.* (1996b, 1997) in *Xenopus*-Oozyten schon zeigten, werden Kanäle der Kv-Familie (rKv1.1; rKv1.2; rKv1.4; rKv1.5) und der HERG-Kanal durch 30 μM 293B nicht signifikant inhibiert, während I_{Ks} -Kanäle bei dieser Konzentration zu mehr als 80% blockiert werden. Yang *et al.* (2000) beschrieben einen partiellen Block durch beide 293B-Enantiomere von Kv1.5 in stabil transfizierten L-Zellen und von Kv4.3-Kanälen in transient transfizierten CHO-Zellen. Um die Spezifität des Chromanolblocks näher zu untersuchen, wurde die Inhibition der Leitsubstanz 293B bei verschiedenen verwandten Spezieshomologen und anderen Mitgliedern der KCNQ-Familie getestet. Letzteres geschah auch im Hinblick auf das Nebenwirkungsprofil eines möglichen neuen Antiarrhythmikums.

III.A.1.a Inhibition KCNQ1-verwandter Kaliumkanäle durch 293B

Diese Experimente sollten erste Hinweise auf den molekularen Angriffspunkt von 293B ergeben. Da die unterschiedlichen Kanalproteine eine hohe Homologie zu dem humanen KCNQ1-Protein aufweisen, sollten Analogie oder Differenzen in der Pharmakologie Anhaltspunkte für die Lokalisation der Bindungsstelle in konservierten oder nicht konservierten Regionen liefern. Bisher gab es Hinweise, dass 293B vom Zytoplasma her wirkt, da Loussouarn *et al.* (1998) in der *cell-attached*-Patch-clamp-Konfiguration an mit I_{Ks} transfizierten COS-Zellen einen schnell eintretenden Block durch 293B beobachteten. Man würde keinen oder einen nur sehr langsam eintretenden Block erwarten, wenn 293B von extrazellulär in die Zelle eintreten und durch die Membran in die (bisher blockerfreie) Patchpipette penetrieren müsste, um dort erst nach langer Dauer die Wirkkonzentration zu erreichen. Der zweite Hinweis für eine mögliche Lokalisation der Binde- oder Wirkstelle von 293B ist die von uns beobachtete (Seeböhm *et al.*, 2000) und auch von einer anderen Arbeitsgruppe publizierte (Fujisawa *et al.*, 2000) hohe Affinität von 293B an geöffnete I_{Ks} -Kanäle. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass der Wirkort des Moleküls an der Pore des Kanals liegt (Hille, 1992).

Die Expression von homomeren humanen KCNQ1-Kanälen (hKCNQ1) in *Xenopus*-Oozyten führte zu den charakteristischen, schnell aktivierenden, spannungsabhängigen Kaliumströmen (Abbildung III.1). KCNQ1-Kanäle aus dem Hai (sKCNQ1, Waldegger *et al.*, 1999), kqt1-Kanäle aus dem genetischen Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (Wei *et al.*, 1996) und humane KCNQ2-Kanäle (Biervert *et al.*, 1998) produzierten ebenfalls die jeweils beschriebenen Ströme. Nach Expression von KCNQ3-Kanälen aus der Ratte (rKCNQ3) in *Xenopus* Oozyten wurden Ströme gemessen, die zu den beschriebenen Strömen, die man

nach Expression humaner KCNQ3-Kanäle beobachten kann (Wang, Pan *et al.*, 1998), analog waren. Alle Kanäle wurden mit ähnlichen Spannungsprotokollen gemessen. Von einem Haltepotential von -100 mV aus wurde alle 10 s auf einen Testpuls von 0 mV depolarisiert. Der Testpuls dauerte für die etwas langsamer aktivierenden KCNQ1-Ströme 3 s, während er für die schneller den "steady-state" erreichenden KCNQ2- und KCNQ3-Ströme 1 s betrug. Die Ströme wurden mit 1 kHz gefiltert. Zur Ermittlung der 293B-Konzentration, die die Ströme zu 50% inhibierte (IC_{50} -Werte), wurden die Stromamplituden am Ende des Testpulses nach 5-minütigem Einwaschen der jeweiligen Substanz bestimmt und gegen die Konzentrationen aufgetragen.

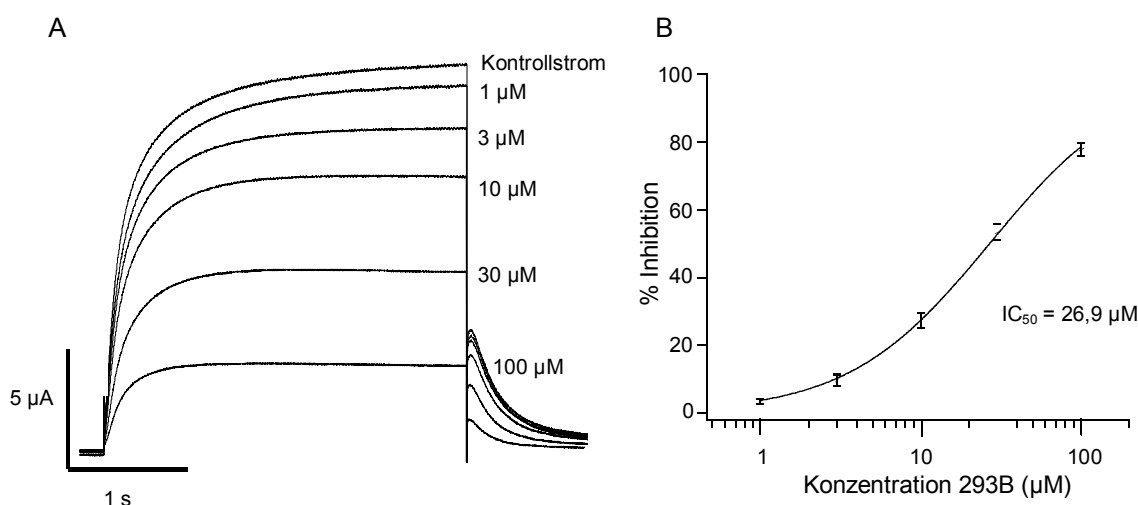


Abbildung III.1: Expression von hKCNQ1 in *Xenopus*-Oozyten und der Effekt unterschiedlicher 293B-Konzentrationen (A). B zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehung in logarithmischer Auftragung.

Humane KCNQ1-Kanäle wurden in unserem Expressions- und Messsystem mit einem IC_{50} -Wert von $26,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ($n = 5$, Abbildung III.1) inhibiert. Die Substanz ließ sich wegen der hohen Lipophilie nur sehr langsam auswaschen. Busch *et al.* (1997) exprimierten homomere KCNQ1-Kanäle aus der Maus (mKCNQ1) und bestimmten die 293B-Konzentration bei halbmaximaler Inhibition mit einem etwas erhöhten Wert von $\sim 40 \mu\text{M}$, verglichen mit dem von uns erhaltenen Wert für den humanen Kanal. In unserem System ergab sich auch für den Mauskanal eine Inhibition, die der des humanen Proteins entsprach ($n = 3$). Für das Spezieshomologe aus dem Hai wurde ebenfalls ein IC_{50} -Wert bestimmt, der dem des menschlichen Kanals entspricht ($24,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$, $n = 3$, Abbildung III.2). Maus- und Hai-KCNQ1 sind in der unter Kaliumkanälen hochkonservierten S5/H5/S6-Region zu dem humanen Kanal nahezu identisch (siehe Abbildung I.3). Das KCNQ1-Homolog aus dem Wurm (kqt1) wurde durch Chromanol 293B stärker inhibiert (IC_{50} : $16,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$, $n = 5$, siehe Abbildung III.2).

Dieser Kanal unterscheidet sich auch in der genannten Porenregion an manchen Positionen von dem humanen Kanal (siehe Abbildung I.3).

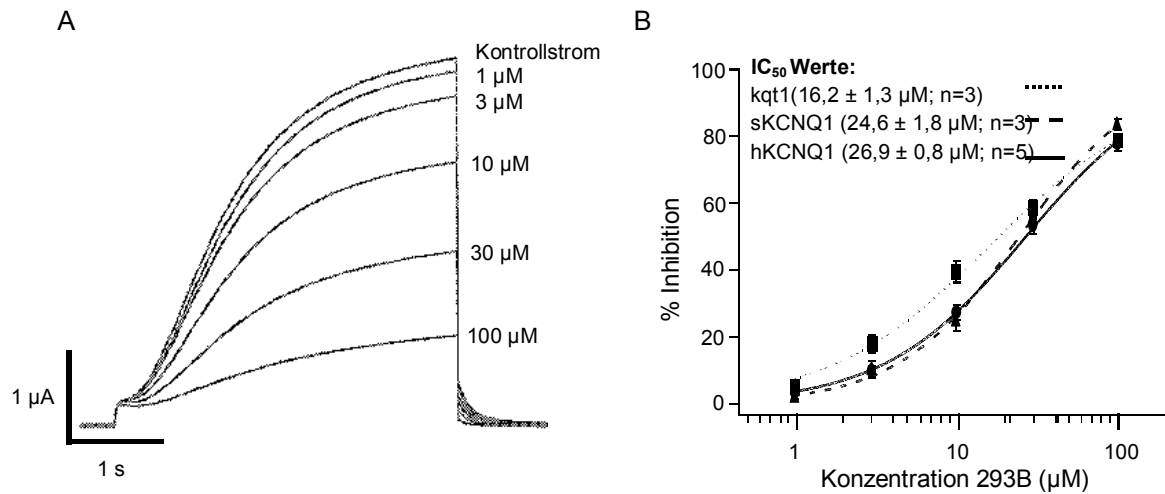


Abbildung III.2: Expression von kqt1 (*C. elegans*) in *Xenopus*-Oozyten und der Effekt unterschiedlicher 293B-Konzentrationen (**A**). **B** zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehung in logarithmischer Auftragung von kqt1-, sKCNQ1- und hKCNQ1-Kanälen (die Messpunkte von kqt1 sind als Quadrate, die von sKCNQ1 als Dreiecke und die von hKCNQ1 als Kreise dargestellt).

Die noch junge Familie der KCNQ-Kanäle umfasst mittlerweile weitere drei Mitglieder, die wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, alle bei vorliegendem genetischen Defekt für unterschiedliche Erbkrankheiten verantwortlich sein können. In KCNQ2 und KCNQ3 sind Mutationen bekannt, die zu dominant erblichen Epilepsien führen, während für KCNQ4 eine Verbindung zu erblicher Taubheit festgestellt wurde. Da der humane "knock-out" als Phänotyp für diese Kanäle also bekannt ist, schien es wichtig, den Effekt einer Substanzklasse, die klinisch Bedeutung erlangen könnte, zu untersuchen. KCNQ2 und KCNQ3 zeigten sich in unseren Versuchen durch 100 µM 293B sowohl als Homomere als auch als Heteromere fast nicht blockierbar (siehe Abbildung III.3, A-C).

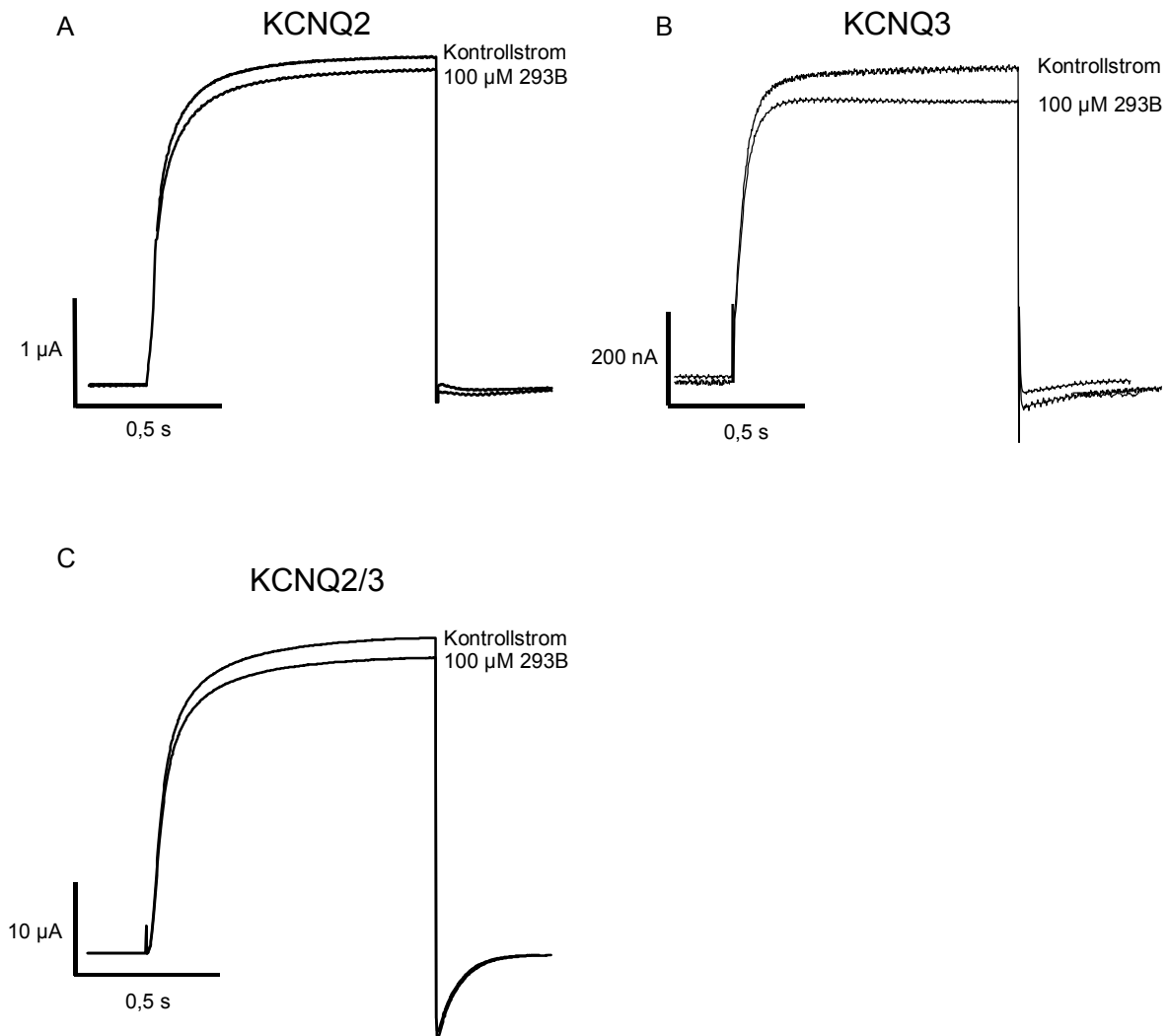


Abbildung III.3: Expression von hKCNQ2, rKCNQ3 und heteromeren hKCNQ2/rKCNQ3-Kanälen in *Xenopus*-Oozyten und der Effekt von 100 µM 293B (A-C).

III.A.1.b Klonierung, Charakterisierung und Bestimmung der Sensitivität gegenüber 293B eines neuen Mitglieds der KCNQ-Familie

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte untersucht werden, ob weitere Mitglieder der Familie im Menschen vorkommen und wie sich diese gegenüber dem Chromanol 293B verhalten. Da alle anderen Mitglieder der KCNQ-Familie einen potentiell interagierenden Partner innerhalb der Familie aufweisen, war es interessant, im Rahmen der Identifizierung der Chromanol-Bindungsstelle zu untersuchen, ob es auch für KCNQ1 einen solchen Partner gibt.

Ergebnisse

kenq4	M A E A P	P R R L G L G P P F	G D A P R A E L V A	L T A V Q S E Q G E	A G G G .	39
kenq2	M V Q K	S R N G G V Y P G E	S G E K K L K V G	F V G L D P G A F D	S T R D .	37
kenq5	M P R H H A G G E E	G G A A G L W V K S	G A A A A A G G G	R L G S G M K D V E	S R V G R	45
kenq3	M G L K A R R A A G	A A G G G D G G G	G G G A A A N P A G	G D A A A A G D E E	S K R V G .	44
kenq1	M A A A S S P P R A	E R K R W G W G R L	P G A R R G S . A G	L A K K C P F S L E	L A E G .	43

kenq4 G S P	R R L L G L L G S S P L	P P G A P L	P G P G S G S G S A	68
kenq2 G A .	. . L L L L L G S E A	P K R G G S I L	S K P R R A G . G A G	63
kenq5	V L L N S A A A R G	D G L L L L G G T R A	A T L L G G G G G R	R E S R R R G K Q G G A	R M S L L L	90
kenq3	L A P G D V E Q V T	L L A L G A G A D K D	G T L L L L E G G	D E G Q R R R T P Q G G	I G L L L A	89
kenq1	. . . G P A G G A L	Y A P I A P G A P G	P A P P A S P A A P	A A P P V A S D L G	P R P P V	85

kenq4 C G O R	S S A A H K R Y R R	L Q N W V Y N V L E	R P R G W . A F V Y	H V F I F	106
kenq2 A G . K	P P K R N A F Y R K	L Q N F L Y N V L E	R P R G W . A F I Y	H A Y V F	100
kenq5	G K P L S Y T S S Q	S C R R N V K Y R R	V Q N F L Y N V L E	R P R G W . A F I Y	H A F V F	134
kenq3	K T P L S R P V K R	N . . N A K Y R R	V Q N T L Y N V L E	R P R G W . A L L Y	H A L V F	130
kenq1	S L D P R V S I Y S	T R R P V L A R T H	V Q G R V Y N F L E	R P T G W K C F V Y	H F A V F	130

-----S1-----			-----S2-----			
kenq4	L L V F S C L V L S	V L S T I Q E H Q E	L A N E C L L I L E	F V M I V V F G L E	Y F V R V	151
kenq2	L L V F S C L V L S	V F S T I K E Y E K	S S E G A L Y I L E	I V T I V V F G V E	Y F V R I	145
kenq5	L L V L G C L I L A	V F S T I P E H T K	L A S S C L L I L E	F V M I V V F G L E	F I L R I	179
kenq3	L I V L G C L I L A	V L T T F K E Y E T	V S G D W L L L L E	T F A I F I F G A E	F A L R I	175
kenq1	L I V L V C L I F S	V L S T I E Q Y A A	L A T G T L F W M E	I V L V V F E G T E	Y V V R L	175

-----S3-----			-----S4-----			
kenq4	W A A G C C C R Y R	G W R Q G R L R F A R	K P F C V I D I T V	F V A S I A V I A A	G T Q G N	196
kenq2	W A A G C C C R Y R	G W R Q G R L R F A R	K P F C V I D I T V	L I A S I A V L A A	G T Q G N	190
kenq5	W A A G C C C R Y R	G W R Q G R L R F A R	K P F C V I D I T V	L I A S I A V V S A	K T Q G N	224
kenq3	W A A G C C C R Y R	G W R Q G R L R F A R	K P L C M L D I T V	L I A S V B V A V	K N Q G N	220
kenq1	W A A G C R S K Y V	G L W G R L R F A R	K P I S T I D I T V	V V A S M V V L C V	G S K G Q	220

-----S4-----			-----S5-----			
kenq4	I F A T S A L R S M	R F L Q I L R M V R	M D R R G G T W K L	L G S V V Y A H S K	E L I T A	241
kenq2	I F A T S A L R S L	R F L Q I L R M V R	M D R R G G T W K L	L G S V V Y A H S K	E L I T A	235
kenq5	I F A T S A L R S L	R F L Q I L R M V R	M D R R G G T W K L	L G S A T C A H S K	E L I T A	269
kenq3	I F A T S A L R S L	R F L Q I L R M L R	M D R R G G T W K L	L G S A T C A H S K	E L I T A	264
kenq1	I F A T S A I R G I	R F L Q I L R M L H	V D R Q G G T W R L	L G S V V F I H R Q	E L I T T	265

-----S5-----			-----S6-----			
kenq4	W Y I G F L V L I F	A S F L V Y L A E K	D A N S D F S S Y A	D S L W W	276
kenq2	W Y I G F L V L I L	A S F L V Y L A E K	G E N D H E D T Y A	D A L W W	270
kenq5	W Y I G F L V L I F	S S F L V Y L V E K	D A N K E F S T Y A	D A L W W	304
kenq3	W Y I G F L T L I L	S S F L V Y L V E K	D V P E V D A Q G E	E M K E E F E Y A	D A L W W	309
kenq1	L Y I G F L G L I F	S S Y F V Y L A E K	D A V N E S G R V E E G S Y A	D A L W W	305

-----H5-----			-----S6-----			
kenq4	G T I T L T T I G Y	G D K T P H T W L G	R V L A A A T F A L L	G I S F F A L P A G	I L G S G	321
kenq2	G T I T L T T I G Y	G D K Y P O T W N G	R L L A A A T F A L L	G V S F F A L P A G	I L G S G	315
kenq5	G T I T L T T I G Y	G D K T P L T W L G	R L L S A G A F F A L L	G T S F F A L P A G	I L G S G	349
kenq3	G L I T L A T I G Y	G D K T P K T W E G	K R L A A A T F S L I	G V S F F A L P A G	I L G S G	354
kenq1	G V V T V T T I G Y	G D K V P O T W V G	K T I A S C F S V F	A I S F F A L P A G	I L G S G	350

kenq4	F A L K V Q E Q H R	Q K H F E K R R M F	A A N L I Q A A W R	L Y S T D M S R A Y	L T A T W	366
kenq2	F A L K V Q E Q H R	Q K H F E K R R R N E	A A N L I Q S A W R T	F Y A T N I S R T D	L T A T W	360
kenq5	F A L K V Q E Q H R	Q K H F E K R R R N E	A A N L I Q C V W R R	S Y A A D E K S V S	L T A T W	393
kenq3	F A L K V Q E Q H R	Q K H F E K R R K F E	A A E L I Q A A W R	Y Y A T N P N R I D	L V A T W	399
kenq1	F A L K V Q Q Q R	Q K H F N R Q I P A	A A S L I Q T A W R	C Y A A E N P D . .	. S S T W	392

kenq4	Y Y Y D S . I L P	S F R E L A L L F E	H V Q R A R N . G G	L R P L E V R R A P	Y P D G A	408
kenq2	Q Y Y E R T V T V P	M Y R L I P P L . N	Q L E L L L K N L K S	K S G L A F R K D P	P P E P S	404
kenq5	K P	H L K A L	400
kenq3	R F Y E S V M S E P	F F R	412
kenq1	K I Y I R K A . . P	R S H T L L S P S P	K P K K S V V V K K	K K F K L D K D N G	V T P G E	435

kenq4	P S R Y P E V A T C	H R E G S T S F C P	G E S S R M G I K D	R I R M G S S Q R R	T G P S K	453
kenq2	P S Q H T C	S E T K K E O G E A K V S L K D	R V . F S S P R G V	A A K G K	427
kenq5 H T C	S E T K K E O G E A	A S S O K L S F K E	R V R M A S P R G Q	S I K S R	438
kenq3 H T C	S E T K K E O L E A	A S S O K L G L L B	R V R L S N P R G S	N T K G K	443
kenq1	K M L T V P H I T C	D P P E R R L D H	F S V D . . G Y D S	S V R	466

kenq4	Q Q L A P P T M P T	S P S S E Q S G F A	T S P T K V Q P K S W	S F N D R T R F R A	S I R I K	498
kenq2	G S P Q A Q T V R R	S P S A D Q S L E F A	D S P S K V Q P K S W	S F G D R S R A R Q	A F R I K	471
kenq5	Q A S V G D . . R R	S P S T D I T A E G	. S P T K V Q P K S W	S F N D R T R F R P	A F R I K	480
kenq3 L F T	P L N V . D A I E E .	. S P S K E P K P V	G L N N K E R F R T	A F R M K	479
kenq1 L F T	P L N V . D A I E E .	K S P T L L E V S M	P H F M R T N	483

kenq4	. . . P R T S A E .	D A . . P S E E V A	E E K S Y Q C E L T	V D D I M F A V K T	V I R S T	537
kenq2	G A A S R O N S E .	E A S L P G E D I V	D D K S C P C E F V	T E D D L T P G L K T V	S I R A V	515
kenq5	S S Q P K P V I D A	D T A T G T D D V Y	D E K G C Q C D V S	V E D D L T P P L K K A	V I R A V	525
kenq3	A Y A F W O S S E .	D A G T . G D P M A	E D R G Y G N D F P	I E D M I E T L K A	A I R A V	522
kenq1 S F A E	D L D L E G E T L L	T P I T H	I S Q L R E H H R A	T I K V T	517

Ergebnisse

hochkonservierte Region mit noch ungeklärter Funktion						
kcnq4	R I L K F L V A K R	K F K E T L R P Y D	V K D V I E Q Y S A	G H L D M L G R I K	S L Q T R	582
kcnq2	C V M R F L V S K R	K F K E S L R P Y D	V M D V I E Q Y S A	G H L D M L S R I K	S L Q S R	560
kcnq5	R I L K F H V A K R	K F K E T L R P Y D	V K D V I E Q Y S A	G H L D M L C R I K	S L Q T R	570
kcnq3	R I L Q F R L Y K K	K F K E T L R P Y D	V K D V I E Q Y S A	G H L D M L S R I K	Y L Q T R	567
kcnq1	R R M Q Y F V A K K	K F Q Q A R K P Y D	V R D V I E Q Y S Q	G H L N L M V R I K	E L Q R R	562
kcnq4	V D Q I V G R G P G	. D R K A R E K G D	K G P S D A	607
kcnq2	V D Q I V G R G P A	. . . I T D K D R T	K G P A E A	583
kcnq5	V D Q I L G K G Q I T S D K K S R E	K T T A E H	594
kcnq3	I D M I F T P G P P	. S E P K H K K S Q	K G S A F T F P S Q	Q S P R N E P Y V A	R E S T S	611
kcnq1	L D Q S T G K P S L	F I S V S E K S K D	R G S N	586
kcnq4	E V V D E I S M M G	R V V K V E K Q V Q	S I E H K L D L L L	G F Y	640
kcnq2	E L P E D P S M M G	R L G K V E K Q V L	S M E K K L D F L V	N I Y M Q	P T E T E	628
kcnq5	E T T D D L S M L G	R V V K V E K Q V Q	S I E S K L D C L L	D I Y Q Q V L R K G	S A S A L	639
kcnq3	E I . E D Q S M M G	K F V K V E R Q V Q	D M G K K L D F L V	D M H M Q H M E R	649
kcnq1 T I G A	R L N R V E D K V T	Q L D Q R L A L I T	D M L H Q L L S L H	G G S T P	625
kcnq4 S R C T R S G T	648
kcnq2	A Y F G A K E P E P A P P Y H S	P E D S R E . . . H	V D R H G C I V K I	V R S S S	666
kcnq5	A L A S F Q I P P F	E C E Q T S D Y Q S	P V D S K D L S G S	A Q N S G C I S R S	T S A N I	684
kcnq3 L Q V Q V T	E Y Y P T K G T S S	P A E A E K K E D N	. . . R Y S D L K T L	I C N Y S	688
kcnq1	G	626
kcnq4	S A S L G A V	Q V P L F D P D I T	S	666
kcnq2	S T G Q	K N F S A P P A	A E P V Q C E P S T	S W Q P Q	693
kcnq5	S R G L Q F I L T P	N E F S A Q T F Y A	L S P T M H S Q A T	Q V P I S Q S D G S	A V A A T	729
kcnq3	E T G P P E P P Y S	F H Q V T I D K V S	P Y G F F A H D P V	N I P R G G F S S G	K V Q A T	733
kcnq1	S G G P P	631
kcnq4 D Y H S	670
kcnq2	S H P R Q G H G T S	P V G D H G S L V R	I P P P A H E R S	L	724
kcnq5	N T I A N Q I N T A	P K P A A P T T L Q	I P P P L P A I K H	L P R P E T L H P N	P A G L Q	774
kcnq3	P P S S A T T Y V E	R P T V L P I L T L	L D S R V S C H S Q	A D L Q G	768
kcnq1	631
kcnq4	670
kcnq2 S A Y G	G G N R A S M E F L	R Q E D T P G C R P	P F G T L R D S D T	S T S I P	763
kcnq5	E S I S D V T T C L	V A S K E N V Q V A	Q S N L T K D R S M	R K S F D M G G E T	L L S V C	819
kcnq3	P Y S D R I S P R Q	R R S I T R D S D T	P L S L M	793
kcnq1	631
kcnq4	P V D H E D T S V S	A Q T L S I S R S V	S T . N M D G	696
kcnq2	S V D H E E L E R S	F S G F S I S Q S .	K E . N L D A L N S	C Y A A V A P C A K	V R P Y I	806
kcnq5	P M V P K D L G K S	L S V Q N L I R S T	E E L N I Q L S G S	E S S G S R G S Q D	F Y P K W	864
kcnq3	S V N H E E L E R S	P S G F S I S Q D R	D D Y V F G P N G G	S S W	826
kcnq1	631
kcnq4	696
kcnq2	A E G E S D T D S D	L C T P C G P P P R	S A T G E G P F G D	V G W A G	841
kcnq5	R E S K L F I T D E	E V G P E E T E T D	T F D A A P Q P A R	E A A F A S D S L R	T G R S R	909
kcnq3	M R E K R Y I A E G E T D T D T D	P F T P S G S M P L	S S T G D G	859
kcnq1	R E G G A H I T Q P	C G S G G S V D P E	L F L P S N T L P T Y	662
kcnq4	* 696
kcnq2	P R	* 844
kcnq5	S S Q S I C K A C E	S T D A L S L P H V	K L K	* 932
kcnq3	I S D S V W T P S N	K P I	* 872
kcnq1	E Q L T V P R R C P	D E G S	* 676

Abbildung III.4: Die Proteinsequenz von hKCNQ5 und ein Vergleich mit den anderen bekannten KCNQ-Proteinen. Identische und konservierte Aminosäuren sind jeweils schwarz bzw. grau unterlegt. Die Transmembranregionen S1 bis S6 und die Porenregion H5 sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Zusätzlich ist eine hochkonservierte Region im C-terminalen, zytosolischen Bereich in derselben Art markiert.

Mithilfe einer Datenbankanalogsuche konnten wir eine bisher unbekannte Sequenz eines KCNQ-Proteins identifizieren und nachfolgend klonieren (siehe Abschnitt II.A.2.c). Die vollständige cDNA codiert für ein Protein mit 932 Aminosäuren und einer Molekularmasse von

~102 kDa. Eine Hydropathieanalyse unterstützte das erwartete topologische Modell mit sechs Transmembrandomänen.

Abbildung III.4 zeigt einen Sequenzvergleich aller fünf Mitglieder der KCNQ-Familie. KCNQ5 zeigt eine hohe Homologie zu den bereits identifizierten KCNQ-Proteinen mit der engsten Verwandtschaft zu KCNQ4 (65% Identität) und der geringsten zu KCNQ1 (40% Identität, siehe auch Abbildung I.2). RNA-Signale von KCNQ5 konnten im Gehirn und im Skelettmuskel nachgewiesen werden (siehe Abbildung III.5). Da das Expressionsmuster im Gehirn evident mit dem von KCNQ2 und KCNQ3 überlappte (Yang, Levesque *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; Biervert *et al.*, 1998), sollte auch eine mögliche funktionelle Interaktion mit diesen Proteinen untersucht werden.

Nach Expression in *Xenopus*-Oozyten zeigten homomere KCNQ5-Kanäle ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften wie die anderen Mitglieder der Familie (siehe Abbildung III.6, A und B). Die Ströme aktivierten etwas langsamer als KCNQ1-Ströme. Die Zeitkonstanten der schnellen Komponente der Aktivierung betragen bei einem Spannungspuls auf 40 mV für KCNQ5 119 ± 7 ms und für KCNQ1 33 ± 3 ms, während sich die langsame Komponente nicht signifikant unterschied (~900 ms für beide Kanäle). Die Kanäle öffneten bei einem Spannungssprung auf -60 mV, ähnlich wie KCNQ1- und KCNQ2- Kanäle (siehe auch Abbildung III.25).

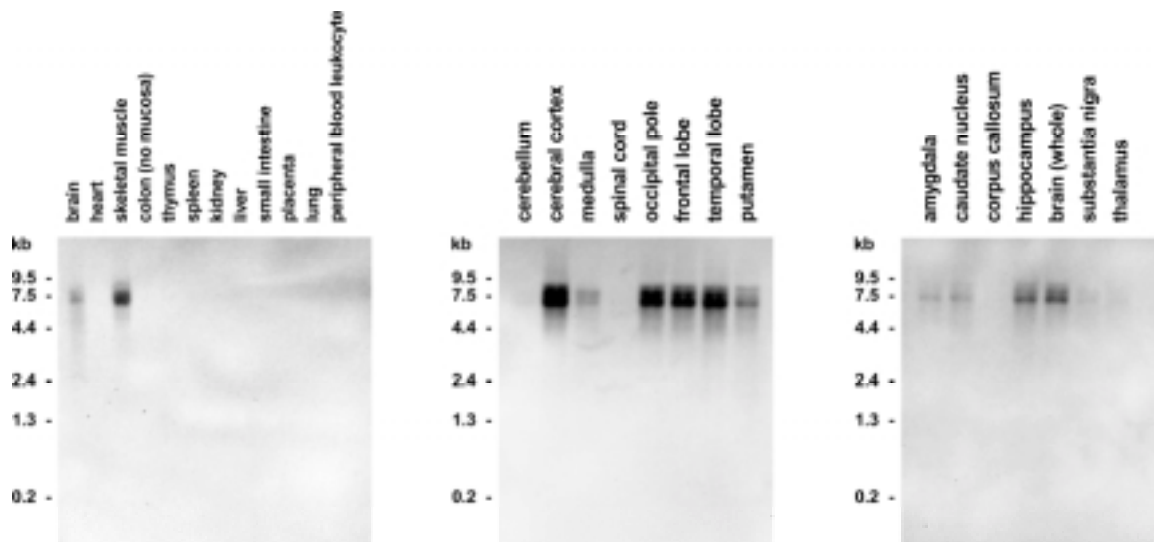


Abbildung III.5: Gewebeverteilung des humanen KCNQ5-Kaliumkanals. Northern Blots (Firma CLONTECH), die poly(A)⁺-RNA enthalten, wurden mit einer KCNQ5-spezifischen DIG-markierten Sonde hybridisiert. Die Blots enthielten RNA verschiedener menschlicher Gewebe (links) und RNA spezieller Hirnregionen (mitte und rechts). Zur Durchführung der Experimente siehe auch Abschnitt II.A.2.d.

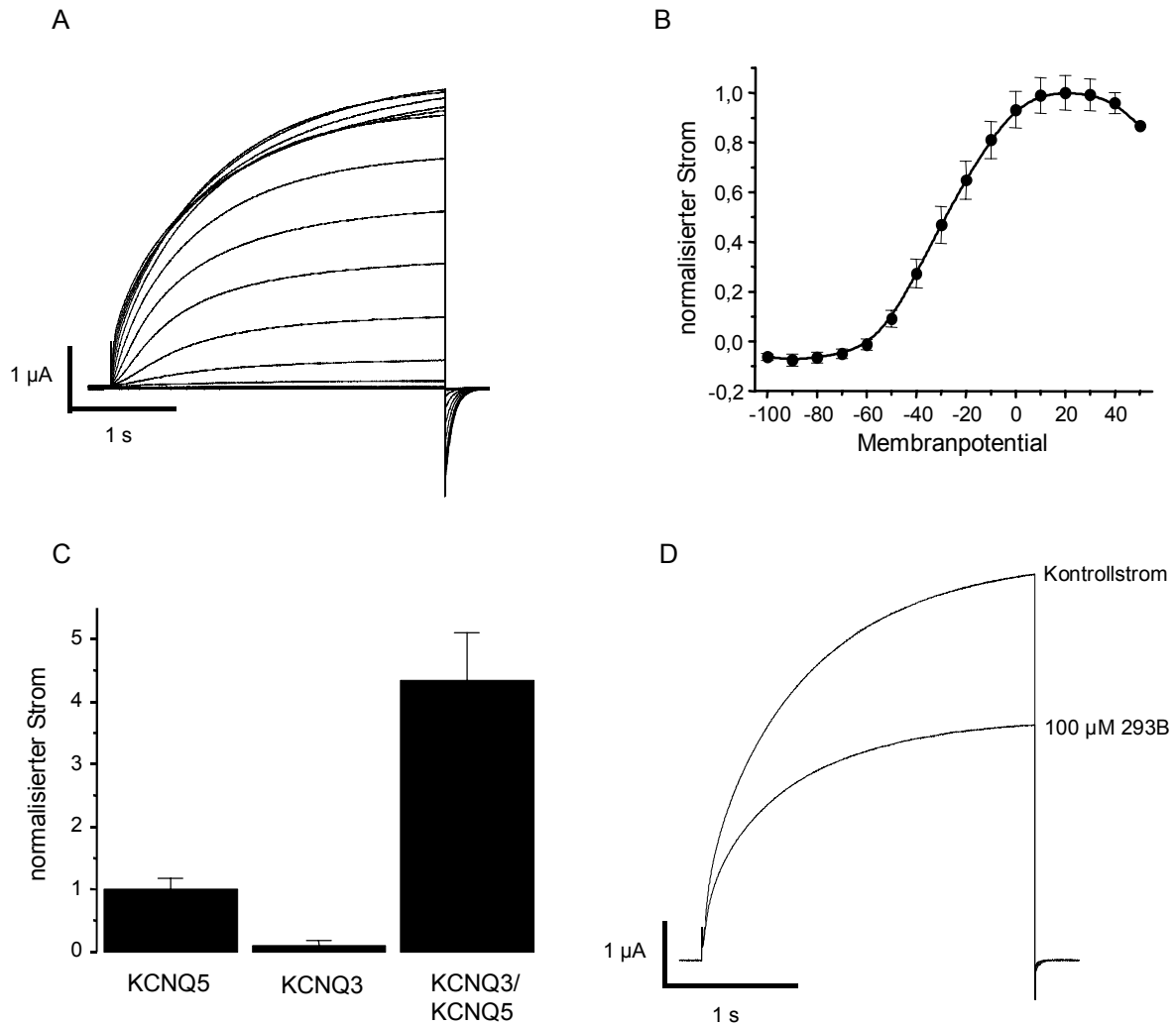


Abbildung III.6: Expression von hKCNQ5-Kanälen in *Xenopus*-Oozyten. **A** zeigt die repräsentativen Stromkurven einer mit KCNQ5-cRNA injizierten Oozyte bei unterschiedlichen Membranpotentialen. Haltepotential war -100 mV. In 10 -mV-Inkrementen wurde alle 10 s ein Puls appliziert. **B** zeigt die Strom-Spannungsbeziehung, die aus **A** durch die Auftragung der Stromamplituden am Ende des Testpulses gegen die Testpotentiale entstand. In **C** sind die bei 40 mV (am Ende eines 3 -s-Testpulses) gemessenen Stromamplituden von hKCNQ5, rKCNQ3 und von heteromeren hKCNQ5/rKCNQ3 aufgetragen. Es wurden jeweils gleiche Mengen cRNA der Untereinheiten injiziert und es wurde auf die unter diesen Bedingungen erhaltenen KCNQ5-Stromamplituden normalisiert. **D** zeigt den Effekt von 100 μ M 293B auf hKCNQ5-Ströme.

Nach Koexpression mit KCNQ1- und KCNQ2-Kanälen sowie auch bei Koexpression mit den bekannten β -Untereinheiten der KCNE-Familie (KCNE1-4, Abbott *et al.*, 1999) ergaben sich keine Hinweise auf eine funktionelle Interaktion mit KCNQ5. Nach Koexpression von KCNQ5 und KCNQ3 hingegen konnten wir Ströme messen, die sich hochsignifikant von Strömen homomerer KCNQ3- oder KCNQ5-Kanäle unterschieden. Während man nach Expression homomerer KCNQ3-Kanäle nur sehr kleine Stromamplituden messen kann (siehe Abbildung III.3; Yang, Levesque *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; Biervert *et al.*, 1998), war die

Stromamplitude bei einer KCNQ3/5-Koexpression verglichen mit homomeren KCNQ5-Kanälen 5-fach erhöht (siehe Abbildung III.6C). Auch die hier nicht gezeigten Unterschiede im kinetischen Verhalten homomerer und heteromerer Kanäle sprachen für eine funktionelle Interaktion von KCNQ5 und KCNQ3 (siehe auch Lerche *et al.*, 2000). Für KCNQ2 war eine Amplitudenvergrößerung durch KCNQ3 in noch stärkerer Ausprägung schon bekannt (Yang, Levesque *et al.*, 1998). Man konnte aufgrund dieser *in vitro* gezeigten Interaktion mit KCNQ3 und dem mit KCNQ2 und KCNQ3 überlappenden Expressionsmuster im Gehirn eine ebenfalls wichtige physiologische Rolle für KCNQ5 annehmen. Eine chromosomale Lokalisation zur Bande 6q14 (durchgeführt von der Firma Genome Systems, USA) brachte aber bisher keinen Hinweis auf eine mögliche neurologische Erkrankung, die zum gleichen Genort gekoppelt ist und durch Mutationen im KCNQ5-Kanal hervorgerufen werden könnte.

Da die elektrophysiologischen Eigenschaften von KCNQ5 und KCNQ1 sehr ähnlich waren, wurde das gleiche Spannungsprotokoll wie zuvor für KCNQ1 beschrieben zur Inhibitionsanalyse verwendet. Die Sensitivität des Kanals gegenüber 293B war gering, aber höher als die von KCNQ2 und KCNQ3. 100 μM 293B hemmten den Kanal zu $\sim 40\%$ (Abbildung III.6D). Heteromere KCNQ3/5-Kanäle wurden schwächer inhibiert ($\sim 25\%$), was auch für die funktionelle Interaktion der Kanäle spricht.

III.A.1.c Der Einfluss von MinK auf die Spezifität der Kaliumkanalblockade durch 293B

Wie Busch *et al.* (1997) zeigten, ist die Sensitivität von I_{Ks} -Kanälen gegenüber 293B im Vergleich zu homomeren KCNQ1 Kanälen um ein Vielfaches erhöht (siehe auch Abschnitt III.A.3). Zwei Arbeitsgruppen postulierten zwei weitere Interaktionspartner für MinK. McDonald *et al.* (1997) sahen eine signifikante Verschiebung in der Strom-Spannungs-Beziehung des HERG-Kanals bei Koexpression mit MinK. Yang, Kupersmidt *et al.* (1998) zeigten in stabil transfizierten L-Zellen für den humanen Kv1.5-Kanal, der im Herzen wahrscheinlich zur K_{ur} -Leitfähigkeit beiträgt (siehe Abbildung I.4), eine signifikante Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung, wenn sie den Kanal mit MinK koexprimierten. Deshalb sollte bei HERG- und Kv1.5-Kanälen untersucht werden, ob MinK auch die Chromanolpharmakologie verändert. Da 293B, wie schon beschrieben, diese beiden Kanäle kaum blockierte, wählten wir Substanzen, die diese Ströme potenter inhibierten, aber immer noch erheblich stärker auf I_{Ks} wirkten. Ein anderer I_{Ks} -Blocker, IKs C1912, blockierte HERG-Kanäle mit einem IC_{50} -Wert von $7,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ($n = 3$), während die Koexpression mit MinK keinen Einfluss auf die Inhibition zeigte (IC_{50} : $6,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$, $n = 3$, siehe Abbildung III.7). Parallel dazu beobachteten wir keine Veränderung der Sensitivität von HOE 535 an Kv1.5-Kanälen in Gegenwart von MinK (IC_{50}

ohne MinK: $24,4 \pm 2,9 \mu\text{M}$, $n = 3$; IC_{50} mit MinK: $22,8 \pm 1,9 \mu\text{M}$, $n = 3$, Abbildung III.8). Der I_{Ks} /HERG-Blocker (IKs C1912) inhibierte I_{Ks} -Kanäle mit einem IC_{50} von $302 \pm 28 \text{ nM}$ ($n = 3$), HOE 535 zeigte hier eine halbmaximale Hemmkonzentration von $28 \pm 3 \text{ nM}$ ($n = 3$).

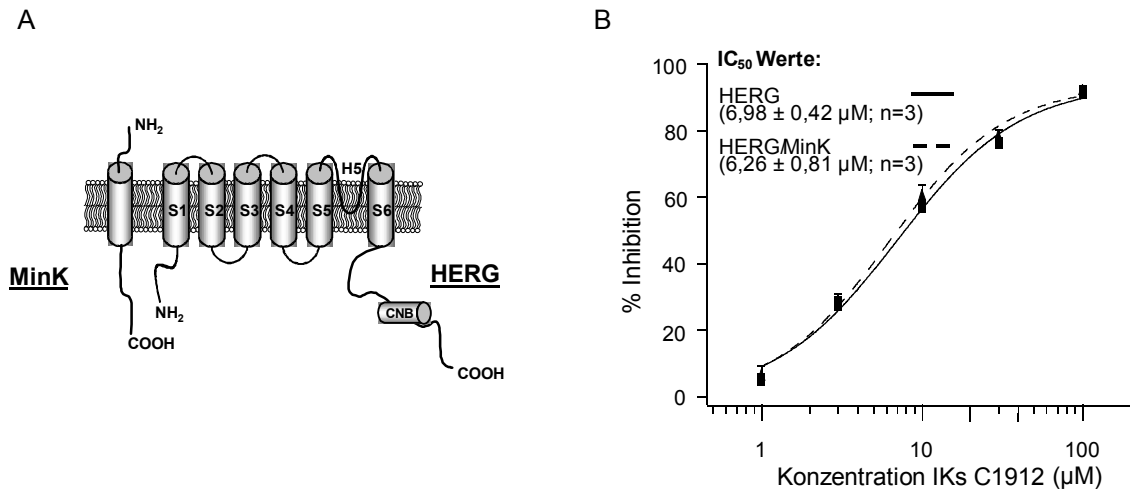


Abbildung III.7: Effekt des I_{Ks} -Blockers IKs C1912 auf HERG-Kanäle und auf HERG-Kanäle, die mit MinK koexprimiert wurden. **A** zeigt eine topologische Skizze von MinK und HERG mit den Transmembranregionen als Rohre dargestellt und den jeweiligen N- und C-Termini. CNB steht für zyklisches-Nukleotid-Bindungsstelle. **B** zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen der beiden Experimente in logarithmischer Auftragung (die Messpunkte von HERG sind als Quadrate, die von HERG/MinK als Dreiecke dargestellt).

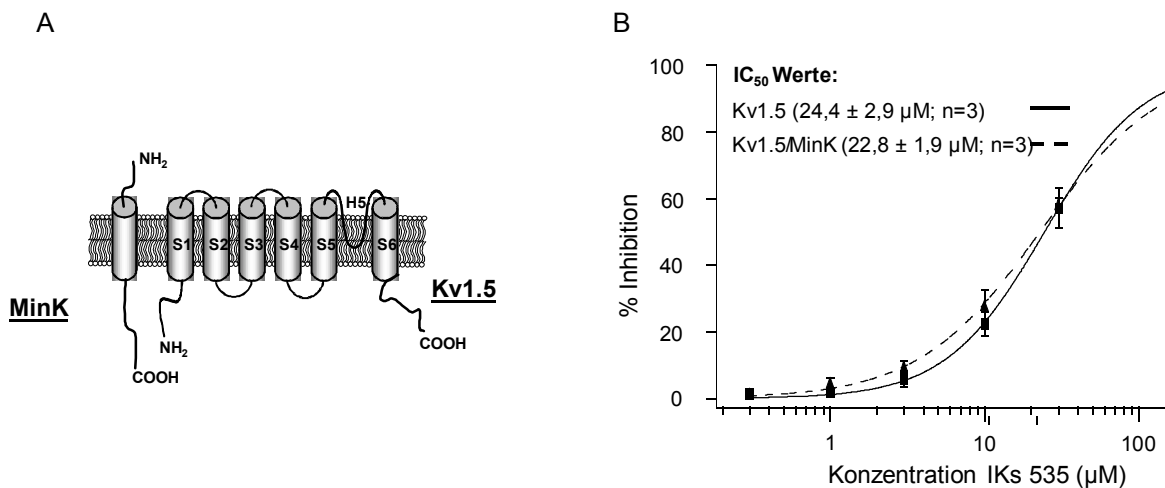


Abbildung III.8: Effekt des I_{Ks} -Blockers IKs 535 auf Kv1.5-Kanäle und auf Kv1.5-Kanäle, die mit MinK koexprimiert wurden. **A** zeigt eine topologische Skizze von MinK und Kv1.5 mit den Transmembranregionen als Rohre dargestellt und den jeweiligen N- und C-Termini. **B** zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen der beiden Experimente in logarithmischer Auftragung (die Messpunkte von Kv1.5 sind als Quadrate, die von Kv1.5/MinK als Dreiecke dargestellt).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass das Maus- und das Hai-Homolog von KCNQ1 verglichen mit dem humanen Kanal keine Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber 293B aufwiesen, während der auch in der Porenregion etwas differente *kqt1*-Kanal eine leicht erhöhte Sensitivität besaß. Innerhalb der KCNQ-Familie zeigte sich kein Kanal so sensitiv wie KCNQ1 oder wie der nativ vorliegende I_{Ks} -Kanal, so dass die I_{Ks} -blockierende Modellsubstanz 293B ein spezifisches Wirkprofil besitzen dürfte. Durch MinK-Koexpression konnten wir die Chromanolsensitivität in anderen Kaliumkanälen nicht erhöhen.

III.A.2 Stereospezifität von Chromanolen und Chromanen bezüglich KCNQ1 und I_{Ks}

Die Stereospezifität der beiden Enantiomere von 293B wurde zuerst von Suessbrich *et al.* (1996b) am I_{Ks} -Kanal in *Xenopus*-Oozyten, der durch das endogen in den Oozyten vorkommende KCNQ1-Protein und exogen zugeführtes MinK gebildet wird, beobachtet. Um diesen stereospezifischen Effekt näher zu prüfen, untersuchten wir auch potentere, verwandte I_{Ks} -Blocker der Chromanolreihe und zwei ebenfalls auf I_{Ks} wirksame Chromane. Die Wirkung auf homomere hKCNQ1- und auf heteromere h I_{Ks} -Kanäle von dem Chromanol HMR 1556 (Gögelein *et al.*, 2000) und dessen Enantiomer S5557 sowie von den spiegelbildlichen Chromanen S5558 und S5559 und von den 293B-Stereoisomeren wurde verglichen. Die folgenden Spannungsprotokolle für KCNQ1 und I_{Ks} wurden für die gesamte Charakterisierung der Chromanol-Bindungsstelle in den nachfolgenden Abschnitten verwendet. Für KCNQ1-Kanäle wurden die Oozyten bei einem Membranpotential von -100 mV gehalten und alle 10 s für 3 s auf 0 mV depolarisiert. Für I_{Ks} -Kanäle aus humanen Untereinheiten von KCNQ1 und MinK wurden die Oozyten bei einem Membranpotential von -80 mV gehalten und alle 60 s für 15 s auf 0 mV depolarisiert. Die Ströme wurden mit 1 kHz (KCNQ1) oder 500 Hz (I_{Ks}) gefiltert. Die Stromamplituden wurden am Ende des Testpulses nach 5-minütigem Einwaschen der jeweiligen Substanz bestimmt und gegen die Substanz-Konzentrationen aufgetragen.

Der I_{Ks} -Blocker 293B besteht aus zwei Enantiomeren und besitzt wie HMR 1556 und dessen Enantiomer zwei Stereozentren an den Positionen 3 und 4. Die Substituenten der höchsten Priorität liegen hier in der *Trans*-Konfiguration vor, so dass die Spiegelbildisomere entweder eine 3R,4S oder eine 3S,4R Konfiguration aufweisen (Abbildung III.9). Die Diastereomere in der *Cis*-Konfiguration (3R,4R und 3S,4S) entstehen bei der Synthese nicht (Gerlach, U., direkte Korrespondenz). Die beiden Chromanole unterscheiden sich wesentlich durch ihre Substituenten an Position 6 des Chromanolgrundgerüsts. 293B weist hier einen Cyanrest auf, der bei HMR 1556 durch eine Trifluorbutoxygruppe ersetzt ist.

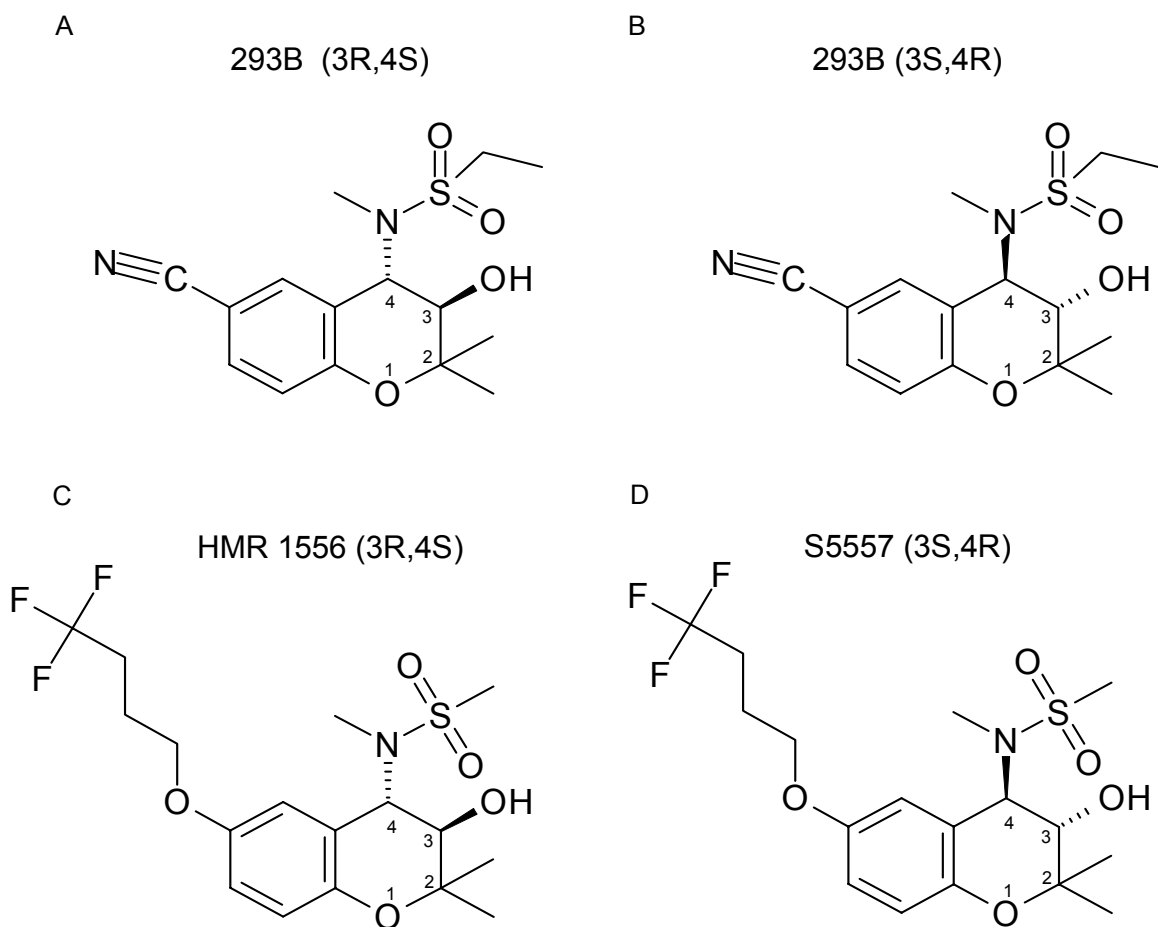


Abbildung III.9: Strukturformeln der in diesem Abschnitt auf Stereospezifität getesteten Chromanole. An den Positionen 3 und 4 des Chromanolgrundgerüsts befinden sich die beiden Stereozentren. Alle Diastereomere liegen in der *Trans*-Konfiguration vor.

Die Abbildung III.10 zeigt die Wirkung von 293B auf KCNQ1 und I_{Ks} . Das 3R-Enantiomer blockierte beide Kanäle signifikant stärker als sein Spiegelbild, wobei auch die Differenz zwischen dem Effekt auf I_{Ks} und dem Effekt auf KCNQ1 für das 3R-Enantiomer größer war. Dies kam dadurch zustande, dass dieses Enantiomer an I_{Ks} gegenüber KCNQ1 eine ~6-fach erhöhte Potenz zeigte, während das 3S-Enantiomer eine nur ~2-fach erhöhte Potenz aufwies. Das bestätigte die schon bekannten Resultate bezüglich Stereospezifität auf I_{Ks} (Suessbrich *et al.*, 1996b) und erhöhter Sensitivität von I_{Ks} gegenüber KCNQ1 (Busch *et al.*, 1997). Außerdem konnten wir eine Stereospezifität von 293B auch für KCNQ1-Kanäle nachweisen.

Abbildung III.11 zeigt die analogen Versuche mit den zueinander in spiegelbildlicher Konfiguration vorliegenden Substanzen HMR 1556 und S5557. Die Ergebnisse entsprachen weitgehend den mit 293B erhaltenen Resultaten. Auch hier blockierte das 3R-Enantiomer

Ergebnisse

(HMR 1556) sowohl KCNQ1- als auch I_{Ks} -Kanäle signifikant stärker als sein Spiegelbildisomer. Die Divergenz zwischen I_{Ks} - und KCNQ1-Blockade war für diese beiden Enantiomere jedoch nicht ausgeprägt. HMR 1556 (3R) blockierte I_{Ks} um den Faktor 4,3 stärker gegenüber KCNQ1, während S5557 die heteromeren Kanäle um den Faktor 3,6 stärker blockierte.

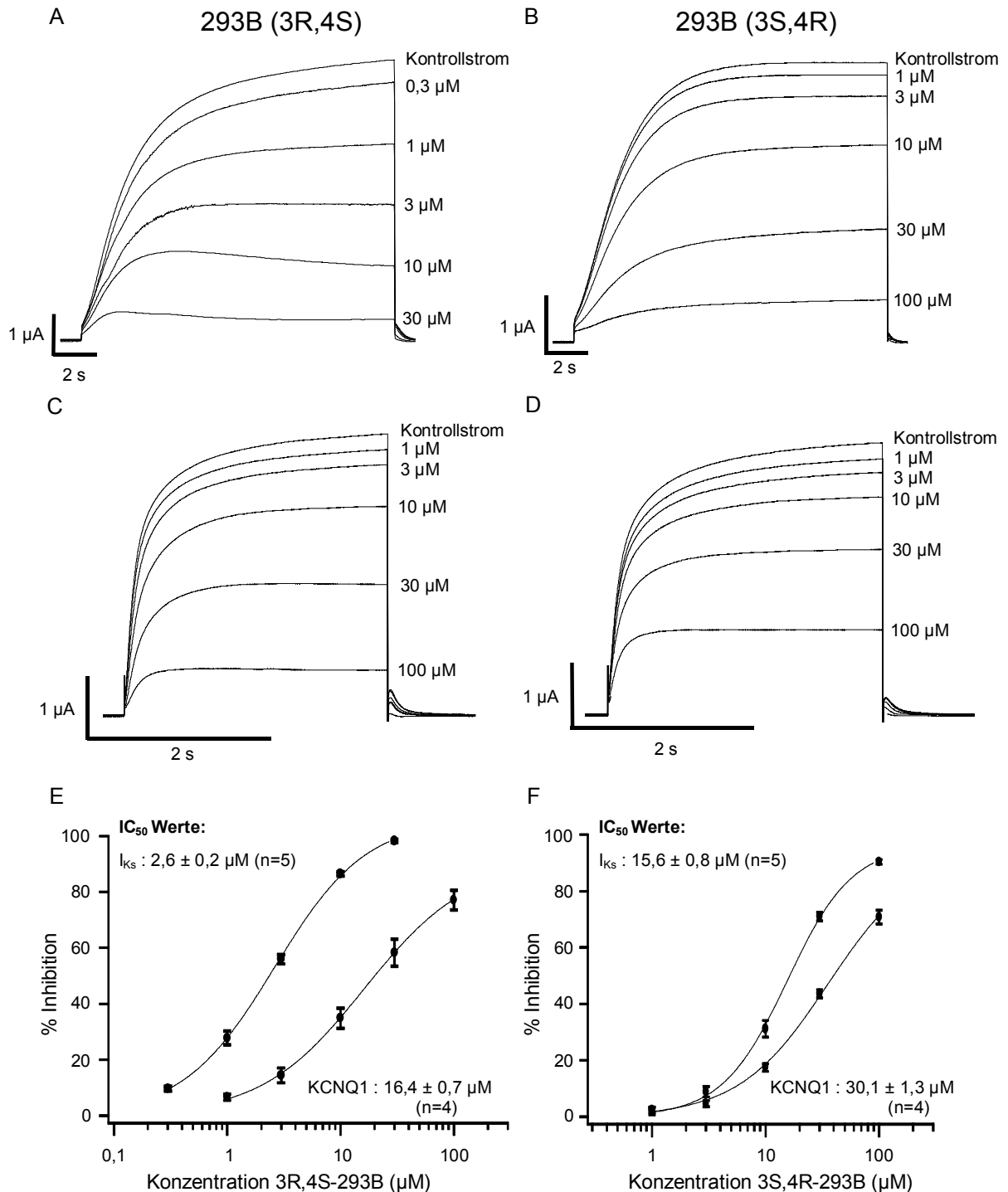


Abbildung III.10: Effekt unterschiedlicher Konzentrationen der 293B-Enantiomere auf heteromere hI_{Ks} -Kanäle (**A** und **B**) und auf homomere $hKCNQ1$ -Kanäle (**C** und **D**), jeweils in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. **E** zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen in logarithmischer Auftragung für das 3R,4S-Enantiomer für beide Kanäle, **F** die analogen Beziehungen für das 3S,4R-Enantiomer.

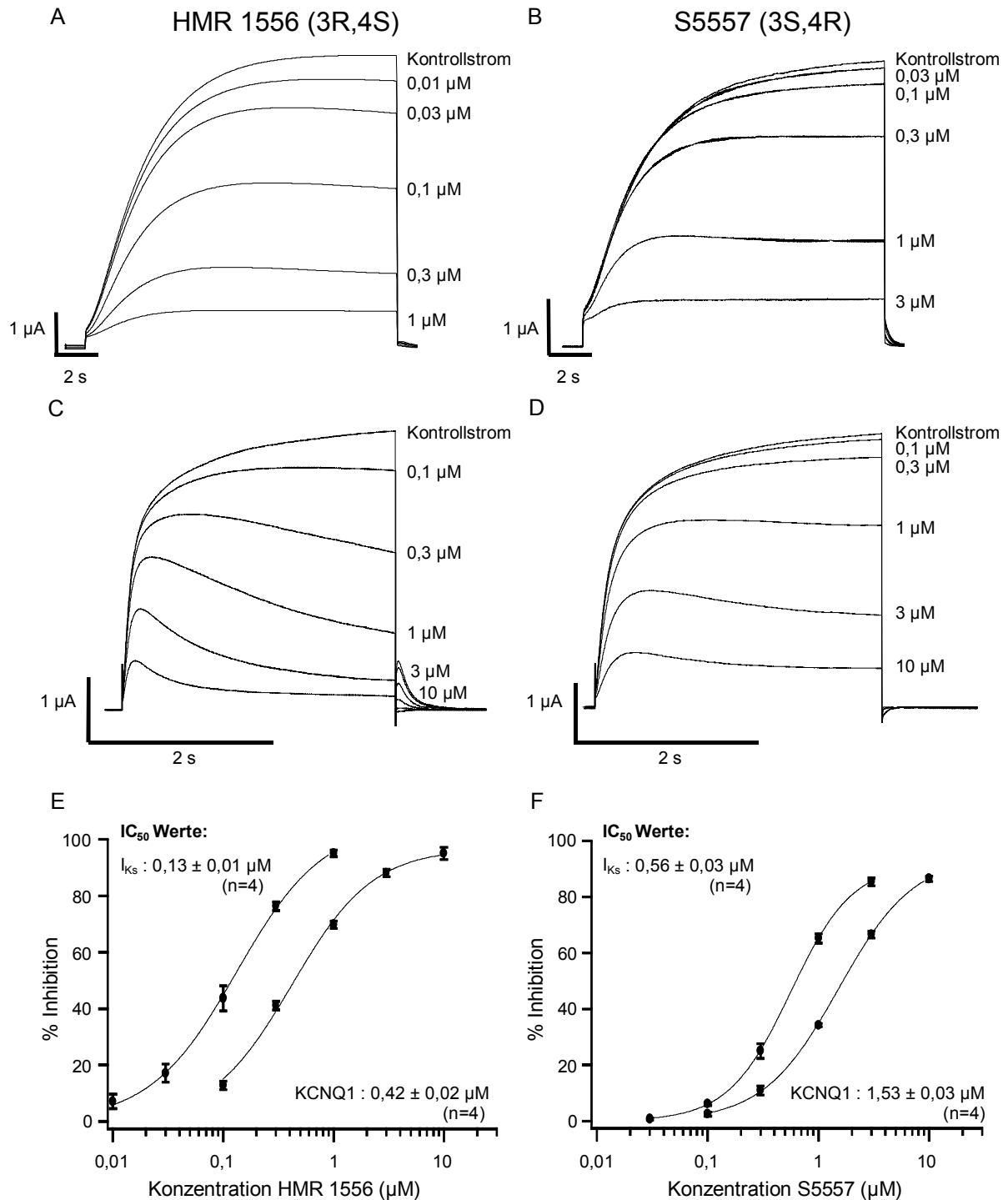


Abbildung III.11: Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von HMR 1556 und seinem Spiegelbild S5557 auf heteromere hI_{Ks} -Kanäle (A und B) und auf homomere $hKCNQ1$ -Kanäle (C und D), jeweils in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. E zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen in logarithmischer Auftragung für das 3R,4S-Enantiomer für beide Kanäle, F die analogen Beziehungen für das 3S,4R-Enantiomer.

Das Chroman S5558 und das R-Enantiomer S5559 besitzen konträr zu den Chromanolen nur ein Stereozentrum an Position 4, da die Hydroxylgruppe in Position 3 nur durch ein Wasser-

stoffatom ersetzt ist (siehe Abbildung III.12). Diese beiden Substanzen zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer KCNQ1-Blockade. Bei MinK-Koexpression verschob sich die Dosis-Inhibitionskurve jedoch bei dem 4S-Enantiomer (S5558) um einen Faktor >100 nach links, während sie sich bei dem 4R-Enantiomer kaum veränderte. Die Anwesenheit von MinK in unserem Expressionssystem erzeugte – den Chromanolen entsprechend - eine ausgeprägte Stereospezifität. Auch bei den Chromanen war das 4S-Enantiomer somit das wirksamere am I_{Ks} -Kanal, wogegen bei KCNQ1-Kanälen keine Stereospezifität zu beobachten war.

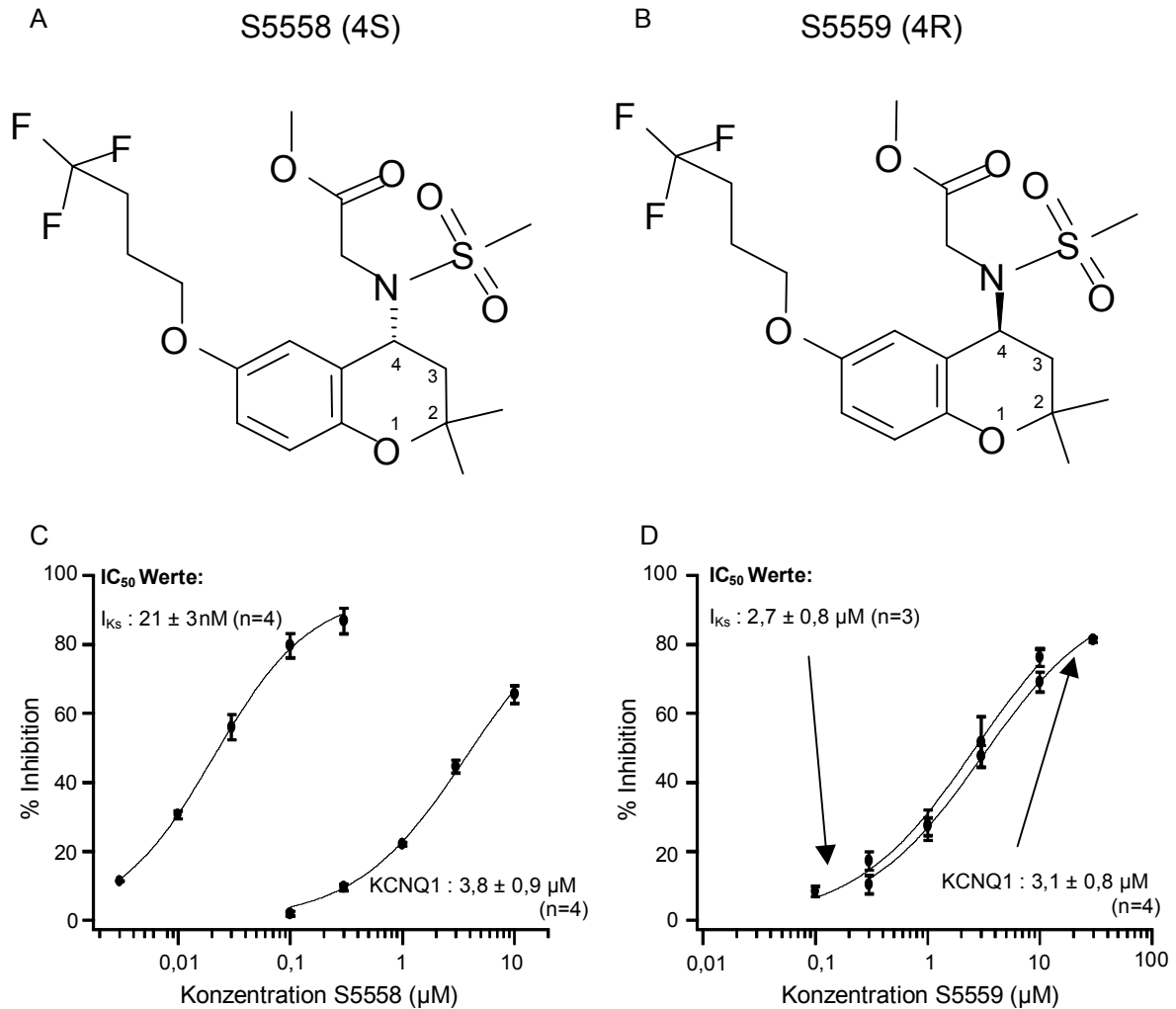


Abbildung III.12: Effekt unterschiedlicher Konzentrationen der spiegelbildlichen Chromane S5558 und S5559 auf heteromere hI_{Ks} -Kanäle und auf homomere hKCNQ1-Kanäle. Die Strukturformeln in **A** und **B** zeigen, dass durch den fehlenden Substituenten an Position 3 des Chromangrundgerüsts ein Stereozentrum verglichen mit den Chromanolen fehlt. **C** zeigt die Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen in logarithmischer Auftragung für das 4S-Enantiomer für beide Kanäle, **D** die analogen Beziehungen für das 4R-Enantiomer.

Zusammenfassend konnte ein erheblicher Unterschied der Blockade durch Chromanole und Chromane zwischen homomeren KCNQ1- und heteromeren I_{Ks} -Kanälen festgestellt werden. Zusätzlich konnte die für I_{Ks} -Kanäle schon bekannte Stereospezifität des Chromanols 293B auf andere Substanzen und homomere KCNQ1-Kanäle ausgedehnt werden.

III.A.3 Der Einfluss von MinK auf die Kaliumkanalblockade durch 293B auf molekularer Ebene

Der von uns beobachtete Unterschied der inhibitorischen Wirkung der Chromanole auf KCNQ1 und auf I_{Ks} wurde mithilfe der Leitsubstanz 293B (Razemat) genauer untersucht. Ziel der Studie war es herauszufinden, ob MinK unmittelbar an der Bindungsstelle des Chromanols beteiligt ist, oder ob das Protein eine Veränderung der Bindungsstelle allosterisch hervorruft.

Diese Fragestellung war auch in anderer Hinsicht interessant: Tai und Goldstein (1998) postulierten eine direkte Beteiligung des MinK-Proteins an der den Kaliumselektivitätsfilter bildenden Pore H5 (Abbildung III.13). Sie exprimierten veränderte MinK-Proteine mit eingeführten Cystein-Punktmutationen zusammen mit KCNQ1-Untereinheiten in *Xenopus*-Oozyten. Für bestimmte, in der Transmembranregion lokalisierte Aminosäuren zeigten sie einen verminderten Ionenfluss durch diese I_{Ks} -Kanalmutanten nach einer Inkubation mit durch -SH-Gruppen chelatierbaren Cd^{2+} -Ionen. Bei Inkubation mit extrazellulärem Cd^{2+} waren die Aminosäuren 55 und 56 (rMinK) betroffen, bei intrazellulärer Inkubation waren es die Aminosäuren 57 und 59 (rMinK). Diese Theorie, dass MinK unmittelbar an der Bildung des Ionenpfades teilnimmt, wird von einer anderen Studie (Romey *et al.*, 1997) unterstützt, die eine Interaktion des C-terminalen Teils des MinK-Proteins und des KCNQ1-Porenbereichs durch einen Hefe-zwei-Hybrid-Ansatz zeigten. Wir konnten hingegen zeigen (Abitbol *et al.*, 1999), dass die Modulation des KCNQ1-Proteins durch MinK einem allosterischen Mechanismus unterliegt. Die Funktionalität C-terminaler (also intrazellulär lokalisierter) MinK-Mutanten, die ursprünglich keine modulierende Wirkung auf KCNQ1 hatten, konnte durch extrazellulär wirkende I_{Ks} -Aktivatoren wiederhergestellt werden. Da es Hinweise dafür gibt, dass 293B in der inneren Porenregion wirkt (Loussouarn *et al.*, 1998; siehe Abschnitt III.A.1.a), könnte man durch MinK-Mutationen, die den Block durch 293B verändern, auch Hinweise auf den molekularen Aufbau des I_{Ks} -Kanals erhalten.

Wir exprimierten eine hohe Anzahl unterschiedlicher MinK-Mutanten in *Xenopus*-Oozyten und bestimmten jeweils die Konzentrationen von 293B bei halbmaximaler Inhibition. Die Mutanten waren so ausgewählt, dass das gesamte Protein durch Punktmutanten oder Deletionsmutanten abgedeckt war. Nur die extrazellulär lokalisierten Aminosäuren Nr. 1 bis 9 waren von der

Ergebnisse

Studie ausgeschlossen, da Takumi *et al.* (1991) feststellten, dass Mutanten ohne diese Reste nicht funktionell exprimierten. In Abbildung III.13 ist die Lage der verwendeten Mutanten im MinK-Protein (*B*) skizziert.

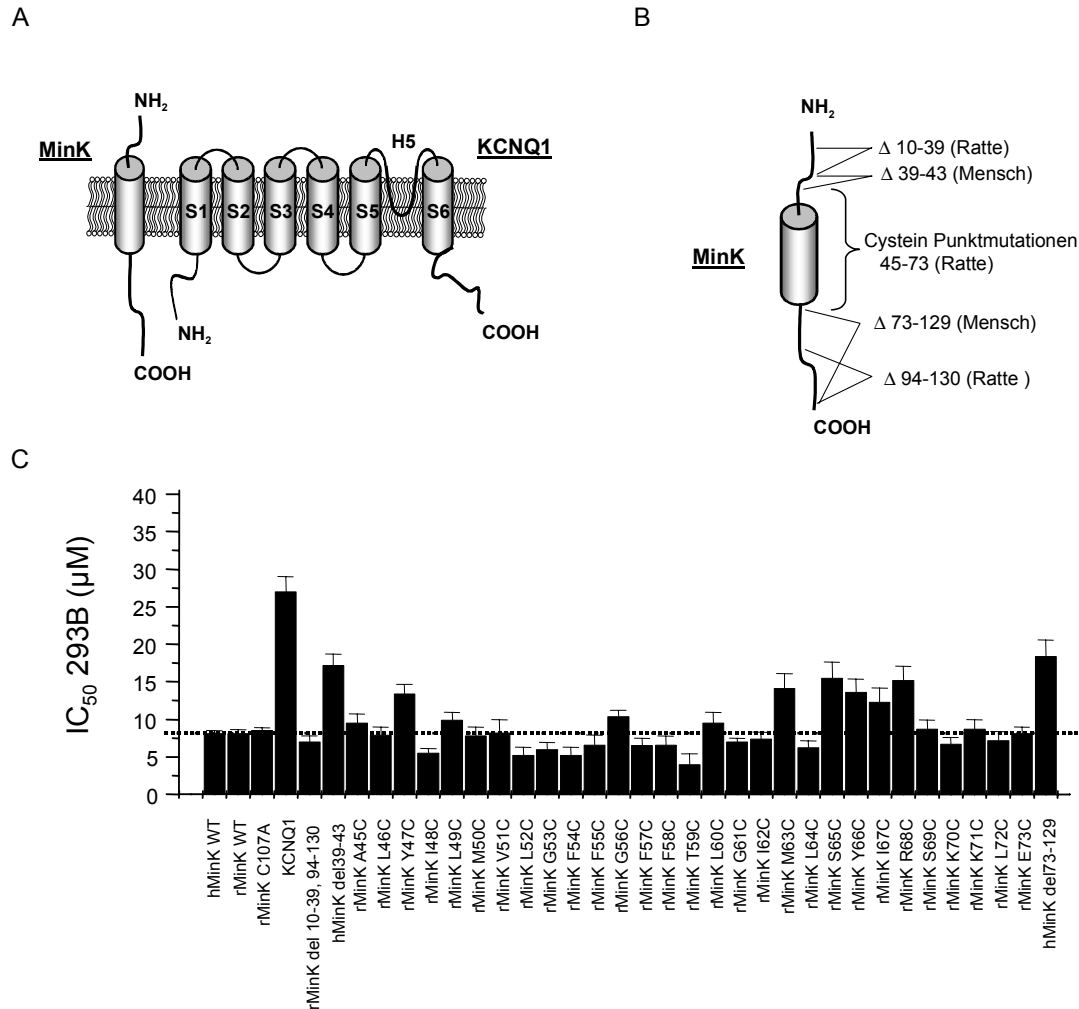


Abbildung III.13: Vergleich der Effekte von razemischem 293B auf Wild-Typ- und mutierte I_{K_S} -Kanäle sowie auf Wild-Typ-KCNQ1-Kanäle in *Xenopus*-Oozyten. In **A** ist eine topologische Skizze vom I_{K_S} -Kanal mit den funktionellen Untereinheiten MinK und KCNQ1 dargestellt. Die Transmembranregionen und die Porenregion H5 sind graphisch hervorgehoben und die Porenregion H5 und die jeweiligen N- und C-Termini gekennzeichnet **B** zeigt die fast komplette Abdeckung der MinK-Proteinsequenz durch die verwendeten Mutanten (siehe hierzu auch Abbildung III.14). **C** zeigt ein Balkendiagramm, in dem die IC_{50} -Werte der jeweiligen Kanäle aufgetragen wurden. Die gestrichelte Linie zeigt den Wert für die Wild-Typ-rMinK(=r I_{K_S})-Kanäle. Die Anzahl der Experimente betrug 3-5 für jedes Konstrukt.

Die Mutationen waren teilweise in das humane und teilweise in das Protein aus der Ratte eingeführt worden. Beide Spezieshomologe wurden in einem Ansatz verwendet, da die beiden Proteine über eine ausgeprägte Homologie verfügen (Sequenzvergleich in Abbildung III.14)

Ergebnisse

und die Chromanolpharmakologie der beiden Wild-Typen sich nicht unterscheidet (Suessbrich, 1997).

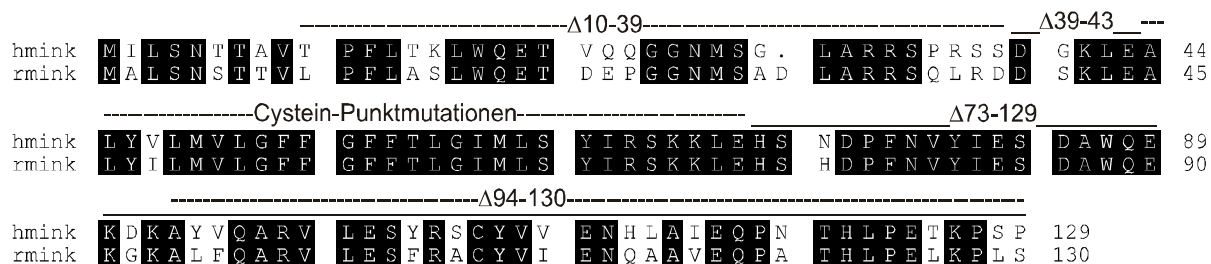


Abbildung III.14: Proteinsequenzvergleich von humanem Mink und dem Protein aus der Ratte (rMink), der die Vollständigkeit der verwendeten Mutanten verdeutlichen soll. Welche Aminosäuren durch die jeweiligen Mutanten abgedeckt wurden, ist über der Sequenz durch Linien gekennzeichnet. Da das Rattenprotein an der Position 30 eine zusätzliche Aminosäure enthält, ist die Nummerierung jenseits dieser Position um jeweils eine Aminosäure verschoben.

Die meisten Cystein-Punktmutanten sowie die Deletionsmutante Δ 10-39, 94-130 wurden zusammen mit dem endogenen *Xenopus*-KCNQ1 exprimiert (Sanguinetti *et al.*, 1996), da diese Koexpression zur Analyse ausreichende I_{Ks} -Ströme ergab (die Stromamplitude am Ende des Testpulses war größer als 1 μ A). Der *Xenopus*- und der humane KCNQ1-Kanal unterscheiden sich in der bekannten Sequenz nur marginal (wobei ein Teil des *Xenopus*-Klons noch nicht bekannt ist, siehe Abbildung I.2) und insbesondere der Poren bildende S5-S6-Bereich ist hochkonserviert. Weiterhin war die Inhibition durch 293B von Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen identisch, wenn humane oder *Xenopus*-KCNQ1-Proteine als α -Untereinheiten dienten. Einige Cystein-Punktmutanten (62C, 63C, 65C, 66C, 69C, 70C, 71C) mussten trotzdem mit dem humanen KCNQ1 koexprimiert werden, da Tai und Goldstein (1998) schon beschrieben hatten, dass diese Proteine mit dem *Xenopus*-KCNQ1 keine ausreichenden Ströme ergeben. Sämtliche Cystein-Punktmutanten besitzen eine zusätzliche Mutation C107A. Als Kontrolle zeigte diese Mutation verglichen mit dem Wild-Typ- I_{Ks} keine veränderte Inhibition durch 293B (Abbildung III.13C). Alle verwendeten Mutanten waren bereits veröffentlicht und analysiert (Takumi *et al.*, 1991; Tai und Goldstein, 1998; Abitbol *et al.*, 1999). Sie zeigten in Koexpression mit KCNQ1 eine ähnliche Kinetik wie der Wild-Typ- I_{Ks} -Kanal und bildeten den typischen, langsam aktivierenden und nicht sättigbaren I_{Ks} -Strom.

Die Ergebnisse sind in einem Balkendiagramm in Abbildung III.13B dargestellt. Alle IC_{50} -Werte wurden mit denen der heteromeren Wild-Typ- I_{Ks} -Kanäle (rMinK, IC_{50} 8,16 \pm 0,12 μ M) und der homomeren KCNQ1-Kanäle verglichen (IC_{50} 26,9 \pm 0,8 μ M). Die gestrichelte Linie deutet den Wert des Wild-Typ- I_{Ks} -Kanals an. Zunächst waren alle untersuchten mutierten I_{Ks} -Kanäle durch 293B signifikant stärker zu inhibieren als homomere KCNQ1-Kanäle. Das heisst, die

grundsätzliche Verstärkung der 293B-Wirkung auf I_{Ks} gegenüber KCNQ1 war durch die getesteten Mutationen nicht aufzuheben. Die größte Veränderung in der Inhibition zeigte die Deletionsmutante $\Delta 73-129$. Sie wurde im Vergleich zu Wild-Typ-MinK um den Faktor 2,3 schwächer inhibiert. Bei einer anderen Deletionsmutante, $\Delta 39-43$, betrug der Faktor 2,0, bei der Punktmutation Y47C hatte er den Wert 1,6. Weiterhin wurden die Cystein-Punktmutanten an den Positionen 63, 65, 66, 67, und 68 signifikant schwächer inhibiert als der Wild-Typ. Der Faktor, um den der IC_{50} -Wert verschoben war, war zwar für alle kleiner als 2, aber eine Häufung von Mutanten mit veränderter Sensitivität gegenüber 293B fiel in dieser Region auf.

Bei keiner der gemessenen MinK-Mutanten war der Block durch 293B stärker verändert als um den Faktor 2,3 gegenüber Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen. Die nur geringfügigen Unterschiede in der Blockade von Wild-Typ- und mutierten I_{Ks} -Kanälen gaben keinen Hinweis auf eine direkte Beteiligung von MinK an der Bildung einer Bindungsstelle von 293B.

III.A.4 Der Einfluss von KCNQ1 auf die Kaliumkanalblockade durch 293B auf molekularer Ebene

Parallel zu den Versuchen, die auf eine mögliche Beteiligung des MinK-Proteins an der Bindungsstelle von 293B ausgerichtet waren, untersuchten wir das KCNQ1-Protein. Den Ansatz hierfür lieferten die Ergebnisse aus dem Abschnitt III.A.1.a. KCNQ1-Kanäle konnten durch 293B inhibiert werden (IC_{50} : $26,9 \pm 0,8 \mu M$), die verwandten KCNQ2-Kanäle jedoch nur zu 5% bei einer 293B-Konzentration von $100 \mu M$ (Abbildung III.3). Die Sättigungskonzentration liegt bei $\sim 200 \mu M$. KCNQ2 wurde des weiteren bei einer HMR 1556-Konzentration von $10 \mu M$ nicht signifikant inhibiert werden (entspricht der Sättigungskonzentration, nicht gezeigtes Ergebnis), während der IC_{50} -Wert dieses potenteren I_{Ks} -Blockers bei KCNQ1-Kanälen auf $\sim 400 nM$ bestimmt wurde (siehe Abbildung III.11). Dieses Ergebnis für die 293B-verwandte Struktur unterstützte die Befunde für 293B und ließ vermuten, dass die Verschiebung in der Sensitivität größer als eine Zehnerpotenz ist. Im folgenden wurde versucht, durch Sequenzaustausch zwischen den beiden Proteine einerseits die Sensitivität gegenüber 293B in KCNQ1 zu vermindern und sie andererseits in KCNQ2 zu erhöhen. Wie im Abschnitt *Material und Methoden* beschrieben, wurden chimäre Proteine aus KCNQ1 und KCNQ2 konstruiert. Anschließend wurden diese Proteine in *Xenopus*-Oozyten exprimiert und ihre Sensitivität gegenüber 293B bestimmt.

Da chimäre Proteine immer *in vitro* hergestellte, artifizielle Konstrukte sind, kann man nicht für jeden Sequenzaustausch eine akkurate Proteinfaltung oder einen Transport in die Membran erwarten, der dem des Wild-Typ-Kanals entspricht. Folglich induzierte die Injektion von cRNA

einiger Konstrukte und einiger Punktmutanten auch nach mehrmaliger cRNA-Synthese und mehrmaliger Expression keine messbaren Ströme in Oozyten. Diese Mutanten sind im weiteren nur erwähnt, wenn sie das Fehlen logisch erscheinender, aber nicht durchgeführter Experimente erklären sollen.

Kinetische Unterschiede von Wild-Typ- und mutierten Kanalproteinen können die pharmakologischen Eigenschaften erheblich beeinflussen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die HERG-Mutante S631A (Schönherr und Heinemann, 1996), die eine stark verminderte C-Typ-Inaktivierung zeigt. Sie ist in der extrazellulären Pore lokalisiert, die sich bei dieser Form der Inaktivierung schließt. Viele Pharmaka, die als erwünschte oder unerwünschte Wirkung eine HERG-Blockade aufweisen (Terfenadin, Dofetilid, Astemizol), haben verglichen mit dem Wild-Typ eine vielfach geringere Affinität an dieser Mutante (Suessbrich *et al.*, 1996a; Ficker *et al.* 1998). Zumindest für Dofetilid wurde von Lees-Miller *et al.* (2000) kürzlich gezeigt, dass es zusätzlich eine andere molekulare Determinante für die Dofetilid-Inhibition in der inneren Pore, und zwar im unteren S6-Bereich gibt. Die Autoren schließen daraus, dass die durch die Inaktivierung hervorgerufene Konformationsänderung eine Bindung von Dofetilid von intrazellulär ermöglicht, das heisst die Bindungsstelle wahrscheinlich intra- und nicht extrazellulär liegt. Man muss daher einen möglichen Einfluss eines veränderten kinetischen Schaltverhaltens ("Gating") auf die Pharmakologie von Mutanten in Betracht ziehen.

Wie unsere Arbeitsgruppe schon zeigen konnte (Seeböhm *et al.*, 2000), wirkt das Chromanol 293B auf geöffnete und geschlossene KCNQ1- und I_{Ks} -Kanäle. Die kinetischen Konstanten der Inaktivierung (Einsetzen bzw. "onset" und Erholung bzw. "recovery") waren durch 10 μ M 293B nicht beeinflusst, woraus man folgern konnte, dass der inaktivierte Zustand keine 293B-Affinität aufweist. Daher mussten Mutanten, die eine verstärkte Inaktivierung zuließen, besonders kritisch betrachtet werden.

Loussouarn *et al.* (1998) beschrieben den 293B-Block homomerer KCNQ1-Kanäle in COS-Zellen als spannungsabhängig. Sie fanden vor allem unterhalb 0 mV eine erhöhte Inhibition durch 293B bei Testpulsen auf positivere Potentiale. In der vorliegenden Arbeit konnte bei Testpulsen auf 0 mV und 40 mV keine Spannungsabhängigkeit der Inhibition von KCNQ1 oder I_{Ks} durch 293B festgestellt werden (Abbildung III.15). Da bei veränderten Proteinen auch die Spannungsabhängigkeit eines Blockers verschoben sein kann, untersuchten wir alle Chimären und Punktmutanten zusätzlich zu 0 mV auch bei 40 mV. Bei keinem mutierten Protein, das bei 0 mV eine stark verminderte Inhibition durch 293B im Vergleich mit dem Wild-Typ aufwies, war diese Veränderung durch einen Testpuls auf ein positiveres Potential (40 mV) tendenziell aufzuheben.

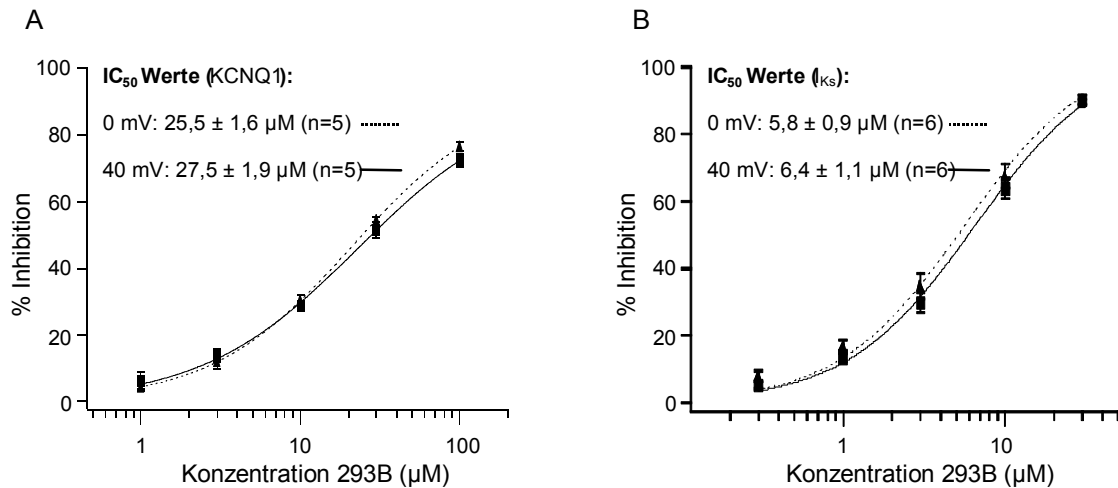


Abbildung III.15: Konzentrations-Inhibitionsbeziehung der Kaliumkanalblockade durch 293B bei unterschiedlichen Spannungen. Eine Spannungsabhängigkeit der Blockade von KCNQ1 (**A**) und I_{ks} (**B**) konnte unter unseren Messbedingungen nicht nachgewiesen werden. Es wurden die Protokolle verwendet, wie sie im Abschnitt III.A.2 beschrieben wurden. Die Messpunkte bei 0 mV sind durch Punkte, die bei 40 mV durch Kreise dargestellt.

III.A.4.a Eingrenzung der Bindungsregion von 293B durch funktionelle Chimären

Zunächst sollte der Bereich, der für eine hohe Affinität von 293B notwendig ist, identifiziert werden. Die Ergebnisse aus Abschnitt III.A.1.a ließen den Schluss zu, dass dieser Bereich in den zwischen den Spezieshomologen von KCNQ1 hochkonservierten Regionen zu suchen ist. Einerseits sind dies die Transmembranregionen S1 bis S6, und hier im besonderen aus den bereits genannten Gründen der Bereich S5/H5/S6, andererseits sind die Spezieshomologe im C-terminalen Bereich hochkonserviert (siehe Abbildung I.3). Dieser Bereich ist auch unter den verschiedenen Mitgliedern der KCNQ-Familie noch relativ stark konserviert (siehe Abbildung III.5), und es sind zusätzlich KCNQ1- und KCNQ2-Mutationen in diesem Bereich bekannt, die ein LQT1-Syndrom bzw. BFNC verursachen. Als funktionelle Bedeutung dieses intrazellulär lokalisierten Teils wurde zum ersten Mal von Schmitt *et al.* (2000) eine mögliche Zusammenlagerungsdomäne der α -Untereinheiten für die Bildung von Tetrameren diskutiert. Der C-Terminus der KCNQ-Familie besitzt also eine hochkonservierte Region weitgehend unbekannter Bedeutung, welche auch einen Angriffspunkt für eine modulierende Substanz wie 293B darstellen könnte. Es wurde deshalb der S5/H5/S6-Bereich und der C-Terminus von KCNQ1 und KCNQ2 ausgetauscht, um erste molekulare Determinanten für eine hohe Affinität von 293B zu erhalten.

Ergebnisse

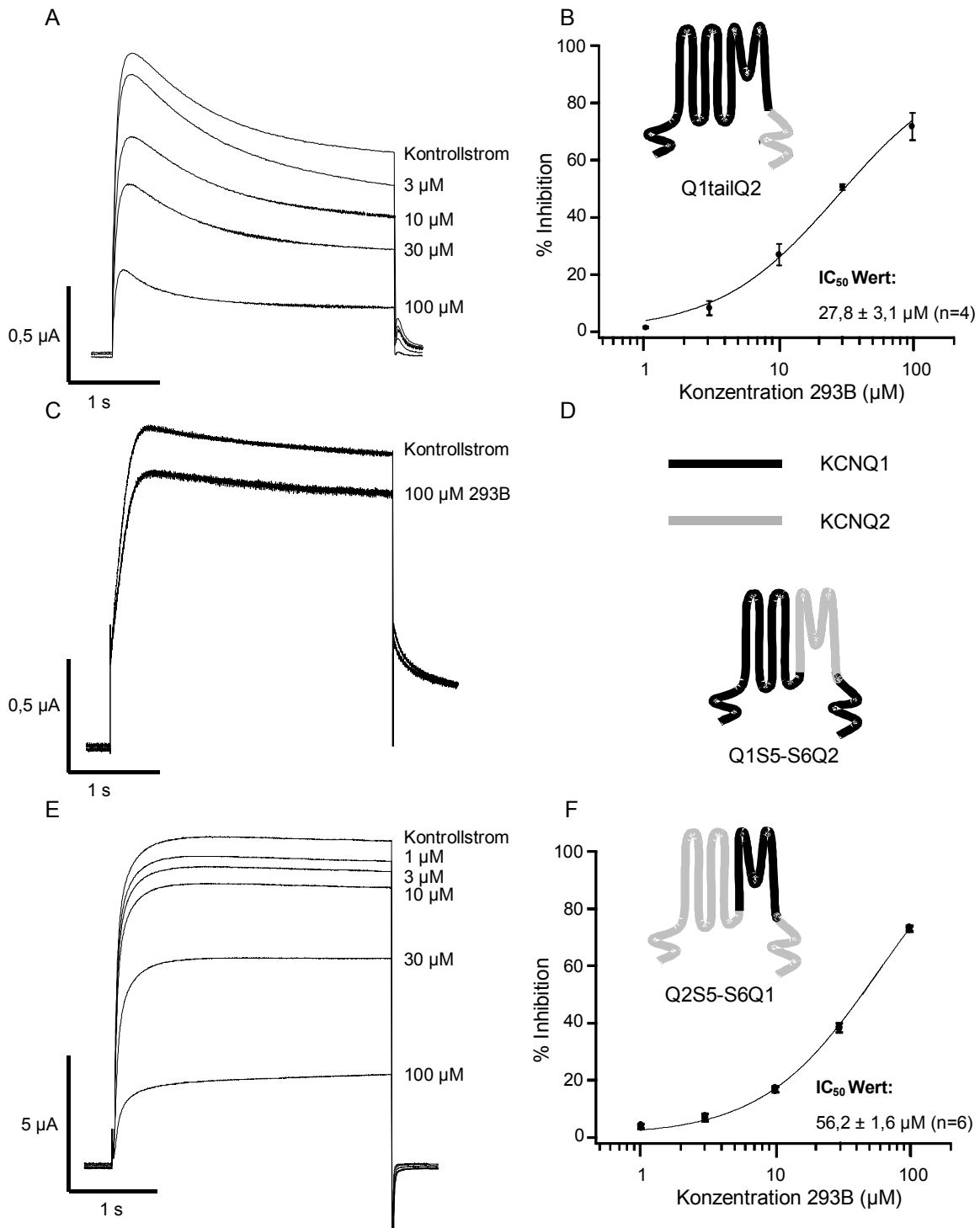


Abbildung III.16: Generelle Eingrenzung der Bindungsstelle von 293B durch funktionelle Chimären. **A**, **C** und **E** zeigen repräsentative Stromkurven von *Xenopus*-Oozyten, in die die cRNA der in **B**, **D** bzw. **F** skizzierten Konstrukte injiziert wurde. Die Hemmwerte unterschiedlicher Konzentrationen von racemischem 293B wurde logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen, um die IC_{50} -Werte zu bestimmen. Wie nachfolgend immer wieder einheitlich dargestellt, sind in den topologischen Skizzen die KCNQ1-Sequenzbereiche der Chimären dunkel und die KCNQ2-Bereiche hell dargestellt.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die chimären Konstrukte durch eine Skizze mit den charakteristischen sechs Transmembrandomänen, der Pore und den beiden intrazellulären Termini abgebildet, wobei die ausgetauschten Regionen jeweils farbig hervorgehoben sind. In der Abbildung III.16 sind Konstrukte dargestellt, durch deren Unterschiede in der Affinität die Bindungsstelle von 293B in KCNQ1 generell eingegrenzt werden konnte. Eine Substitution des C-terminalen, intrazellulär liegenden Endes von KCNQ1 durch die entsprechende KCNQ2-Sequenz (Q1tailQ2, siehe Abbildung III.16, A und B), resultierte in einem funktionellen Kaliumkanal, der verglichen mit dem Wild-Typ keine veränderte Sensitivität gegenüber 293B zeigte (IC_{50} : $\sim 28 \mu M$). Dieser mutierte Kaliumkanal hatte einige veränderte Eigenschaften. Er inaktivierte stärker als der KCNQ1-Wild-Typ. Zusätzlich war die Kinetik bei Koexpression mit MinK zwar charakteristische verlangsamt, aber die Stromamplitude wurde nicht erhöht, wie es für den Wild-Typ-Kanal üblich ist. Die reverse Chimäre (Q2tailQ1) produzierte nach cRNA-Injektion und Expression in *Xenopus*-Oozyten keine messbaren Ströme.

Ein Austausch des gesamten S5/H5/S6-Bereichs von KCNQ1 durch die KCNQ2-Sequenz ergab ein Kanalprotein (Q1S5-S6Q2, siehe Abbildung III.16, C und D), das nur geringe Ströme in Oozyten induzierte. Diese Kanäle besaßen eine verringerte Sensitivität gegenüber dem Chromanol ($100 \mu M$ 293B hemmten die Ströme zu $18,5 \pm 5\%$, $n = 4$). Das Konstrukt zeigte keine relevanten Kinetikveränderungen.

Durch den umgekehrten Austausch des Porenbereichs wurde im KCNQ2-Kanal hingegen eine Sensitivität gegenüber 293B generiert (Q2S5-S6Q1, siehe Abbildungen III.16, E und F). Das chimäre Konstrukt wurde bei $\sim 56 \mu M$ 293B zu 50% blockiert. Weiterhin gegensätzlich zu Wild-Typ-KCNQ2-Kanälen fiel auf, dass dieses Konstrukt inaktivierte (siehe auch Abschnitt III.B.1). Die Koexpression mit MinK ergab keine Ströme, die auf eine funktionelle Interaktion der Mutante mit der β -Untereinheit schließen ließen.

Nachdem der S5/H5/S6-Porenbereich von KCNQ1 als offensichtlich notwendige Struktur für eine 293B-Sensitivität identifiziert worden war, wurden nun kleinere Bereiche in dieser Region ausgetauscht. Die Abbildungen III.17, A und B zeigen eine Chimäre mit einer S5-H5-verbindenden KCNQ2-Schleife in einem KCNQ1-Grundgerüst (Q1S5H5linkerS6). Dieses Konstrukt war durch eine KCNQ1-ähnliche Affinität von 293B und eine KCNQ1-ähnliche Kinetik charakterisiert (IC_{50} : $\sim 33 \mu M$).

Ergebnisse

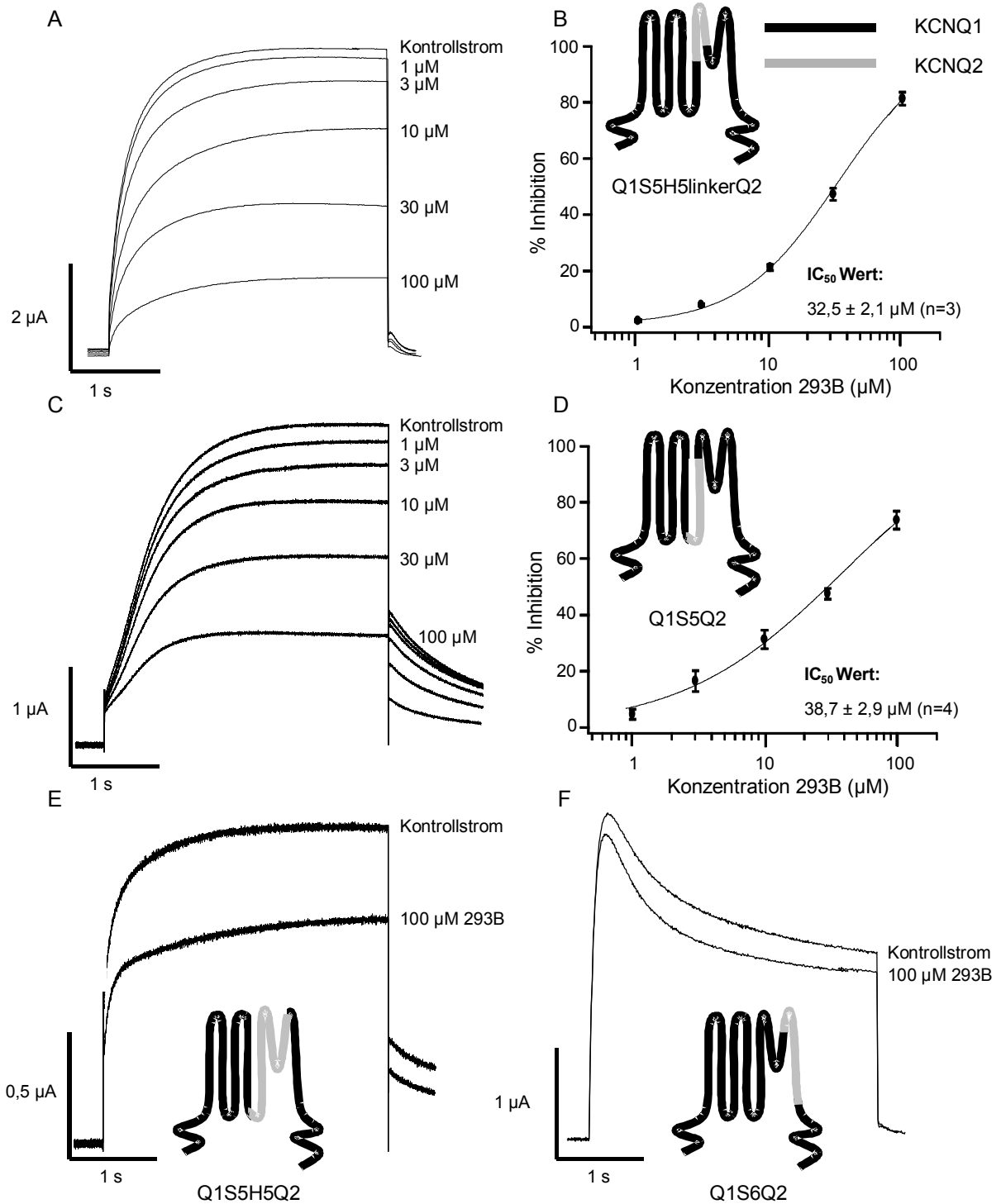


Abbildung III.17: Weitergehende Eingrenzung der Bindungsstelle von 293B durch funktionelle Chimären. **A**, **C**, **E** und **F** zeigen repräsentative Stromkurven von *Xenopus*-Oozyten, in die die cRNA der in **B**, **D** bzw. **E** und **F** skizzierten Konstrukte injiziert wurde. Die Hemmwerte unterschiedlicher Konzentrationen von racemischem 293B wurde logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen, um die IC_{50} -Werte zu bestimmen (**B** und **D**).

Ein anderes Konstrukt, bei dem die Schleife zwischen S4 und S5 und die Helix der Transmembrandomäne S5 in KCNQ1 durch die entsprechende KCNQ2-Sequenz ersetzt

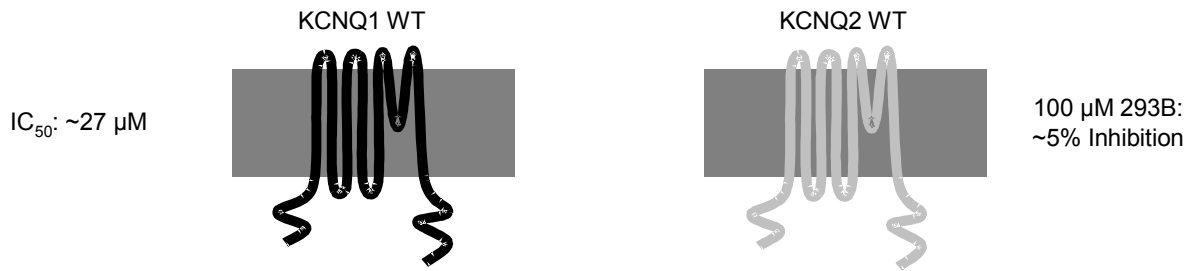
wurde (Q1S5Q2), resultierte nach Expression in *Xenopus*-Oozyten in geringeren Strömen verglichen mit dem KCNQ1-Wild-Typ, die Kanäle waren aber ähnlich sensitiv gegenüber 293B (siehe Abbildung III.17, C und D, IC_{50} : $\sim 39 \mu\text{M}$). Diese Mutante war in Übereinstimmung mit einer früheren Studie (Franqueza *et al.*, 1999) kinetisch verändert (sie aktivierte vor allem langsamer als der Wild-Typ). In der früheren Studie wurden unterschiedliche LQT1-Mutationen in der S4-S5-Schleife untersucht, die alle eine starke Abweichung von dem Öffnungs- und Schließungsverhalten von KCNQ1-Wild-Typ aufwiesen. Die räumliche Nähe zum Spannungssensor in S4, gibt dieser Schleife eine besondere Bedeutung in Bezug auf das Schaltverhalten, was zuvor für verschiedene Kaliumkanäle nachgewiesen wurde (Shieh *et al.*, 1997; Sanguinetti *et al.*, 1999).

Nach Expression einer Chimäre, die zusätzlich zu der vorher beschriebenen noch die H5-Porenschleife von KCNQ2 besitzt (Q1S5H5Q2, siehe Abbildung III.17E), war eine geringe Stromamplitude messbar. Eine Inhibition durch eine 293B-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ war aber nur noch zu weniger als 50% möglich. Wie zuvor gesagt, besitzen *Xenopus*-Oozyten einen endogenen KCNQ1. Die durch ihn verursachten Ströme betragen bei dem verwendeten Protokoll in unserem Messsystem zwischen 50 und 300 nA, so dass eine Betrachtung der Kinetik dieser schwach exprimierenden Mutante nicht sinnvoll erschien. Der zusätzliche Austausch der Porenschleife H5 führte also zu einem starken Verlust der Chromanolsensitivität im Vergleich zu dem Q1S5Q2-Konstrukt. Ein alleiniger Austausch der KCNQ1-Porenschleife durch die von KCNQ2 ergab keine funktionelle Chimäre.

Die Abbildung III.17F zeigt den Strom einer Chimäre, in dem die Schleife zwischen H5 und S6 und die Transmembranhelix S6 von KCNQ1 durch die analogen KCNQ2-Aminosäuren substituiert wurden (Q1S6Q2). Diese Mutante war bei aktivierenden Pulsen kaum sensitiv gegenüber 293B ($10,4 \pm 2,5\%$ Inhibition durch $100 \mu\text{M}$ 293B). Sie inaktivierte stark, aber nicht vollständig, so dass ein erheblicher Reststrom ($\sim 50\%$) nach einem 3-s-Puls blieb. Da der Strom sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr wesentlich veränderte, konnte man ein Gleichgewicht von geöffneten und inaktivierten Kanälen annehmen. Die offenen Kanäle, die den Reststrom erzeugten, ließen sich jedoch kaum durch 293B inhibieren, so dass man die beobachteten Veränderungen der Affinität von 293B nicht allein durch eine größere Anzahl inaktivierter, das heisst auch insensitiver Kanäle gegenüber 293B erklären konnte. Zusätzlich konnten nach Koexpression mit dem MinK-Protein die charakteristischen, langsam aktivierenden, nicht-sättigbaren und nicht-inaktivierenden I_{KS} -Ströme aufgezeichnet werden. Die Kanäle waren ebenfalls durch eine stark erniedrigte Sensitivität gegenüber 293B geprägt ($100 \mu\text{M}$ 293B inhibierten diese I_{KS} -Mutante zu weniger als 50%, während Wild-Typ- I_{KS} einen IC_{50} von $\sim 7 \mu\text{M}$ aufwies).

Die Abbildung III.18 fasst die Ergebnisse der Chimärenstudie zusammen. Der S5/S6-Porenbereich konnte als notwendige Region für eine hohe Affinität von 293B identifiziert werden. Die S4-S5-Schleife, die Transmembranhelix S5 und die S5-H5-Schleife schienen keinen hervorstechenden Einfluss auf die Kaliumblockade durch das Chromanol zu haben, während Veränderungen im Bereich der Porenschleife H5 bis hin zum Ende von S6 in KCNQ1 eine signifikante Veränderung der Affinität von 293B verursachten.

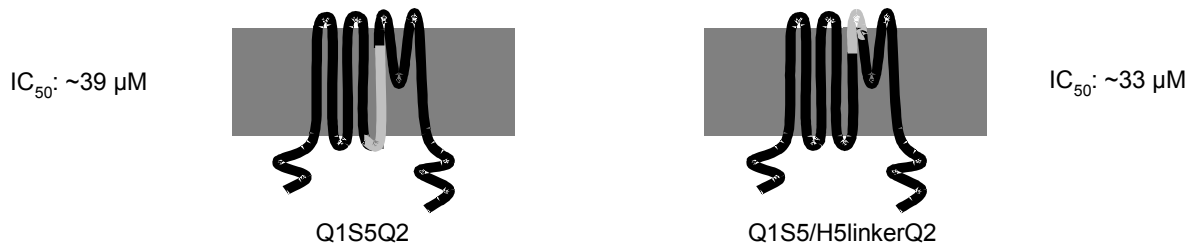
Ergebnisse



Verlust und Gewinn der Sensitivität gegenüber 293B durch Porenaustausch



Regionen ohne Einfluss auf die Sensitivität gegenüber 293B



Regionen mit Einfluss auf die 293B-Sensitivität gegenüber 293B



Abbildung III.18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Chimärenstudie. Die dunkelgraue Hinterlegung der Konstrukte symbolisiert die Zellmembran.

III.A.4.b Molekulare Charakterisierung der Affinität von 293B an KCNQ1 durch Punktmutationen

Der zuvor identifizierte Bereich in KCNQ1, der für eine hohe Affinität von 293B verantwortlich ist, wurde detaillierter untersucht. Die Abbildung III.19 zeigt einen Sequenzvergleich der KCNQ1-verwandten, in dem Abschnitt III.A.1 auf 293B getesteten Kaliumkanäle. Der Vergleich von den sensitiven KCNQ1- und *kqt1*-Kanälen mit den wenig sensitiven KCNQ5- und den nicht sensitiven KCNQ2- und KCNQ3-Kanälen gab Hinweise auf einzelne Aminosäuren, die möglicherweise für eine Bindung des Chromanols verantwortlich sind. Diese Aminosäurereste wurden in KCNQ1 zu den entsprechenden KCNQ2-Resten mutiert und die resultierenden Punkt- oder Doppelmutanten wurden auf ihre Affinität von 293B untersucht.

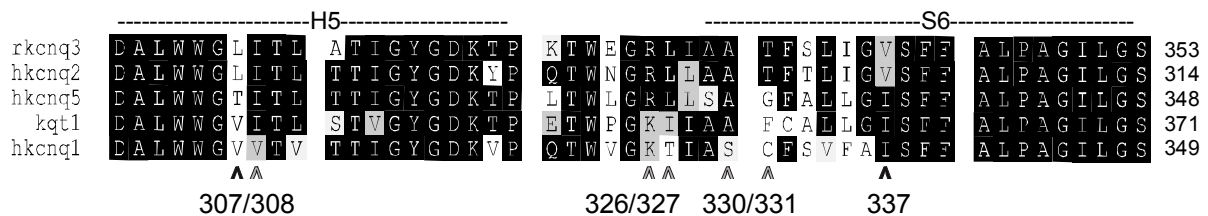


Abbildung III.19: Proteinsequenzvergleich der auf Affinität von 293B untersuchten Kanäle in dem Bereich, der zuvor als notwendig für eine hohe Affinität identifiziert worden war. KCNQ2 und KCNQ3 waren insensitiv, KCNQ5 schwach sensitiv und *kqt1*- und KCNQ1-Kanäle zeigten eine vergleichbare, aber starke Inhibition. Der H5- und der S6-Bereich sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die ▲ deuten auf Positionen, die für die unterschiedlichen Sensitivitäten verantwortlich sein könnten, wobei die dunklen ▲ auf die Positionen hinweisen, die nachfolgend als wichtige Determinanten identifiziert wurden.

Die Tabelle III.1 zeigt die Ergebnisse dieser Studie. Die Doppelmutante, bei der die in KCNQ1 natürlich kodierte Aminosäuren Lysin und Threonin an den Positionen 326 und 327 durch Arginin und Leucin ersetzt wurden, war in ihrer Sensitivität gegenüber 293B nicht beeinflusst. Dasselbe ergab sich für die Doppelmutante, in der Serin und Cystein an den Positionen 330 und 331 durch die KCNQ2-Reste Alanin und Threonin substituiert wurden. Eine Substitution der beiden Valinreste an den KCNQ1-Positionen 307 und 308 durch zwei Leucine erniedrigte die Sensitivität gegenüber dem Chromanol signifikant. Separate Punktmutationen an dieser Stelle ergaben, dass diese Veränderung durch alleinigen Austausch des Valins 307 erreicht werden konnte, während V308L verglichen mit dem Wild-Typ durch 293B nicht verändert inhibiert wurde. Weiterhin konnte durch Austausch des Isoleucins in Position 337 (KCNQ1) durch das in KCNQ2 kodierte Valin der IC_{50} -Wert auf größer als 100 μ M 293B erhöht werden.

Ergebnisse

Tabelle III.1: Effekt von Einzel- und Doppelmutationen im H5/S6-Bereich auf die Sensitivität homomerer KCNQ1- und heteromerer I_{Ks} -Kanäle gegenüber 293B wie in der Abbildung III.19 markiert. Die IC_{50} -Werte der I_{Ks} -Kanäle wurden nur für die Mutationen bestimmt, die schon eine veränderte Inhibition von KCNQ1 verursachten.

Mutation in KCNQ1	Inhibition von KCNQ1 durch 293B	Inhibition von I_{Ks} durch 293B
WT KCNQ1	IC_{50} : $26,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (n = 5)	IC_{50} : $6,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (n = 5)
VV307/308LL	IC_{50} : $\sim 100 \mu\text{M}$ (n = 3)	IC_{50} : $\sim 100 \mu\text{M}$ (n = 3)
V307L	100 μM 293B: $48,7 \pm 3,2\%$ Inhibition (n = 4)	100 μM 293B: $49,9 \pm 2,2\%$ Inhibition (n = 4)
V308L	IC_{50} : $30,1 \pm 1,5 \mu\text{M}$ (n = 3)	nicht untersucht
KT326/327RL	IC_{50} : $29,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (n = 3)	nicht untersucht
SC330/331AT	IC_{50} : $32,4 \pm 2,0 \mu\text{M}$ (n = 3)	nicht untersucht
I337V	100 μM 293B: $34,8 \pm 2,4\%$ Inhibition (n = 4)	100 μM 293B: $39,1 \pm 3,5\%$ Inhibition (n = 4)

Die Stromkurven der beiden Punktmutanten mit verringerter Sensitivität gegenüber 293B sind in der Abbildung III.20 dargestellt. Nach funktioneller Expression in *Xenopus*-Oozyten zeigte V307L eine leicht verlangsamte Aktivierungskinetik verglichen mit KCNQ1-Wild-Typ-Kanälen. Bei der detaillierten kinetischen Analyse dieser Mutante fiel auf, dass sie die dem Wild-Typ typische Inaktivierung verloren hatte (siehe Abschnitt III.B). Die Koexpression mit dem MinK-Protein (siehe Abbildung III.20B) ergab charakteristische I_{Ks} -Ströme, während die Kanalsensitivität gegenüber 293B (IC_{50} : $>100 \mu\text{M}$) verglichen mit den Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen um mehr als den Faktor 15 geringer war. Die Mutante I337V war durch eine beschleunigte Aktivierung und eine verstärkte Inaktivierung gegenüber den Wild-Typ-KCNQ1-Kanälen charakterisiert. Nach der Koexpression mit MinK wurden jedoch die I_{Ks} -typischen Ströme beobachtet, und die Kanäle ließen sich durch 100 μM 293B nur zu $39,1 \pm 3,5\%$ inhibieren.

In diesem Abschnitt konnten zwei Aminosäurereste in KCNQ1 identifiziert werden (V307 und I337), deren Substitution durch die entsprechenden KCNQ2-Aminosäuren eine stark erniedrigte Affinität von 293B an KCNQ1 verursachten. Die verminderte Affinität der entsprechenden I_{Ks} -Kanäle war noch deutlicher verglichen mit dem I_{Ks} -Wild-Typ.

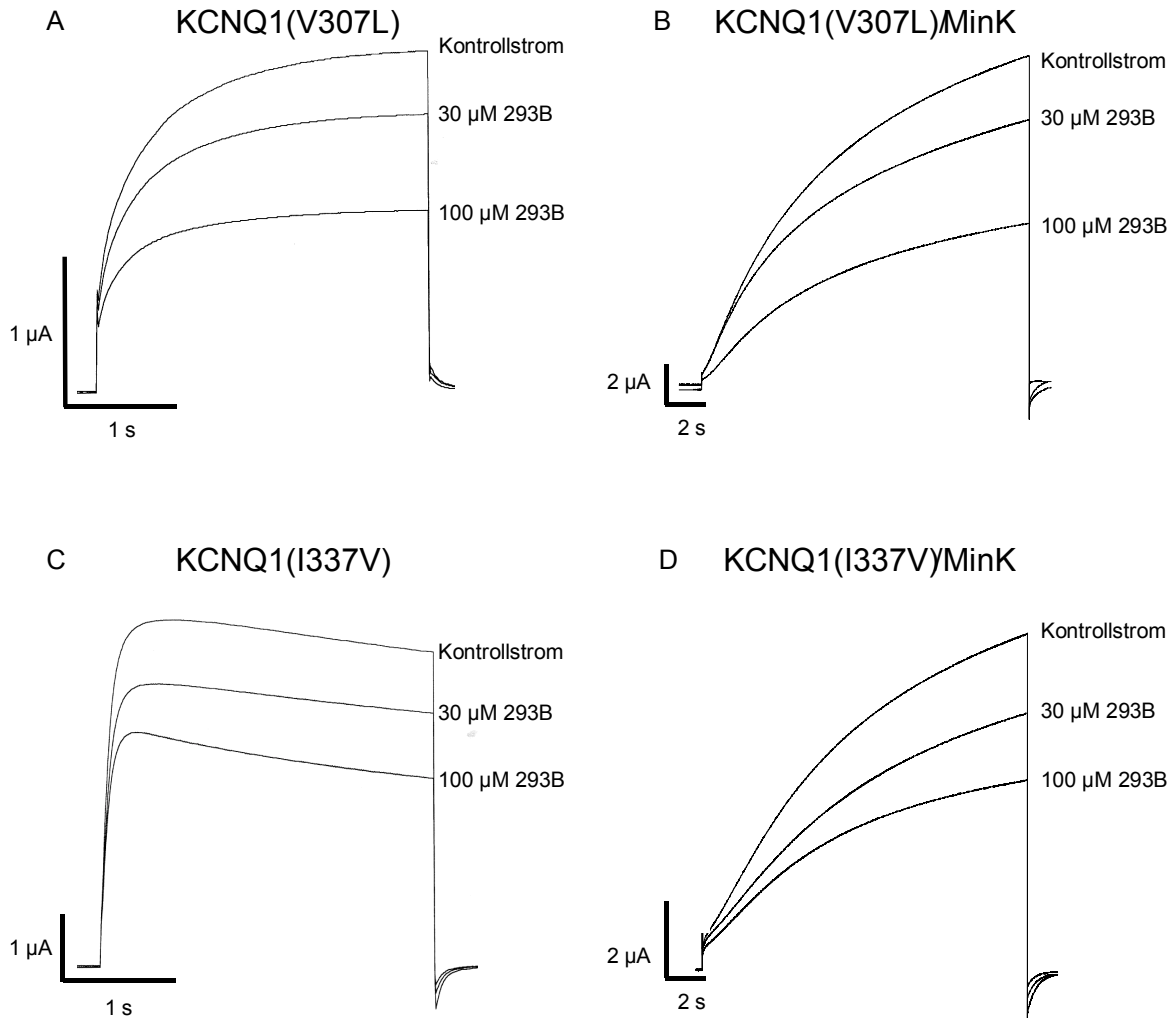


Abbildung III.20: Funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten der Punktmutanten KCNQ1(V307L) und KCNQ1(I337V) mit einer geringeren Affinität von 293 verglichen mit dem Wild-Typ. **A** und **C** zeigen repräsentative Ströme der KCNQ1-Mutanten, **B** und **D** die Ströme der mutierten I_{Ks} -Kanäle, jeweils unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von 293B.

III.A.4.c Einfluss von Punktmutationen in KCNQ2 auf die Sensitivität gegenüber 293B

Die bisherigen Versuche zielten vornehmlich darauf ab, die Bindungsstelle von 293B in KCNQ1 zu zerstören. Doch konnten wir auch mithilfe der Chimäre Q2S5S6Q1 zeigen, dass durch die Substitution des gesamten Porenbereichs durch entsprechende KCNQ1-Sequenz,

Ergebnisse

die Sensitivität gegenüber 293B in KCNQ2 verglichen zum Wild-Typ erheblich erhöht werden konnte. Es sollte nun geprüft werden, ob ein punktueller Austausch der im vorherigen Abschnitt identifizierten Aminosäuren Leucin 272 und Valin 302 im KCNQ2-Protein (die entsprechende KCNQ1-Nummerierung ist 307 und 337) gegen die KCNQ1-Reste Valin bzw. Isoleucin die Sensitivität gegenüber 293B verändern kann.

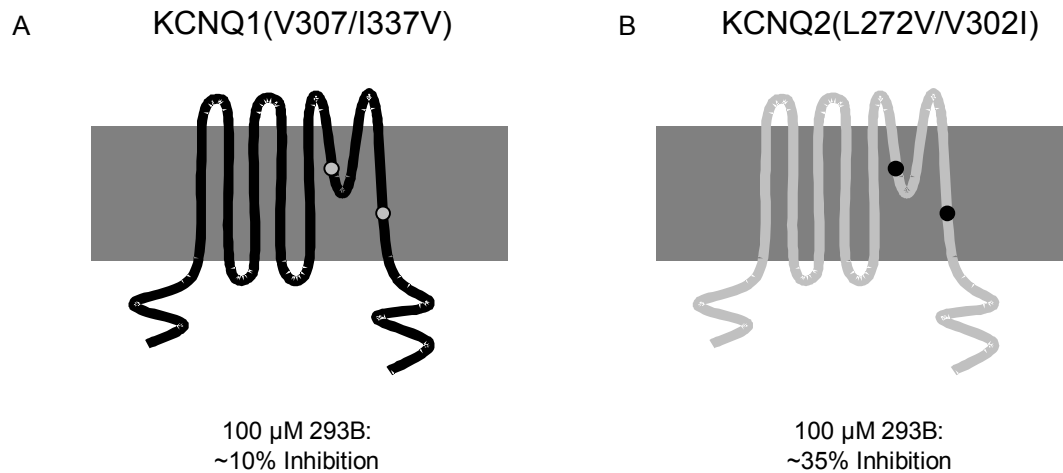


Abbildung III.21: Skizze der im Text beschriebenen Doppelmutanten KCNQ1(V307/I337V) und KCNQ2(L272V/V302I) und der Hemmeffekt von 100 µM 293B. Die Werte wurden erhalten, wie es zuvor für alle anderen Mutanten beschrieben worden ist. Die Anzahl der Experimente war für beide Mutanten $n = 4$.

Wir führten parallel die jeweiligen Doppelmutationen in KCNQ1 und KCNQ2 ein und testeten die Sensitivität der Mutanten gegenüber 293B. Die Abbildung III.21 zeigt das Ergebnis. Die Doppelmutation in KCNQ1 (V307L/I337V) erniedrigte die Sensitivität im Vergleich zum Effekt der Einzelmutationen noch einmal. Diese KCNQ1-Mutante wurde nur noch zu ~10% blockiert. In KCNQ2 wurde sowohl durch die beiden Einzelmutationen als auch durch die Doppelmutation die Sensitivität gegenüber 293B nur geringfügig erhöht. Der größte Effekt wurde durch die Doppelmutation (L272V/V302I) erreicht, die durch 100 µM 293B zu $34,7 \pm 1,7\%$ inhibiert wurde.

**III.A.4.d Identifizierung weiterer für die Affinität von 293B
relevanter Reste durch Computer-gestützte Modellierung**

Der in den Abschnitten III.A.4, a-c gewählte Ansatz, notwendige Sequenzbereiche und einzelne Aminosäurereste für eine hohe Affinität von 293B zu ermitteln, beruhte darauf, Unterschiede zwischen den Sequenzen eines gegenüber 293B sensitiven Kanals, KCNQ1, und eines gegenüber 293B insensitiven Kanals, KCNQ2, auszunutzen. Auf dieser Grundlage wurden bestimmte Reste nicht erfasst, die in beiden Kaliumkanälen identisch waren, die aber trotzdem für eine Inhibition durch 293B wichtig sein könnten. Das Experiment in III.A.4.c verdeutlichte diese Problematik. Durch Austausch von zwei Aminosäuren in KCNQ1 gegen entsprechende KCNQ2 Aminosäuren konnte die Sensitivität gegenüber einem Blocker teilweise herabgesetzt werden, aber durch analogen Austausch der äquivalenten Reste in KCNQ2 wurde nur bedingt eine gesteigerte Sensitivität erreicht. Daher wurde in einem weitergehenden Ansatz versucht, auch solche Determinanten zu erfassen, welche durch reinen Sequenzvergleich nicht evident geworden waren.

Mit der Veröffentlichung der bisher einzigen Röntgen-Kristallstrukturanalyse eines Kaliumkanals durch die Arbeitsgruppe um Roderick MacKinnon (Doyle *et al.*, 1998) wurde die Struktur dieser Proteine erstmalig molekular aufgeklärt. Die Autoren kristallisierten den Porenbildenden Teil (KCNQ1 entsprechend S5 bis S6) des nur zwei Transmembrandomänen enthaltenden Kaliumkanals KcsA aus *Streptomyces lividans*. Durch Röntgenstrukturanalyse der anisotropen Kristalle etablierten sie schon durch andere Experimente gestützte, aber auch neue, bisher nicht vermutete, allgemeine Aussagen über Kaliumkanäle. Es war bekannt, dass die funktionellen Kaliumkanalproteine typischerweise Tetramere aus vier identischen α -Untereinheiten bilden (MacKinnon, 1991) und dass die in fast allen Kaliumkanälen konservierte GYG-Signatur für die Selektivität des Ionenflusses verantwortlich ist (Heginbotham *et al.*, 1992 und 1994). Liu *et al.* (1997) zeigten durch Cystein-reaktive Substanzen, dass bestimmte Aminosäuren in der inneren Helix (bei KCNQ-Kanälen entsprechend S6) vom Zytoplasma her zugänglich sind. Doch wie exakt die vier Untereinheiten zueinander angeordnet liegen, wie der Selektivitätsfilter (GYG-Motiv) aufgebaut und wie die offensichtlich große und wassergefüllte innere Pore strukturiert ist, wurde erst durch die Kristallstruktur ersichtlich.

Demnach ist die innere Pore eines Kaliumkanals wie ein auf dem Kopf stehendes "Tipi" geformt, wobei die Achsen der inneren Helices (S6) die vier Stangen dieses Zeltes darstellen. An der breiten Basis des auf dem Kopf stehenden Zeltes, nahe der äußeren Membran,

befindet sich der Selektivitätsfilter (GYG-Motiv), der durch Carbonyl-Sauerstoffatome der Hauptkette mit negativer Partiaalladung gebildet wird. Diese Sauerstoffatome sind durch die Seitenketten über van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenbindungen so positioniert und stabilisiert, dass sie zwei Kaliumatomen (inneres und äußeres Ion) in diesem Filter eine optimale energetische Umgebung bieten. Dies ist wichtig, da die Kaliumionen dehydratisiert das Filter passieren und die Energie, die zur Dehydratisierung notwendig ist, durch die neue Umgebung kompensiert werden muss. Der Radius des Selektivitätsfilters ist für hydratisierte Natriumionen zu groß, so dass sie um den Faktor 10^4 schlechter passieren. Durch die große wassergefüllte innere Pore und den kurzen Selektivitätsfilter ($\sim 12 \text{ \AA}$) wird die schnelle Kaliumdiffusion gewährleistet.

Die Sequenz des KcsA-Kanals aus *Streptomyces* ist im Poren-bildenden Bereich denen von Kaliumkanälen in Bakterien, Pflanzen, *Vertebraten* und *Invertebraten* sehr ähnlich. Daher werden die oben genannten Eigenschaften für sämtliche Kaliumkanäle und sogar für einige anderen Kationenkanäle angenommen. Da MacKinnon *et al.* (1998) die Analogie des KcsA-Modells zu der Struktur eukaryontischer Kaliumkanäle durch eine Toxin-Bindestudie validierten und zusätzlich viele Mutagenesestudien eukaryontischer Kaliumkanäle dem Modell entsprachen (MacKinnon und Yellen, 1990; Yellen *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997), besteht einige Evidenz, dass auch eine Übertragung auf KCNQ-Kanäle möglich ist. Auf dieser Basis beruht die von Guex und Peitsch (1997) beschriebene vergleichende Proteinmodellierung ("comparative protein modelling"), die es ermöglicht, zu einer bekannten Proteinstruktur (Matrize oder "Template", in unserem Fall KcsA) mindestens-30%-identische-Proteine zu modellieren.

	-----S5-----		
KCNQ1	QELITTLTYIG	FLGLIFSSYF	VYLAEKDAVN
KCSA	RAAGAATVLL	VIVLLAGSYL	AVLAERGA PG
			ESGRVEFGSY
			ADALW 304
			PRALW 67
	-----H5-----	-----S6-----	
KCNQ1	WGVVTVTTIG	YGDKVPQTVW	GKTIASCFSV
KCSA	WSEVETATTVG	YGDLYPVTLW	GRCVAVVVMV
			FAISFFALPA
			GILGS 349
			AGITSFGLVT
			AALAT 112
KCNQ1	G F A L K V Q		356
KCSA	W F V G R E Q		119

Abbildung III.22: Proteinsequenzvergleich der Kaliumkanäle hKCNQ1 und KcsA (*Streptomyces lividans*) für den Bereich, der durch MacKinnon *et al.* (1998) kristallisiert wurde. Die beiden Proteine sind in diesem Bereich zu 36% identisch und zu 46% homolog.

Der humane KCNQ1-Kanal ist in dem Bereich, der für KcsA kristallisiert wurde, zu 36% mit KcsA identisch (siehe auch Abbildung III.22), das heisst auch für den S5/H5/S6-Bereich von KCNQ1 kann mithilfe der vergleichenden Proteinmodellierung ein putatives Modell erstellt werden. In dieser Dissertation wurde dies mittels Swiss-Model, einem im Internet frei

verfügbaren automatisierten Protein-Modellierungsrechner durchgeführt. Als Matrize diente die KcsA-Röntgenstruktur (Protein data bank code 1BL8) und als Basis für die Analogmodellierung der Sequenzvergleich in der Abbildung III.22. Zur Visualisierung der berechneten dreidimensionalen Struktur wurde das Molekülgraphikprogramm Sybyl6.6 verwendet und die Geometrie des Modells wurde validiert, wie es im Abschnitt *Material und Methoden* (siehe Abschnitt II.E) beschrieben wurde.

In den Abschnitten III.A.4, a-c dieser Arbeit konnte der innere Porenbereich, in dem die KCNQ1-Aminosäuren V307 und I337 lokalisiert sind, als der wahrscheinliche Wirkungsbereich von 293B identifiziert werden. Die Abbildung III.23 zeigt diesen wichtigen Ausschnitt des erstellten KCNQ1-Modells. Man kann erkennen, dass die Seitenketten der vier Isoleucine an Position 337 wirklich in das Poreninnere gerichtet sind. Zusätzlich und noch deutlicher in der Abbildung erkennbar, waren die aromatischen Seitenketten des Phenylalanins an Position 340 in das Lumen der inneren Pore gerichtet. Für die analoge Aminosäure in den zu KCNQ1 ganz nahe verwandten *Shaker*-Kaliumkanälen wurde schon durch Liu *et al.* (1997) gezeigt, dass sie vom Zellinneren her zugänglich ist.

Die Seitenketten des Valin an Position 307 in KCNQ1 waren in diesem Modell nicht in das Poreninnere gerichtet. Dieses Valin sitzt in der so genannten Porenhelix, deren Aufgabe es nach MacKinnons Modell ist, den Selektivitätsfilter in seiner Konformation zu stabilisieren. Aufgrund des Modells konnte man eine Positionierung von 293B annehmen, wie sie in der Abbildung dargestellt ist. Der Ligand wurde manuell an seine potentielle Bindungsstelle andockt, so dass sich attraktive Interaktionen zwischen den Seitenketten im Lumen des inneren Porenbereichs und dem Chromanol ausbilden (die Abstände liegen zwischen 3 und 7 Å). Danach wäre V307 wahrscheinlich nicht an einer Interaktion mit 293B beteiligt, sondern würde vielleicht eine Konformationsänderung des gesamten Bereichs verursachen, wenn es zu Leucin mutiert wurde. Nach dem abgebildeten Modell wird eher noch eine Beteiligung von Threonin 311 an einer möglichen Bindungsstelle von 293B suggeriert.

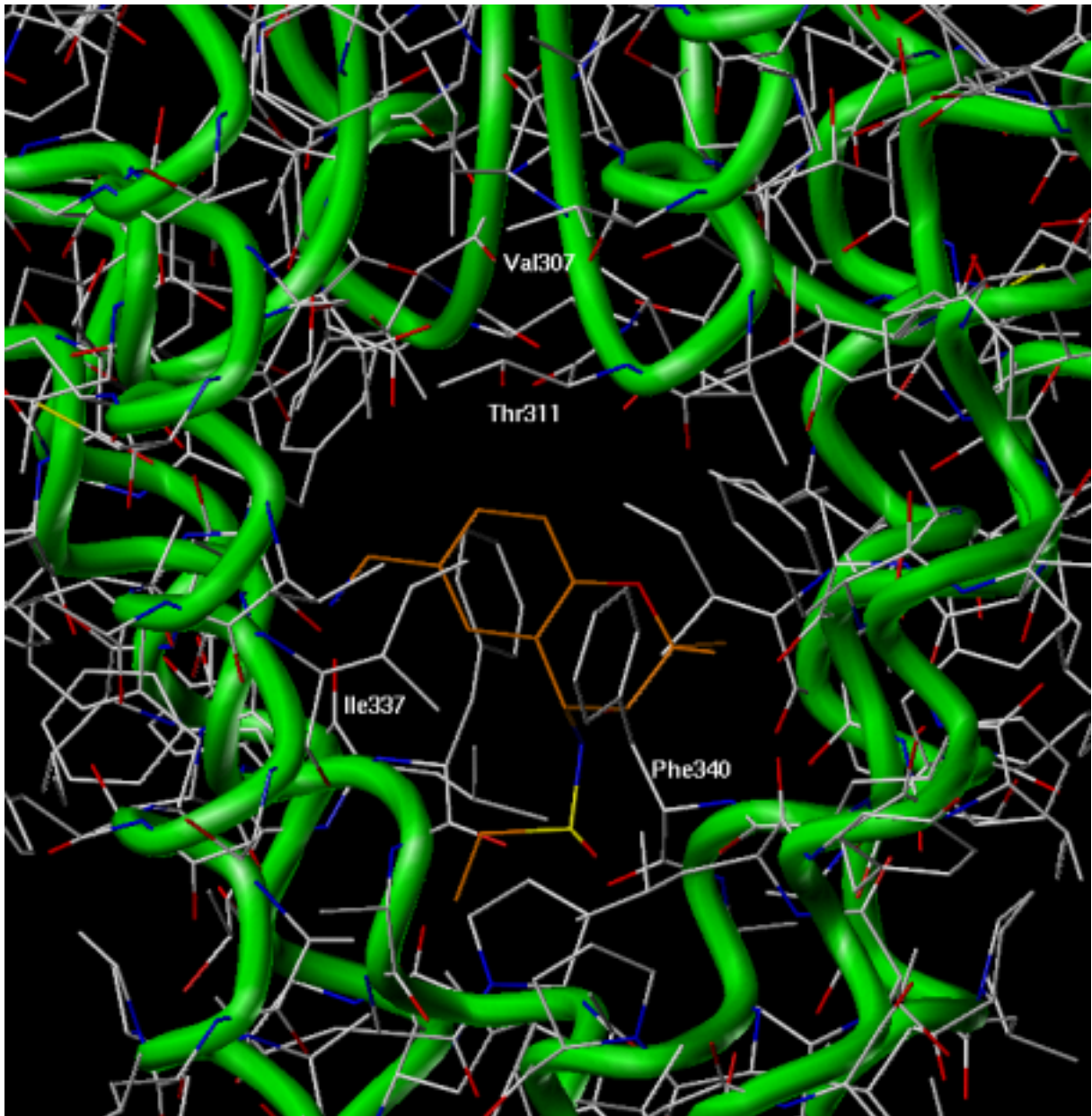


Abbildung III.23: Durch Analogmodellierung erstelltes 3D-Modell aller vier Untereinheiten von KCNQ1 (in der Seitenansicht) mit dem Liganden 293B an seiner putativen Bindungsstelle. Gezeigt ist der Bereich der inneren Pore, deren Dreiecksform als ein auf dem Kopf stehendes Zelt beschrieben wurde. Die Hauptkette des Proteins ist in grün dargestellt. Die Reste der Seitenketten sind farbig abgehoben, wobei weiss Kohlenstoff, rot Sauerstoff, blau Stickstoff und gelb Schwefel entspricht. Die Kohlenstoffatome von 293B sind orange dargestellt. Zuvor als wichtig identifizierte oder aus dem Modell wichtig erscheinende Aminosäurereste sind nummeriert.

III.A.4.e Validierung des Modells

Da ein *in-silico*-Experiment wie in Abschnitt III.A.4.d immer spekulativ und nur bedingt empirisch ist, sollten die Ergebnisse durch weitere Experimente validiert werden. Es lag nun nahe, die KCNQ1-Aminosäurereste 311 und 340 zu mutieren und die Mutanten auf eine veränderte Sensitivität gegenüber 293B zu untersuchen. Da nach dem Modell vor allem der S6-Bereich für eine 293B-Interaktion interessant zu sein schien, führten wir hier um die Aminosäuren I337 und F340 weitere Mutationen ein, um eventuell zusätzliche, wichtige Reste zu identifizieren.

Tabelle III.2: Effekt von Punktmutationen im H5/S6-Bereich auf die Sensitivität homomerer KCNQ1- und heteromerer I_{Ks} -Kanäle gegen 293B. IC_{50} -Werte auf I_{Ks} -Kanäle wurden nicht für alle Mutationen bestimmt.

Mutation in KCNQ1	Inhibition von KCNQ1 durch 293B	Inhibition von I_{Ks} durch 293B
WT KCNQ1	IC_{50} : $26,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (n = 5)	IC_{50} : $6,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (n = 5)
V310L	IC_{50} : $70,5 \pm 2,1 \mu\text{M}$ (n = 3)	IC_{50} : $30,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (n = 3)
T311S	IC_{50} : $30,1 \pm 1,7 \mu\text{M}$ (n = 3)	IC_{50} : $7,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (n = 3)
T311A	keine funktionelle Expression	nicht untersucht
F335Y	100 μM 293B: ~50% Inhibition (n = 3)	IC_{50} : $9,1 \pm 2,5 \mu\text{M}$ (n = 3)
A336T	100 μM 293B: ~40% Inhibition (n = 3)	100 μM 293B: ~50% Inhibition (n = 3)
I337V	100 μM 293B: ~35% Inhibition (n = 4)	100 μM 293B: ~39% Inhibition (n = 4)
S338T	100 μM 293B: ~40% Inhibition (n = 4)	IC_{50} : $10,2 \pm 3,7 \mu\text{M}$ (n = 4)
F339Y	100 μM 293B: ~40% Inhibition (n = 3)	IC_{50} : $20,2 \pm 1,7 \mu\text{M}$ (n = 3)
F340I	100 μM 293B: ~20% Inhibition (n = 3)	nicht untersucht
F340Y	100 μM 293B: ~10% Inhibition (n = 4)	100 μM 293B: ~30% Inhibition (n = 4)

Die Tabelle III.2 fasst die Ergebnisse der Mutagenese-Experimente zusammen. Die Positionen 310 und 311 in KCNQ1 wurden verändert, um zu klären, inwieweit der Teil der H5-Schleife, die zur inneren Pore gerichtet ist, an einer 293B-Interaktion beteiligt ist, wie es durch die veränderte Sensitivität der Mutante V307L gegenüber 293B angedeutet war. Die Aminosäure 310 schien interessant wegen der Nachbarschaft zu dem aus dem Modell heraus offensichtlich untersuchenswerten Threonin 311 und wegen der Sequenzunterschiede an dieser Position zwischen den different 293B-empfindlichen KCNQ-Kanälen (siehe Abbildung III.19). Die Mutation V310L veränderte die Sensitivität sowohl von KCNQ1- als auch von I_{Ks} -Kanälen gegenüber 293B schwach. Veränderungen an der Position 311 hatten dagegen keinen Effekt auf die Affinität von 293B an die beiden Kanäle oder die entsprechenden Mutanten zeigten keine funktionelle Expression. Es ist in diesem Zusammenhang interessant anzumerken, dass eine natürlich vorkommende, dominant negative Romano-Ward-Mutante T311I (Wang, Curran *et al.*, 1996) auch nicht funktionell exprimierte (Wollnik *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu den Mutationen im H5-Bereich zeigten alle Mutationen, die im S6-Bereich eingeführt wurden, einen sehr starken Effekt auf die Affinität von 293B an die entsprechenden homomeren KCNQ1-Kanäle. Für alle Mutanten war der IC_{50} -Wert um mehr als den Faktor 3 zu höheren Werten hin verschoben, das heisst, keine der Mutanten ließ sich durch 100 μ M 293B zu mehr als 50% inhibieren. Ebenso aktivierten alle in diesem Bereich veränderten Mutanten beschleunigt und inaktivierten verstärkt. Eine Analyse der entsprechenden I_{Ks} -Ströme ergab, dass im wesentlichen die Mutationen A336T und F340Y und bedingt F339Y die Sensitivität der I_{Ks} -Kanäle gegenüber 293B beeinflussten. Die Ströme offenbarten, dass die Mutanten eine sich kinetisch I_{Ks} -typisch verhalten und entsprechend nicht inaktivieren. Die Ströme der homomeren KCNQ1(F340Y)- und der heteromeren KCNQ1(F340Y)/MinK-Kanäle und der Einfluss von 100 μ M 293B sind in der Abbildung III.24 wiedergegeben. Auch hier erkennt man die zum Wild-Typ-KCNQ1 unterschiedliche Kinetik. Bei Koexpression mit MinK entstanden jedoch keine vom Wild-Typ- I_{Ks} abweichenden Ströme. Da dominant negative, also krankheitsverursachende Mutationen an den Positionen 341 (A341V und A341E, Wang, Curran *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1999) und 342 (L342F, Chouabe *et al.*, 1997) bekannt waren und die Aminosäuren an diesen beiden Positionen unter Kaliumkanälen hochkonserviert sind, wurden diese nicht durch Mutagenese verändert.

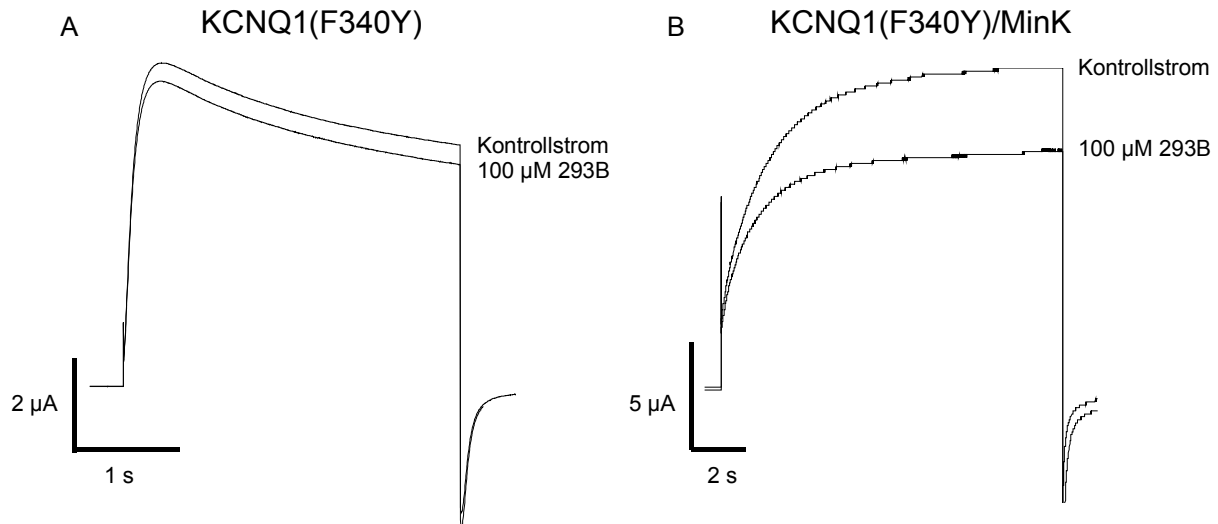


Abbildung III.24: Funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten und Charakterisierung der Affinität von 293B an der Punktmutante KCNQ1(F340Y) (A) und der entsprechenden I_{Ks} -Mutante (B). Durch das Modell in Abbildung III.22 war das Phenylalanin an Position 340 als mögliche Determinante für eine hohe Affinität von 293B identifiziert worden.

Durch Computer gestützte Modellierung der KCNQ1-Untereinheit des I_{Ks} -Kanals gelang es, die Interaktion zwischen dem Chromanol 293B und KCNQ1 näher zu identifizieren. Im mittleren S6-Bereich, der die innere Pore von Kaliumkanälen bildet, wirkten sich Mutationen sehr empfindlich auf die Sensitivität des Kanals gegenüber 293B aus. Das durch Analogmodellierung erstellte Modell konnte durch zielgerichtete Mutagenese in diesem Bereich validiert werden, so dass die Aminosäurereste I337 und F340 als Determinanten einer hohen Affinität an 293B angenommen werden konnten. Die durch die Chimärenstudie entstandene Vermutung, dass der Bereich der Porenschleife H5 an einer Interaktion mit 293B direkt teilnimmt, wurde durch das Modell nicht gestützt, obgleich die beiden Mutationen V307L und V310L einen Einfluss auf den Block der KCNQ1-Mutanten durch 293B zeigten.

III.A.4.f Überprüfung der Bindungsstelle von Chromanolen durch die potentere Substanz HMR 1556

293B stellt einen spezifischen I_{Ks} - und KCNQ1-Inhibitor dar. Insbesondere KCNQ1-Kanäle werden durch höhere mikromolare Konzentrationen des Chromanols inhibiert, und einige Mutanten konnten nur mit der nahe dem Sättigungswert liegenden Konzentration von 100 μ M 293B signifikant inhibiert werden. Da mittlerweile verwandte Substanzen vorliegen, die beide Kanäle wesentlich potenter inhibieren (siehe Abschnitt III.A.2), wurde die Inhibitionspotenz von HMR 1556 auf die Mutanten mit den durch das Modell identifizierten Schlüsselmutationen T311S, I337V und F340Y untersucht. Hierdurch sollten mögliche Artefakte bei zu hohen

Blockerkonzentrationen ausgeschlossen werden und weiterhin die Allgemeingültigkeit der Interaktionsstudie für Verbindungen dieser Substanzklasse überprüft werden.

Homomere KCNQ1-Kanäle wurden, wie in dem Abschnitt III.A.2 beschrieben ist, durch eine halbmaximale Hemmkonzentration von $0,42 \pm 0,02 \mu\text{M}$ HMR 1556 blockiert. Die in der H5-Schleife lokalisierte Mutation T311S beeinflusste auch die Pharmakologie dieser Substanz nicht (IC_{50} : $0,45 \pm 0,10 \mu\text{M}$, $n = 3$), wie schon für 293B gezeigt. Die Mutationen I337V und F340Y bewirkten eine Verschiebung der Inhibitionskurven um Faktoren > 20 im Vergleich zu Wild-Typ-KCNQ1-Kanälen. Die Mutante KCNQ1(I337V) besaß einen IC_{50} -Wert von $8,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$ HMR 1556 ($n = 4$) und die Mutante KCNQ1(F340Y) wurde durch die Konzentration von $10 \mu\text{M}$ HMR 1556 zu $\sim 50\%$ inhibiert ($n = 3$). Diese Ergebnisse waren analog zu den mit 293B erhaltenen Resultaten.

In diesem Zusammenhang ist es interessant hinzuzufügen, dass das Benzodiazepin L-768 der Firma Merck-Sharp-Dome (Selnick *et al.*, 1997), welches zu der anderen bekannten Substanzklasse von I_{Ks} -Inhibitoren gehört, ebenfalls an dieser Stelle von KCNQ1 anzugreifen scheint. Die Porenchimäre Q2S5-S6Q1 wurde durch 30 nM L-768 zu $43 \pm 2\%$ ($n = 3$) inhibiert, während KCNQ2-Ströme durch diese Konzentration nicht signifikant beeinflusst wurden. Die Mutante KCNQ1(F340Y) wurde hingegen durch eine Konzentration von $3 \mu\text{M}$ des Benzodiazepins zu nur $48 \pm 1\%$ ($n = 3$) inhibiert, während Wild-Typ-KCNQ1-Ströme bei dieser Konzentration vollständig unterdrückt wurden.

III.B Die Inaktivierung von KCNQ1

Bei der Charakterisierung der KCNQ1-Mutante V307L fiel auf, dass diese Mutante nicht mehr inaktivierte (siehe Abschnitt III.A.4.b). Die Mutante zeichnete sich zwar durch eine erheblich geringere Sensitivität gegenüber 293B aus, in dem erstellten Analogiemodell konnte das Valin an Position 307 jedoch nicht direkt mit dem Chromanol 293B in Interaktion treten. Es sollte daher untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Sensitivität gegenüber 293B und dem molekularen Mechanismus der Inaktivierung besteht in der Art, dass eine nicht vorhandene Inaktivierung eine niedrigere Sensitivität der Kanäle impliziert.

Die Inaktivierung in homomeren KCNQ1-Kanälen ist biophysikalisch detailliert untersucht worden (Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998, Pusch *et al.*, 1998). Sie unterscheidet sich von der klassischen C-Typ-Inaktivierung in *Shaker*-Kaliumkanälen durch die Unabhängigkeit von extrazellulärer Kalium- und TEA-Konzentration und durch ein verzögertes Einsetzen der Inaktivierung nach aktivierendem Stimulus. Die geringe Spannungsabhängigkeit der KCNQ1-Inaktivierung und die offensichtliche Abwesenheit einer *Shaker*-ähnlichen "Ball"-struktur beschreiben Unterschiede zur N-Typ-Inaktivierung.

Über die molekularen Determinanten der KCNQ1-Inaktivierung ist jedoch bisher nur diskutiert worden. Franqueza *et al.* (1999) analysierten drei verschiedene LQT1-Mutationen innerhalb der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen S4 und S5. In diesem Bereich ist der Rezeptor für den Inaktivierungsball der N-Typ-Inaktivierung von Kaliumkanälen lokalisiert (Holmgren *et al.*, 1996). Nach der Expression in *Xenopus*-Oozyten zeigten einige Mutanten ein generell verändertes kinetisches Verhalten, einschließlich veränderter Inaktivierungskinetik, aber in keiner dieser Mutanten war die Inaktivierung aufgehoben. Die LQT1-Mutation L273F (Wang, Curran *et al.*, 1996), in der Mitte der Transmembrandomäne S5 gelegen, zeigte nach der Expression in *Xenopus*-Oozyten stark inaktivierende KCNQ1-Ströme (Shalaby *et al.*, 1997), was auf eine wichtige Funktion dieser Region bei der KCNQ1-Inaktivierung hindeutet.

Die KCNQ1-Inaktivierung ist durch Koexpression mit MinK aufzuheben bzw. für die sich kinetisch ganz anders verhaltende I_{Ks} -Kanälen nicht nachweisbar (Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998, Pusch *et al.*, 1998). Durch dieses Verhalten bei der KCNQ1/MinK-Zusammenlagerung ist auch die physiologische Relevanz dieser Inaktivierung in Frage gestellt. Es legt aber nahe, dass Interaktionsdomänen der beiden Proteine möglicherweise

auch am Inaktivierungsprozess beteiligt sind. Pusch *et al.* (2000) postulierten eine MinK-Interaktion mit der äußeren Pore von KCNQ1, nachdem sie unterschiedliche kinetische Abhängigkeiten von KCNQ1 und I_{KS} von der extrazellulären Rubidiumionenkonzentration zeigen konnten. Wie schon in vorherigen Abschnitten beschrieben, wurde eine MinK-Interaktion auch mit der Pore von KCNQ1 vermutet, was durch eine Studie mit Cystein-Mutanten (Tai und Goldstein, 1998) und eine Hefe-zwei-Hybrid-Studie (Romey *et al.*, 1997) gestützt wurde.

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, den molekularen Mechanismus der KCNQ1-Inaktivierung aufzuklären und einen Zusammenhang zur Sensitivität gegen 293B zu untersuchen. Anhand der stark inaktivierenden LQT1-Mutante L273F ergab sich zudem eine mögliche pathophysiologische Rolle dieses Mechanismus.

III.B.1 Die molekularen Determinanten der KCNQ1-Inaktivierung

III.B.1.a Lösungsansatz

Um die strukturellen Determinanten der KCNQ1-Inaktivierung aufzuklären, wurde der gleiche Ansatz genutzt, wie er bereits zur Identifizierung der Bindungsstelle von 293B in KCNQ1 angewendet wurde (siehe Abschnitt III.A.4). Wie später erläutert wird, inaktivieren die nahe verwandten KCNQ2-Kanäle nicht. Sie können bei einer Form von Neugeborenenepilepsie mutiert sein (Singh *et al.*, 1998, Biervert *et al.*, 1998) und bilden eine Komponente des nicht-inaktivierenden neuronalen M-Stroms (Wang, Pan *et al.*, 1998). Anhand einer kinetischen Analyse von in *Xenopus*-Oozyten exprimierten funktionellen KCNQ1/KCNQ2-Chimären sollten zunächst die Region und weiterführend einzelne Aminosäurereste identifiziert werden, die für die KCNQ1-Inaktivierung notwendig sind.

Die Inaktivierung von KCNQ1 ist in den deaktivierenden Strömen ("Tailströmen", Schwanzströmen) erkennbar. Nach einem depolarisierenden Puls und einer anschließenden Repolarisierung des Membranpotentials steigen diese Ströme zunächst kurz an, bevor sie abnehmen und sich dem "steady-state" nähern. KCNQ1-Schwanzströme beschreiben also eine Hügelform, was in der Literatur als "hook in the tail" zitiert wird (Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998; Pusch *et al.*, 1998; siehe auch Abbildung III.25D). Diese Eigenschaft ist in ausgeprägterer Form auch für HERG-Kanäle beschrieben (Sanguinetti *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996) und durch eine schnelle Erholung von der Inaktivierung ("recovery", Übergang vom

inaktivierten in den offenen oder aktivierten Zustand) bei einer vielfach langsameren Deaktivierung (Übergang vom offenen in den geschlossenen Zustand) erklärt. Während der Schwanzstrom ansteigt, überwiegt der Übergang der inaktivierten zu den offenen Kanälen, sobald er aber abnimmt, überwiegt der Übergang des offenen in den geschlossenen Zustand des Kanals. Durch die Darstellung des Schwanzstroms durch die Summe zweier exponentieller Funktionen erhält man die jeweiligen Funktionen für die Deaktivierung und die Erholung von der Inaktivierung. Aus dem Verhältnis der Amplituden der beiden Funktionen ($A_{\text{recovery}}/A_{\text{Deaktivierung}}$) kann man den Anteil der inaktivierten Kanäle zum Zeitpunkt des Einsetzens der Repolarisation bestimmen (in %), da die Erholungsreaktion sehr viel schneller als die der Deaktivierung ist (siehe auch Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998; Pusch *et al.*, 1998).

Das Einsetzen der Inaktivierung ("onset") kann durch ein Doppelpulsprotokoll offengelegt werden (Smith *et al.*, 1996; Schönherr und Heinemann, 1996; Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998; siehe Abbildung III.25C). Ein konditionierender 2-s-Puls auf 40 mV wird appliziert, um die Kanäle zu aktivieren und zu inaktivieren, gefolgt von einem hyperpolarisierenden 20-ms-Zwischenpuls, der die Inaktivierung transient aufhebt, ohne dass eine relevante Anzahl von Kanälen in den geschlossenen Zustand übergehen kann. Während des letzten Testpulses auf wiederum 40 mV wird das Einsetzen der Inaktivierung durch eine stark abfallende Stromkurve sichtbar.

Im folgenden wurden sowohl der "hook in the tail" als auch das Einsetzen der Inaktivierung nach Anwendung des Doppelpulsprotokolles als Indiz für die Anwesenheit oder die Abwesenheit der Fähigkeit zu inaktivieren verwendet. Da *Xenopus*-Oozyten einen endogenen KCNQ1-Kanal besitzen, konnten in unserem Expressionssystem nur Mutanten verwendet werden, die sehr gut, also ähnlich stark wie der humane Wild-Typ-KCNQ1 exprimierten, um einen Artefakt durch inaktivierende *Xenopus*-KCNQ1-Kanäle ausschließen zu können.

III.B.1.b Identifizierung der für die Inaktivierung notwendigen Proteinregion

In der Abbildung III.25 sind die beiden Wild-Typ-Kanäle KCNQ1 und KCNQ2 und die wichtigsten Mutanten zur Identifizierung der Inaktivierungsdomäne dargestellt. Die Stromkurven von KCNQ2 zeigten im Gegensatz zu KCNQ1 keinen charakteristischen "hook" im Schwanzstrom und auch kein Einsetzen der Inaktivierung nach Anwendung des Doppelpulsprotokolles. KCNQ2 wurde daher als nicht inaktivierender Kaliumkanal identifiziert. Durch Einführen der KCNQ1-Sequenz S5 bis S6 in KCNQ2 (Q2S5-S6Q1) konnte dem nicht-

Ergebnisse

inaktivierenden KCNQ2-Kanal die Fähigkeit übertragen werden, zu inaktivieren. Das resultierende Konstrukt zeigte auch eine deutlich erkennbare Inaktivierung bei positiven Spannungen, was diese Region für die KCNQ1-Inaktivierung insgesamt notwendig erscheinen ließ.

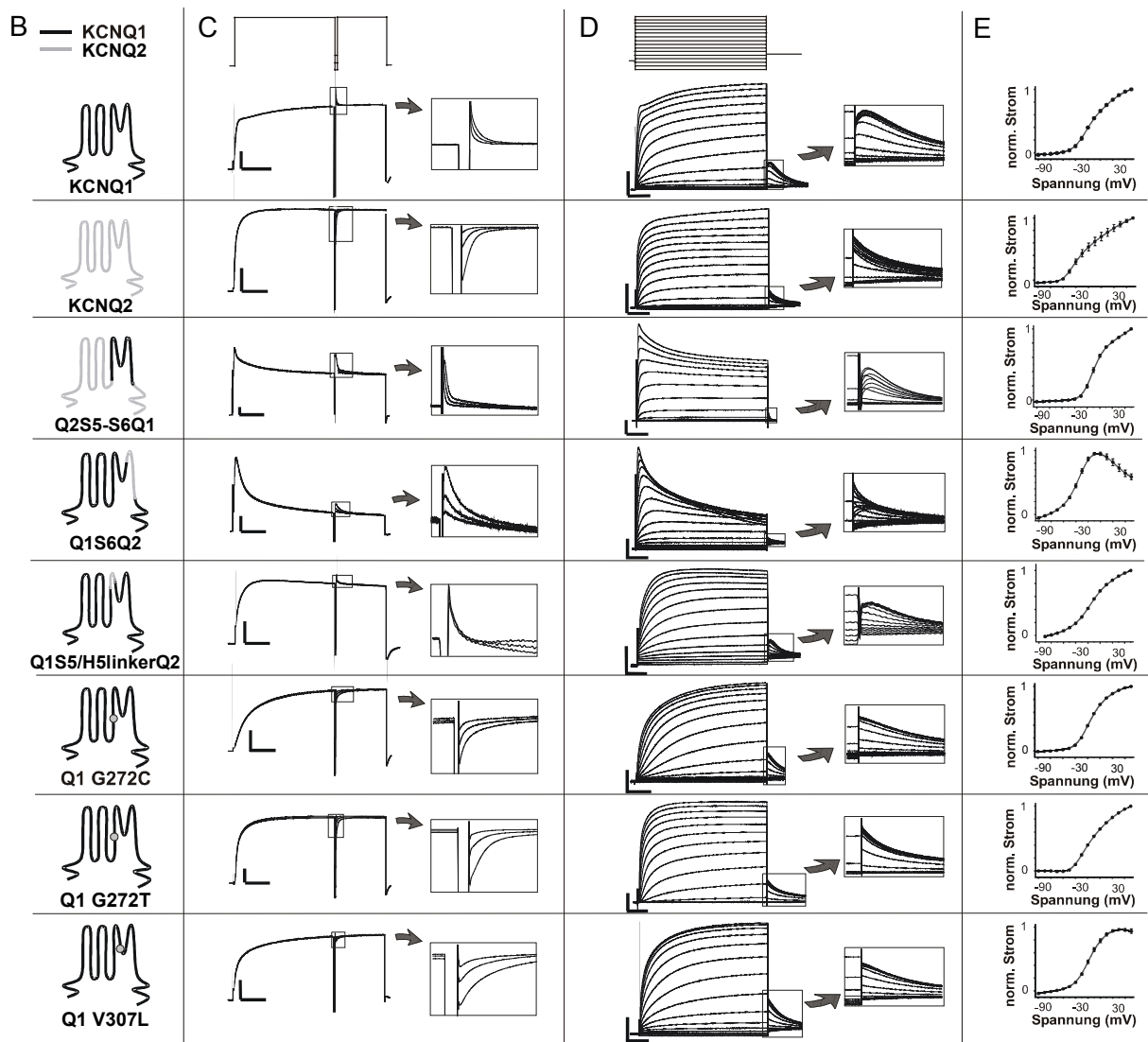
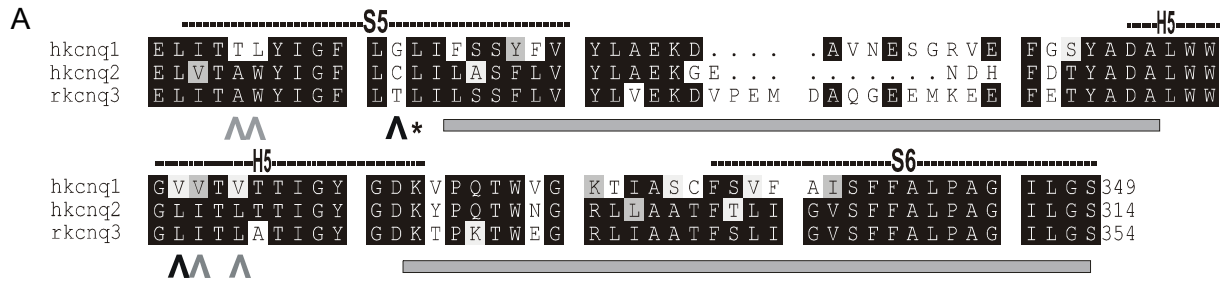


Abbildung III.25: Chimären und Punktmutationen, welche die wichtigen Regionen für die KCNQ1-Inaktivierung beschreiben. **A** zeigt einen Proteinsequenzvergleich von hKCNQ1, hKCNQ2 und rKCNQ3 im Bereich S5 bis S6. Die Transmembranregionen S5 und S6 und die Porenschleife H5 sind durch gestrichelte Linien markiert. Die grauen Balken unter der Sequenz deuten auf KCNQ2-Regionen, welche in einem KCNQ1-Grundgerüst wenig Einfluss auf die Inaktivierung hatten (Q1S6Q2 und Q1S5/H5linkerQ2). Die Unterschiede in der verbleibenden Sequenz zwischen KCNQ1 und

KCNQ2/KCNQ3 sind durch \wedge gekennzeichnet, wobei graue \wedge Aminosäuren ohne Einfluss und schwarze \wedge Aminosäuren mit Einfluss auf die Inaktivierung kennzeichnen (die durch \wedge markierten KCNQ1-Positionen sind 265, 266, 308 und 310 (grau) bzw. 272 und 307 (schwarz)). Der Stern zeigt die Position der LQT1-Mutation L273F, welche eine verstärkte Inaktivierung aufweist. **B** zeigt topologische Skizzen der in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Wild-Typen und Mutanten. Die zugehörigen Ströme sind jeweils rechts davon in einer Reihe abgebildet. **C** zeigt repräsentative Stromkurven von Oozyten, in die die cRNA der Konstrukte aus **B** injiziert wurde. Das beschriebene Doppelpulsprotokoll zeigt nach dem die Inaktivierung aufhebenden Zwischenpuls ein Einsetzen der Inaktivierung (abfallende Stromkurve) oder deren Abwesenheit (ansteigende Stromkurve). Das Haltepotential war -100 mV, der erste konditionierende 2-s-Puls auf 40 mV wurde gefolgt von drei verschiedenen Interpulsen von 20 ms Länge auf -60 , -90 und -120 mV, an die sich der 1-s-Testpuls auf 40 mV anschloss. Es wurde alle 10 s ein Doppelpuls appliziert. Die Fenster sind zur Veranschaulichung des wichtigen Bereichs vergrößert dargestellt. **D** zeigt die entsprechenden Strom-Spannungsbeziehungen aus repräsentativen Oozyten. Das Haltepotential war -100 mV und es wurden alle 10 s in 10 -mV-Inkrementen ansteigende 3-s-Testpulse zwischen -100 und 50 mV appliziert. Die Schwanzströme wurden bei -60 mV aufgenommen. In den vergrößerten Fenstern wird die Anwesenheit oder das Fehlen der Erholung von der Inaktivierung (Hügelform) deutlich. In **E** sind die auf die maximale Amplitude normalisierten Stromamplituden am Ende des Testpulses aus **D** gegen die unterschiedlichen Testpotentiale aufgetragen. Die Anzahl der hierfür verwendeten Experimente war $n = 10-16$. Die horizontalen Balken stehen für ein Zeitintervall von $0,5$ s, die vertikalen Balken stehen für einen Strom von $2 \mu\text{A}$.

Konträr dazu konnten große Bereiche von KCNQ2 in KCNQ1 hineinsubstituiert werden, ohne die Inaktivierung aufzuheben. Die in dem Abschnitt III.A.4 schon beschriebene Chimäre Q1S6Q2 zeigte keinen Verlust der Inaktivierungseigenschaft. Interessanterweise verstärkte die hier anwesende KCNQ2 Sequenz in S6 die Inaktivierung des Wild-Typ-KCNQ1-Kanals, wie wir es auch schon für einzelne Punktmutationen in diesem Bereich beobachtet hatten (I337V und F340Y, siehe Abschnitt III.A.4). Ein anderes chimäres Konstrukt mit der KCNQ2-S5-H5-Schleife in einem KCNQ1-Grundgerüst (Q1S5H5linkerQ2) verhielt sich kinetisch ähnlich zum Wild-Typ-KCNQ1-Kanal und inaktivierte.

Zusammenfassend konnte die S5/H5/S6-Region als für die KCNQ1-Inaktivierung notwendig, und innerhalb dieses Bereichs wiederum die S5-H5 Schleife sowie die H5-S6-Schleife und S6 als nicht notwendig identifiziert werden. Die für die Inaktivierung relevante Region wurde also auf den S5- und den H5- Bereich eingegrenzt.

Die Abbildung III.25A zeigt einen Proteinsequenzvergleich von KCNQ1, KCNQ2 und KCNQ3 in der zuvor beschriebenen Region S5 bis S6. KCNQ3 bildet zusammen mit KCNQ2 funktionelle Heteromere (Wang, Pan *et al.*, 1998), die wir auch als nicht inaktivierend identifizierten (diese Ergebnisse sind hier nicht abgebildet). Homomere KCNQ3-Kanäle zeigten in unseren Experimenten nur eine niedrige Stromamplitude (siehe Abschnitt III.A.1.a), die aus

Ergebnisse

den genannten Gründen (endogener *Xenopus*-KCNQ1) nicht ausreichte, das Vorhandensein oder die Abwesenheit der Inaktivierung zu beurteilen. In dem Sequenzvergleich waren die Regionen interessant, die nicht durch einen grauen Balken unterlegt sind, welcher die Regionen kennzeichnet, die in KCNQ1 ohne Verlust der Inaktivierung substituiert werden konnten.

Tabelle III.3: Aktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten von Wild-Typ-KCNQ1 und mutierten KCNQ1-Kanälen. Die Ströme wurden durch einen 3-s-Puls auf 40 mV aktiviert und anschließend durch einen Spannungssprung auf -60 mV deaktiviert. Die Aktivierungskonstanten wurden durch Anlegen von Exponentialfunktionen an die ansteigenden Ströme während des Aktivierungspulses und die Deaktivierungskonstanten durch Anlegen von Exponentialfunktionen an die depolarisierenden Ströme ermittelt. τ_{fast} stellt jeweils die schnellere Komponente dar, τ_{slow} die langsamere Komponente. Die Anzahl der Experimente ist in Klammern dargestellt.

Zeitkonstanten	WT-KCNQ1	KCNQ1(G272C)	KCNQ1(G272T)	KCNQ1(V307L)
Aktivierung, τ_{fast}	33 ± 3 ms (9)	103 ± 7 ms (9)	41 ± 2 ms (8)	76 ± 4 ms (9)
Aktivierung, τ_{slow}	0,85 ± 0,09 s (9)	0,68 ± 0,05 s (9)	0,27 ± 0,0 s (8)	0,67 ± 0,06 s (9)
Deaktivierung, τ_{fast}	222 ± 2 ms (9)	267 ± 18 ms (9)	238 ± 4 ms (8)	420 ± 30 ms (9)
Deaktivierung, τ_{slow}	1,7 ± 0,4 s (9)	-	6,5 ± 0,1 s (8)	-

Durch zielgerichtete Mutagenese veränderten wir in KCNQ1 die zu KCNQ2 und KCNQ3 differierenden Aminosäuren zu den jeweiligen KCNQ2-Resten. Die funktionelle Expression dieser Mutanten zeigte, dass die Mutationen KCNQ1 TL365/366AW (Doppelmutante), V308I und V310L keinen Verlust der Inaktivierung der veränderten Proteine bewirkten. Zwei einzelne Aminosäuresubstitutionen, G272C und V307L, führten jedoch dazu, dass die Mutanten nicht mehr inaktivierten (siehe Abbildung III.25). Die Mutante G272C, deren Position unmittelbar neben der stark inaktivierenden LQT1-Mutation L273F lokalisiert ist, zeigte zudem eine leicht verlangsamte Aktivierungskinetik (siehe Tabelle III.3). Das eingeführte Cystein könnte möglicherweise zu einer Stabilisierung dieser Mutante durch neu entstandene intramolekulare Disulfidbrücken führen, die die Kanalkinetik verlangsamen oder auch die Inaktivierung aufheben könnten. Daher substituierten wir das Glycin an dieser Position auch durch den entsprechenden KCNQ3-Rest, Threonin. Wie in der Tabelle III.3 erkennbar, zeigte diese Mutante G272T eine Wild-Typ-ähnliche Kinetik, aber eine Inaktivierung war auch hier nicht nachzuweisen. Die andere Schlüsselmutation V307L, die in der Porenhelix lokalisiert ist und die, wie zuvor beschrieben, auch eine verminderte Sensitivität gegen 293B aufwies, zeigte eine leicht verlangsamte Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik verglichen mit dem Wild-Typ-KCNQ1 (siehe Tabelle III.3), aber auch in diesem veränderten Kanal konnte keine Inaktivierung nachgewiesen werden. Die leichten Veränderungen in der Aktivierungskinetik spiegelten sich nicht in einer verschobenen Strom-Spannungsbeziehung wieder (siehe Abbildung III.25, D und E), so dass eine veränderte Strom-Spannungsbeziehung das Fehlen der Inaktivierung nicht erklären konnte. Eine weitere Beobachtung war, dass die nicht

inaktivierenden Mutanten keine oder eine sehr stark verlangsamte langsame Komponente der Deaktivierung zeigten, wie es auch für I_{Ks} -Kanäle typisch ist. Dies deutet auf eine Verbindung zwischen dieser Komponente der Deaktivierung und der Inaktivierung hin.

Durch weitere Mutagenesestudien in der inaktivierenden KCNQ2-Chimäre Q2S5-S6Q1 sollten die bisherigen Ergebnisse unterstützt werden. Analoge Substitutionen von Glycin 272 in S5 und Valin 307 (jeweils KCNQ1-Nummerierung) in H5 durch Cystein bzw. Leucin konnte auch die Inaktivierung in dieser Chimäre aufheben. Es waren nur geringfügige Effekte auf die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik erkennbar (siehe Abbildung III.26).

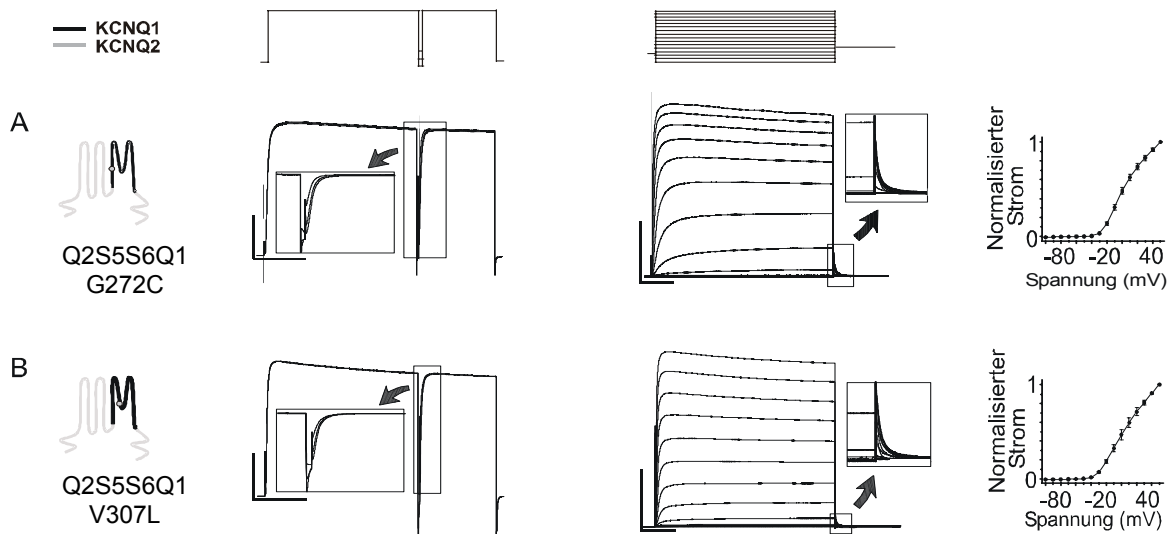


Abbildung III.26: Einfluss der Punktmutationen G272C (A) und V307L (B), die in die inaktivierende Chimäre Q2S5-S6Q1 eingeführt wurden. Die Protokolle und abgebildeten Stromkurven sind analog denen, wie sie in der Abbildung III.25 beschrieben sind. Die Anzahl der für die Strom-Spannungsbeziehung aufgetragenen Experimente war für beide Konstrukte $n = 10$. Die horizontalen Balken stehen für ein Zeitintervall von 0,5 s, die vertikalen Balken stehen für einen Strom von $2 \mu\text{A}$.

In diesem Abschnitt konnten zwei Aminosäuren G272 und V307 in KCNQ1 identifiziert werden, die bei Austausch zu den entsprechenden Aminosäuren in KCNQ2 jeweils einen Verlust der Inaktivierungseigenschaft von KCNQ1-Kanälen verursachten.

III.B.1.c Sensitivität der nicht-inaktivierenden Mutanten gegenüber 293B

Da die Sensitivität der nicht-inaktivierenden KCNQ1-Mutante V307L gegenüber 293B signifikant erniedrigt war, wurde nun die Inhibition durch das Chromanol 293B der beiden

anderen Mutanten G272C und G272T untersucht, um einen möglichen Zusammenhang des 293B-Wirkungsmechanismus und der intrinsischen KCNQ1-Inaktivierung zu prüfen. Beide KCNQ1-Mutanten zeigten sich jedoch in ihrer Sensitivität gegenüber 293B verglichen mit dem Wild-Typ-KCNQ1 nicht verändert [IC_{50} -Werte: $28,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$, $n = 3$ (G272C) und $29,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$, $n = 3$ (G272T)]. Die schwache Sensitivität der KCNQ1-Mutante V307L gegen 293B ist demnach wahrscheinlich nicht auf die nicht vorhandene Inaktivierung zurückzuführen.

III.B.1.d Prüfung der Kompatibilität der Ergebnisse mit dem in dem Abschnitt III.A erstellten Modell

Da ein bereits evaluiertes Modell von KCNQ1 im ersten Teil dieser Arbeit erstellt worden war, war es ein logischer nächster Schritt, die räumliche Anordnung der beiden KCNQ1-Reste G272 und V307 zu überprüfen. In dem Modell war erkennbar, dass sich die Porenhelix von H5 und das Transmembransegment S5 tatsächlich innerhalb einer α -Untereinheit des Kaliumkanalkomplexes kreuzten. Die Aminosäuren V307 und L273 lagen dabei in unmittelbarer Nachbarschaft. L273F ist, wie schon erwähnt, eine LQT1-Mutation, die nach Expression in *Xenopus*-Oozyten eine verstärkte Inaktivierung zeigt (Shalaby *et al.*, 1997). Der geringste Abstand der Seitenketten der beiden Aminosäuren betrug in unserem Modell für jede α -Untereinheit $\sim 3\text{\AA}$. In dem KcsA-Modell waren die analogen Aminosäuren L40 und V70 fast ebensoweit voneinander entfernt ($\sim 4\text{\AA}$, siehe Abbildung III.22 für einen Sequenzvergleich). Dieser geringe Abstand ermöglicht intramolekular attraktive Interaktionen zwischen diesen Aminosäuren. Eine Substitution des Glycins 272 durch eine Aminosäure mit Seitenkette (Cystein oder Threonin) sollte die Konformation der umgebenden S5-Region verändern und könnte die Interaktion der Aminosäuren L273 und V307 aufheben.

III.B.2 Die KCNQ1-Inaktivierung als pathophysiologischer Mechanismus

Im vorherigen Abschnitt wurde die Position der LQT1-Mutation L273F als möglicherweise wichtig für die KCNQ1-Inaktivierung identifiziert. Daher sollte eine pathophysiologische Relevanz der KCNQ1-Inaktivierung anhand dieser Mutation näher untersucht werden, wofür es in der Literatur bisher keine Hinweise gab. Shalaby *et al.* (1997) hatten diese Mutation schon analysiert, nummerierten sie aber fälschlicherweise als L272F. Sie beschrieben eine verstärkte und deutlich erkennbare Inaktivierung von homomeren KCNQ1(L273F)-Kanälen, wie auch eine verringerte Stromamplitude von KCNQ1(L273F)/MinK-Kanälen verglichen mit Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen. Diese verringerte Stromamplitude machten sie für das LQT1-Syndrom des

Patienten verantwortlich. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden homomere KCNQ1(L273F)- und heteromere KCNQ1(L273F)/-MinK-Kanäle exprimiert und ihre Ströme mit denen von Wild-Typ-KCNQ1- und Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen verglichen (siehe Abbildung III.27). Die verstärkte Inaktivierung ist in der Abbildung III.27B erkennbar. Nach einer Analyse der Schwanzströme, wie oben beschrieben, wurden nach einem konditionierenden 3-s-Puls auf 40 mV $86 \pm 3\%$ inaktivierte KCNQ1-(L273F)-Kanäle verglichen zu nur $31 \pm 1\%$ Wild-Typ-Kanälen unter den gleichen Bedingungen errechnet (siehe Abbildung III.27, A und B; Tabelle III.4). Ungefähr 30% inaktivierte Wild-Typ-Kanäle wurde auch zuvor von anderen Arbeitsgruppen bei diesen Protokollen berechnet (Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998; Pusch *et al.*, 1998). Das Einsetzen der Inaktivierung und die Erholung von der Inaktivierung waren auch verglichen zum Wild-Typ signifikant beeinflusst (siehe Tabelle III.4). Nach der Injektion gleicher Mengen cRNA zusammen mit MinK-cRNA beobachteten wir übereinstimmend mit Shalaby *et al.* (1997) eine verminderte Stromamplitude für die I_{Ks} -Ströme der Mutanten (siehe Abbildung III.27, C und D). Die Strom-Spannungs-Beziehung war für die I_{Ks} -Kanalmutanten verglichen mit den Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen nicht verschoben (siehe Abbildung III.27E).

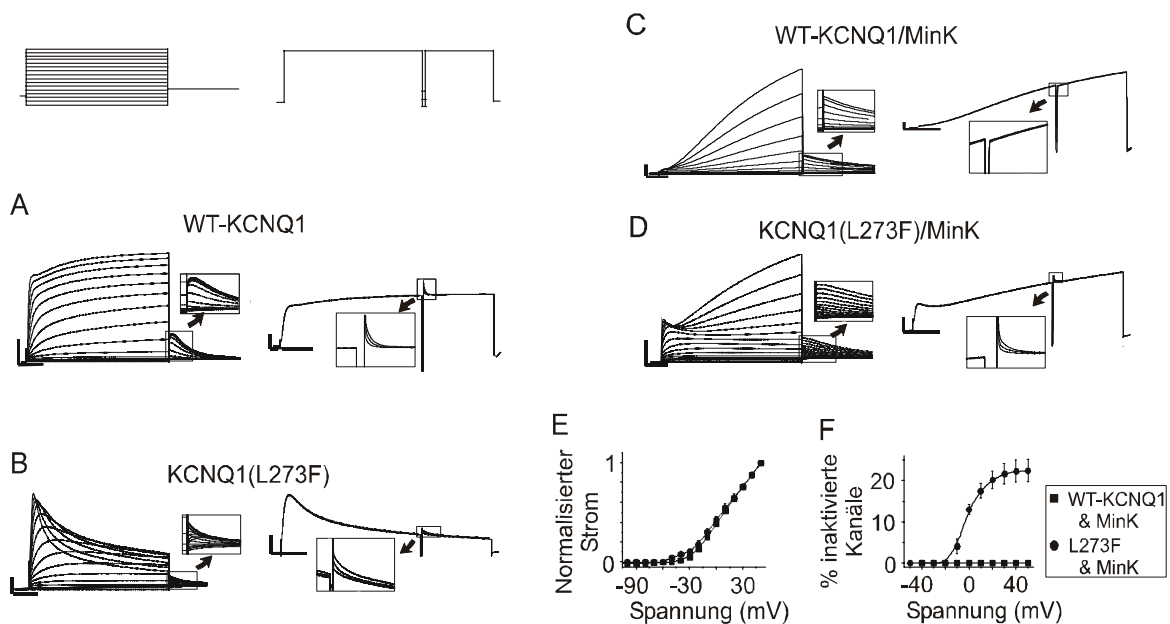


Abbildung III.27: Funktionelle Charakterisierung der LQT1-Mutante L273F in *Xenopus*-Oozyten. **A** zeigt die repräsentativen Ströme aus einer Oozyte, die mit Wild-Typ-KCNQ1-cRNA injiziert wurde, **B** Ströme der KCNQ1-Mutante L273F. In **C** und **D** sind die I_{Ks} -Ströme von Wild-Typ-KCNQ1 und KCNQ1(L273F) abgebildet. Die Protokolle waren entsprechend den Abbildungen III.25, D und C. Die horizontalen Balken stehen für ein Zeitintervall von 0.5 s, die vertikalen Balken für einen Strom von 2 μ A. In **E** sind die Strom-Spannungsbeziehungen von Wild-Typ- I_{Ks} ($n = 17$) und I_{Ks} mit KCNQ1(L273F) ($n = 14$) abgebildet, welche fast identisch sind. In **F** ist die Anzahl inaktiver Kanäle bei unterschiedlichen Testpotentialen aufgetragen. Die Berechnung erfolgte aus den Schwanzströmen nach Anlegung einer doppelt exponentiellen Funktion, wie es im Text beschrieben ist.

Ergebnisse

Äußerst interessant war, dass die verstärkte Inaktivierung in KCNQ1(L273F)-Kanälen durch Koexpression mit MinK nicht mehr vollständig aufzuheben war, was man besonders deutlich am Einsetzen einer Inaktivierung nach Anwendung des Doppelpulsprotokoll erkennen konnte (siehe Abbildung III.27D). Diese Inaktivierung war verlangsamt gegenüber der in KCNQ1(L273F)-Kanälen, was ein weiteres Indiz für eine funktionelle Zusammenlagerung der KCNQ1-Mutante mit dem MinK-Protein darstellte (siehe Tabelle III.4). Die Schwanzströme von KCNQ1(L273F)/MinK-Kanälen zeigten auch eine leichte Hügelform, was eine Persistenz der Inaktivierung in diesen Heteromeren untermauerte. Durch Analyse dieses Hügels konnten wir errechnen, dass mehr als 20% der Kanäle sich nach einem 3-s-Puls auf 40 mV im inaktivierten Zustand befanden (siehe Abbildung III.27F). Diese signifikante Anzahl inaktivierter, also nicht leitender mutierter Kanäle trug offensichtlich zu der beobachteten verringerten Stromamplitude von KCNQ1(L273F)- und KCNQ1(L273F)/MinK-Kanälen im Vergleich mit Wild-Typ-KCNQ1 und Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen bei.

Tabelle III.4: Analyse der Inaktivierung von Wild-Typ-KCNQ1, KCNQ1(L273F), Wild-Typ-KCNQ1/MinK und KCNQ1(L273F)/MinK. τ_{onset} beschreibt die Zeitkonstante für das Einsetzen der Inaktivierung am Beginn des Testpulses des Doppelpulsprotokoll. Sie wurde durch Anlegung einer Exponentialfunktion an die Stromkurve erhalten. Das Zwischenpulspotential war -120 mV. τ_{recovery} beschreibt die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung. Sie wurde aus den Schwanzströmen durch Anlegung einer doppelt exponentiellen Funktion, bei der die langsamere Komponente die Deaktivierung und die schnellere Komponente die Erholung von der Inaktivierung charakterisiert, ermittelt. Hiefür wurden die Schwanzströme bei -60 mV nach einem Testpuls auf 40 mV herangezogen. Der **Anteil inaktivierter Kanäle** wurde aus den Schwanzströmen ermittelt, wie es im Text beschrieben ist. Eine Signifikanz der KCNQ1-Mutante im Vergleich zum Wild-Typ ist durch * gekennzeichnet. Eine Signifikanz der KCNQ1(L273F)/MinK-Kanäle gegenüber homomerer KCNQ1(L273F)-Kanäle ist durch § gekennzeichnet.

	τ_{onset}	τ_{recovery}	Anteil inaktivierter Kanäle
WT-KCNQ1	15 ± 1 ms (n = 12)	45 ± 3 ms (n = 13)	$31 \pm 1\%$ (n = 12)
KCNQ1(L273F)	60 ± 6 ms* (n = 6)	98 ± 5 ms* (n = 6)	$86 \pm 3\%*$ (n = 6)
WT-KCNQ1/MinK	-	-	0
KCNQ1(L273F)/MinK	26 ± 2 ms [§] (n = 8)	111 ± 3 ms (n = 8)	$24 \pm 5\%§$ (n = 12)

In vivo könnte die in I_{Ks} -Kanälen persistierende Inaktivierung den eigentlichen Mechanismus des LQT-Syndroms von Patienten mit der KCNQ1-Mutation L273F darstellen, was dieser speziellen biophysikalischen Eigenschaft eine pathophysiologische Relevanz verleihen würde.

IV Diskussion

In *Xenopus*-Oozyten führt die Expression der Untereinheiten MinK und KCNQ1 zur Ausbildung des I_{Ks} -Kanals, der in seinen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der gleichnamigen kardialen Kaliumleitfähigkeit entspricht (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996). Wir nutzten daher dieses einfach zu Hand habende Expressionssystem, um zwei spezifische Eigenschaften dieses Kanals näher zu charakterisieren: Die Blockade durch die Substanz 293B und die Inaktivierung der α -Untereinheit KCNQ1.

IV.A Die Blockierung von I_{Ks} -Kanälen durch 293B

IV.A.1 Spezifität von 293B

Die Klonierung von KCNQ1 (Wang, Curran *et al.*, 1996) anhand des bekannten genetischen LQT1-Lokus auf dem Chromosom 11 eröffnete neue Möglichkeiten, durch Datenbankanalysesuche verwandte Kaliumkanäle zu identifizieren. Mittlerweile ist eine neue Unterfamilie der KCNQ-Kanäle entstanden, nachdem KCNQ1 zunächst noch als Kv1.9-Kanal bezeichnet worden war. Die neue Familie zählt fünf Mitglieder und diese Anzahl dürfte sich nicht mehr erhöhen, da das menschliche Genom entschlüsselt und in GenBank™ frei verfügbar ist. KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ4 konnten wie das Gründungsmitglied der Familie, KCNQ1, mit einer Erbkrankheit in Verbindung gebracht werden (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Kubisch *et al.*, 1999), was die physiologische Bedeutung dieser Ionenkanäle hervorhebt. Wir konnten (Abschnitt III.A.1.b) das bisher letzte Mitglied, KCNQ5, identifizieren, welches wie KCNQ2 und KCNQ3 durch eine starke zerebrale Expression mit weitgehend identischem Verteilungsmuster zu den beiden bekannten Kanälen charakterisiert war. Durch funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten und Analyse der elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften konnten wir eine Interaktion zwischen KCNQ5 und KCNQ3 nachweisen, wie sie zuvor für KCNQ2 und KCNQ3 (Schroeder *et al.*, 1998; Yang, Levesque *et al.*, 1998) und auch für KCNQ3 und KCNQ4 (Kubisch *et al.*, 1999) gezeigt wurde. KCNQ2 und KCNQ3 wurden als molekulare Determinanten des M-Stroms identifiziert (Wang, Pan *et al.*, 1998), welcher für die Erregbarkeit von Neuronen eine wichtige Rolle spielt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass neben KCNQ2, KCNQ3 und vielleicht KCNQ4 auch KCNQ5 zu diesem physiologisch wichtigen Strom beiträgt. Je nach neuronaler Region könnten sich verschiedene Kombinationen zu dem jeweiligen M-Kanal zusammenlagern.

Aufgrund der hohen Homologie zu KCNQ1 und ihrer wichtigen physiologischen Bedeutung sind alle genannten KCNQ-Kanäle potentielle Ziele von unerwünschten Effekten bei *in-vivo*-Experimenten mit 293B und verwandten Substanzen. Wir zeigten in den Abschnitten III.A.1.a und b, dass 100 μM 293B vernachlässigbare Effekte auf KCNQ2 und KCNQ3 hatte, und einen partiellen Block von KCNQ5 hervorrief. Dagegen wurden KCNQ1 durch 27 μM und KCNQ1/MinK durch 7 μM 293B halbmaximal inhibiert. Unter diesen KCNQ-Kanälen war also eine selektive Wirkung von 293B auf KCNQ1 und I_{Ks} zu beobachten. Die an KCNQ1 und I_{Ks} noch wirksamere, 293B-verwandte Substanz HMR 1556 blockierte bei einer Konzentration von 10 μM KCNQ2 und KCNQ2/3 kaum (zu je $\sim 5\%$) und KCNQ5 zu $\sim 40\%$ (nicht gezeigte Ergebnisse), während KCNQ1- und I_{Ks} -Kanäle im submikromolaren Bereich inhibiert wurden. Hier sei angemerkt, dass uns KCNQ4 nicht zur Verfügung stand.

Weiterhin konnte gezeigt werden (siehe Abschnitt III.A.1.c), dass MinK keinen Einfluss auf die Blockade anderer Kaliumkanäle durch 293B-verwandte Substanzen hatte. Es wurden hierbei HERG und Kv1.5 untersucht, für die es Hinweise auf eine Interaktion mit MinK gab. Dieses Ergebnis war das erste Anzeichen dafür, dass MinK wahrscheinlich nicht unmittelbar der Angriffspunkt von 293B ist.

Da einige I_{Ks} - und KCNQ-Inhibitoren schon klinisch relevant sind oder werden könnten, soll ihre *in-vitro*-Spezifität an dieser Stelle verglichen werden:

- Busch *et al.* (1997) zeigten, dass I_{Ks} -Kanäle durch das Chromanol 293B ~ 7 -fach stärker inhibiert werden als die homomeren KCNQ1-Kanäle. In dieser Arbeit wurden ähnliche Ergebnisse für die verwandten Substanzen HMR 1556, S5557 und S5558 erhalten. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass die Chromanole 293B und HMR 1556 keinen nennenswerten Effekt auf KCNQ2, KCNQ2/3 und KCNQ5 hatten.
- Selnick *et al.* (1997) publizierten ähnliche Ergebnisse für das Benzodiazepin L-735,821, das I_{Ks} -Kanäle stärker inhibierte als KCNQ1. Sie zeigten später auch (Salata *et al.*, 1998), dass ein anderes Benzodiazepin L-364,373 in niedrigen Konzentrationen KCNQ1-Kanäle aktiviert, während dieser agonistische Effekt an I_{Ks} schwächer ausgeprägt war. Ein anderes Benzodiazepin der gleichen Reihe, L-768, identifizierten wir als auf KCNQ2-Kanäle nicht wirksam (Abschnitt III.A.4.f). Zur Blockade anderer KCNQ-Kanäle ist nichts bekannt.
- Die als M-Kanal-Blocker bekannten und als Antidementiva in der klinischen Prüfung sich befindenden Substanzen Linopirdin und XE991 blockieren in ähnlicher Potenz

jeweils KCNQ1, KCNQ2 und KCNQ3 (Wang, Pan *et al.*, 1998). KCNQ4 wurde auch als Linopirdin-sensitiv beschrieben (Kubisch *et al.*, 1999) und nach Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wird KCNQ5 in gleichem Maße wie KCNQ2/KCNQ3 durch Linopirdin inhibiert (Lerche *et al.*, 2000). Der Einfluss von MinK ist bei diesen beiden Substanzen eine Abschwächung der Wirkung. I_{Ks} wird ~15-fach schwächer im Vergleich zu KCNQ1 inhibiert (Wang *et al.*, 2000).

Zu den hier genannten Substanzen sollte noch gesagt werden, dass klinische Daten bisher nur zu Linopirdin veröffentlicht sind. Die Substanz erhöhte die Neurotransmitterausschüttung im ZNS, ohne die Herzfunktion einschließlich des EKG zu beeinflussen (Pieniaszek *et al.*, 1995; Rockwood *et al.*, 1997). Dies bestätigt die möglicherweise gewebspezifische Wirkung der Substanz, wie sie durch die *in-vitro*-Daten angenommen werden konnte. Die als I_{Ks} -Blocker interessanten Substanzklassen der Chromanole und Benzodiazepine zeichnen sich durch ein offensichtlich vergleichbares Wirkungsprofil aus. Es ist aus diesen Betrachtungen heraus wichtig, dass die Untereinheit MinK das Verhalten auch anderer Substanzen gegenüber KCNQ1 stark beeinflusst, wobei die Wirkung abschwächend oder verstärkend sein kann.

IV.A.2 Stereoselektivität von 293B und verwandter I_{Ks} -Blocker

Eine Stereoselektivität von 293B auf I_{Ks} -Kanäle wurde bereits von Suessbrich *et al.* (1996b) und kürzlich auch von Yang *et al.* (2000) beschrieben. In Abschnitt III.A.2. untersuchten wir, inwieweit diese Eigenschaft auch auf andere Substanzen mit der gleichen Leitstruktur übertragbar ist.

Zunächst ist festzuhalten, dass alle untersuchten Chromanole 293B (3R,4S), 293B (3S,4R), HMR 1556 und dessen Enantiomer S5557 eine signifikant stärkere inhibitorische Wirkung auf I_{Ks} -Kanäle hatten als auf KCNQ1-Homomere, wodurch frühere Ergebnisse, die Busch *et al.* (1997) für das razemische 293B ermittelt hatten, gestützt wurden. Loussouarn *et al.* (1997) beobachteten, wie schon gesagt, in COS-Zellen keinen solchen Unterschied für die gleiche Substanz. In dieser Publikation unterschieden sich KCNQ1- und I_{Ks} -Ströme in den COS-Zellen nur marginal. Die Anwesenheit von MinK hatte keinen Effekt auf die Stromamplitude und nur geringen Einfluss auf die Aktivierungskinetik und die Spannungsabhängigkeit der resultierenden Ströme. Barhanin *et al.* (1996) hingegen stellten in COS-Zellen unter Anwendung der gleichen Technik eine ~8-fache Amplitudenvergrößerung des KCNQ1-Stroms nach MinK-Koexpression und deutlich stärkere Effekte auf die Aktivierungskinetik und die

Spannungsabhängigkeit fest. Die Frage bleibt offen, ob unter bestimmten Bedingungen eine KCNQ1/MinK-Interaktion in COS-Zellen weniger ausgeprägt ist.

Die Stereoselektivität der von uns untersuchten Chromanole war gleich. Das 3R,4S-Enantiomer wirkte jeweils sowohl auf I_{Ks} - als auch auf KCNQ1-Kanäle stärker als sein Spiegelbild. Bei den schwächer wirkenden 293B-Diastereomeren wurde dieser Unterschied in Bezug auf I_{Ks} -Kanäle deutlicher sichtbar. Die Differenz der Wirkung von HMR 1556 und S5557 wurde durch die Anwesenheit von MinK nur unwesentlich beeinflusst. Die insgesamt höhere Affinität der beiden Diastereomeren mit der Trifluorbutoxygruppe (20-40-fach potenter als die entsprechenden 293B-Diastereomeren) scheint durch den Substituenten in Position 6 zu kommen und der Einfluss der räumlichen Anordnung der Substituenten an den Positionen 3 und 4 ist dadurch weniger relevant geworden (Abbildung III.9).

Die beiden zueinander spiegelbildlichen Chromane S5558 (4S) und S5559 (4R) blockierten KCNQ1-Kanäle etwa äquipotent (siehe Abbildung III.12). Durch MinK-Koexpression wurde aber nur das 4S-Enantiomer in seiner inhibitorischen Wirkung deutlich stärker (> Faktor 100). Hier entstand eine Stereoselektivität erst durch die MinK-Anwesenheit. Die räumliche Orientierung des Methylacetatrests am Stickstoff der Sulfonamidgruppe ist offenbar von entscheidender Bedeutung für die hohe Wirksamkeit (~20 nM) von S5558 auf I_{Ks} -Kanäle.

Der MinK-Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften von Chromanolen und Chromanen an KCNQ1-Kanälen ist immer eine Wirkungsverstärkung, die mehr oder weniger intensiv ausfallen kann und meist stereospezifisch ist. Nach diesen Resultaten konnte eine direkte Beteiligung der Untereinheit MinK an einer Chromanolbindungsstelle des I_{Ks} -Kanals nicht ausgeschlossen werden.

IV.A.3 Ist MinK an einer Bindungsstelle von 293B beteiligt?

Um zu klären, ob MinK unmittelbar an der Bildung einer Bindungsstelle von 293B beteiligt ist oder nicht, exprimierten wir eine Reihe von MinK-Mutanten entweder mit der humanen oder mit der endogenen *Xenopus*-KCNQ1-Untereinheit. Im wesentlichen traten dabei vier Auffälligkeiten hervor.

- Alle I_{Ks} -Mutanten wurden signifikant stärker inhibiert als homomere KCNQ1-Kanäle. Dass die Koexpression aller veränderter MinK-Proteine eine Erhöhung der Affinität von 293B zur Folge hatte, deutet nicht auf eine direkte Beteiligung von MinK an der Ausbildung einer Bindetasche hin. Eine hohe Affinität einer Substanz an einen

Ionenkanal wird durch Punktmutationen an der Bindungsstelle häufig herabgesetzt, aber selten erhöht. Als Beispiele seien drei Literaturzitate aus jüngster Zeit genannt (Diltiazem an L-Typ-Kalziumkanälen, Kraus *et al.*, 1998; Phenylalkylamine an L-Typ-Kalziumkanälen, Hockermann *et al.*, 1997; Dofetilid an HERG-Kanälen, Lees-Miller *et al.*, 2000).

- Die veränderten I_{Ks} -Kanäle zeigten eine höchstens 2,3-fach erniedrigte Affinität verglichen mit den Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen. Auch dieser Vergleich liefert keine Hinweise auf eine molekulare Beteiligung von MinK an einer Bindungsstelle für 293B. Man kann die gleichen Literaturstellen wie oben anführen und weiterhin die Ergebnisse der KCNQ1-Mutagenese in dieser Arbeit zur Hand nehmen. Durch Veränderungen der molekularen Determinante erreicht man meist Affinitätsverluste zwischen dem Faktor 10 und 100. Es ist aber natürlich nicht auszuschließen, dass konservative Substitutionen wie z.B. T59C keinen besonderen Einfluss auf die Veränderung einer Bindetasche haben.
- Drei Mutanten ($\Delta 39-43$, Y47C und $\Delta 73-129$) zeigten eine gering, aber signifikant verminderte Sensitivität gegenüber 293B verglichen mit I_{Ks} -Kanälen mit Wild-Typ-MinK-Untereinheiten. Die Deletionsmutanten $\Delta 39-43$ und $\Delta 73-129$ aktivierten dabei leicht verändert, wie es schon zuvor beschrieben worden war (Abitbol *et al.*, 1999). Die Expression der Mutante Y47C in Oozyten erzeugte zwar die langsamen, I_{Ks} -typischen Ströme, jedoch auch mit deutlich veränderter Aktivierungskinetik, wie es von Wang, Tai und Goldstein (1996) berichtet worden war. Es ist nicht auszuschließen, dass die allen drei Mutanten zugrundeliegende schnellere Aktivierungskinetik einen Einfluss auf das Ausmaß der Inhibition durch 293B hatte. Dass alle drei Mutanten dieses Phänomen zeigten, unterstützt die These.
- Des weiteren gab es eine Region (Aminosäuren 63 bis 68), in der gehäuft geringe Veränderungen der Sensitivität gegenüber 293B auftraten. Diese Mutanten zeigten eine dem Wild-Typ identische Kinetik. Hier scheint es denkbar, dass die Mutationen einen Einfluss auf die Konformationsänderung haben, die möglicherweise durch MinK am KCNQ1-Kanal hervorgerufen wird.

IV.A.4 Molekulare Determinanten der Affinität von 293B an KCNQ1

Im Abschnitt III.A.4 identifizierten wir zunächst in einem Chimärenansatz die innere Pore von KCNQ1 als die offensichtliche Bindungsstelle des razemischen Chromanols 293B. Nach Sequenzvergleich in dieser Region zwischen dem sensitiven KCNQ1- und dem nicht-sensitiven KCNQ2-Kanal fanden wir Reste in KCNQ1, welche durch den Austausch mit der entsprechenden KCNQ2-Aminosäure die Affinität von 293B stark herabsetzten (KCNQ1-Positionen I337 und V307). In einem Homologiemodellierungsansatz erstellten wir ein Modell der Porenregion von KCNQ1, aus dem wir weitere Hinweise für die Bindungsstelle erhielten. Ein Rest (F340), der in dem ersten Ansatz nicht erfasst werden konnte, da er in KCNQ1 und KCNQ2 übereinstimmte, scheint wie auch das Isoleucin 337 in die innere Porenregion gerichtet. Das Chromanol 293B konnte in das Modell so hineingelegt werden, dass es mit diesen beiden Resten aller vier α -Untereinheiten interagiert. Um einen generellen Einfluss dieses Teils von S6 auf die Affinität des Chromanols zu untersuchen, führten wir hier weitere Mutationen ein. Veränderungen der KCNQ1-Reste 335 bis 340 setzten alle die Affinität von 293B stark herab, bewirkten aber auch eine verstärkte Inaktivierung der KCNQ1-Mutanten. 293B hat zu KCNQ1 im inaktivierten Zustand wahrscheinlich keine Affinität (Seebohm *et al.*, 2000). Nach Koexpression mit MinK verhielten sich diese KCNQ1-Mutanten kinetisch wieder sehr ähnlich wie der Wild-Typ- I_{Ks} . Diese KCNQ1-MinK-Kanäle waren daher eher geeignet, einen tatsächlichen Einfluss der durch die KCNQ1-Mutation erfolgten räumlichen Veränderung auf die Affinität von 293B nachzuweisen. So zeigten sich nach der Koexpression mit MinK auch nur noch die KCNQ1-Mutanten A336T, I337V, F340Y und bedingt F339Y in ihrer Affinität von 293B stark beeinflusst. Die Positionen 336 und 339 liegen dabei direkt benachbart zu den ins Lumen der Pore gerichteten Resten I337 und F340. Durch ihre veränderte Seitenkette sollten Konformationsänderungen der gesamten Umgebung hervorgerufen werden, die auch ihre benachbarten Aminosäuren einschließen können.

Die Aminosäuren, die wir in der Porenhelix in H5 als schwächer sensitiv gegenüber 293B identifizierten (V307 und V310L), sind nach unserem Modell nicht in das Lumen der inneren Pore gerichtet. Auch in dem KcsA-Modell von Doyle *et al.* (1998) sind die analogen Reste nicht in das Poreninnere gerichtet, sondern stabilisieren den Selektivitätsfilter. Veränderungen in dieser zentralen Region des Kanals können die Konformation des Kanalproteins stark verändern. Dass die KCNQ1(V307L)-Mutanten nicht mehr inaktivieren können (siehe Abschnitt III.2), spricht auch für diese These. Die Mutationen in diesem Bereich haben daher wahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf die Interaktion mit 293B. Die KCNQ1-Position 311, die nach dem Modell in das Innere der Pore gerichtet ist und an einer Interaktion beteiligt sein

könnte, zeigte sich in unseren Versuchen nicht relevant für die Affinität von 293B. Dabei ist zu berücksichtigen, dass wir das Threonin an dieser Stelle nur durch das kleinere, aber dem Threonin sehr ähnliche Serin ersetzen konnten, um eine funktionelle Mutante zu erhalten. Diese kleinere Veränderung hat möglicherweise keinen Einfluss auf die Interaktion mit 293B. Auch die Affinität von der Substanz HMR 1556 wurde durch diese Mutation nicht beeinflusst. Interessanterweise wäre nach dem Modell die Trifluorbutoxygruppe dieser Substanz zu der Seitenkette des Threonin 311 hin ausgerichtet. Aber auch dieser im Vergleich zu der analogen Cyanogruppe von 293B größere Rest scheint noch keine Interaktion mit dem Threonin auszubilden.

Da es nicht gelang, die Sensitivität gegenüber 293B in KCNQ2 deutlich zu erhöhen (siehe Abschnitt II.A.1.c), sollen die Unterschiede von KCNQ1 und KCNQ2 kurz abschließend betrachtet werden. KCNQ2 war zwar mit den beiden KCNQ1-Resten in H5 und S6 (KCNQ1: Valin 307 und Isoleucin 337) empfindlicher gegenüber 293B als der Wild-Typ-KCNQ2, doch obwohl die dritte "wichtige" Determinante, das Phenylalanin in S6, endogen vorhanden ist, wurde die KCNQ1-Sensitivität nicht erreicht. Es liegt nahe, dass die "unwichtigen", aber zu KCNQ1 unterschiedlichen Aminosäuren in KCNQ2 (KCNQ1-Positionen 326/327 und 330/331) die Konformation des Kanals so beeinflussen, dass die beiden Poren von KCNQ1 und KCNQ2 sich erheblich unterscheiden. Das wird durch den Versuch unterstützt, dass man durch Austausch der Gesamtporenregion in KCNQ2 durch den entsprechenden Proteinteil von KCNQ1 eine Chimäre mit einer deutlich größeren Sensitivität gegenüber 293B erhielt verglichen mit dem Wild-Typ-KCNQ2. In diesem Protein scheint sich die KCNQ1-Pore ähnlich zu falten wie im Wild-Typ-KCNQ1.

In der jüngsten Vergangenheit wurde die innere Porenregion als Zielstruktur mehrerer Kanalinhhibitoren identifiziert. L-Typ-Kalziumkanäle sind wie Kaliumkanäle aus vier α -Untereinheiten aufgebaut, die aber durch Aminosäureketten miteinander verbunden sind. In dem Transmembransegment S6 der dritten Untereinheit konnten auch aromatische Phenylalaninreste identifiziert werden, die eine hohe Affinität für Benzothiazepine (z.B. Diltiazem) und Phenylalkylamine determinieren (Kraus *et al.*, 1998; Hockermann *et al.*, 1997). Man nimmt an, dass diese Reste auch in die innere Pore gerichtet sind. Lees-Miller *et al.* (2000) zeigten kürzlich, dass die Dofetilid- und die Chinidin-Inhibition von HERG-Kanälen durch Mutation eines Phenylalaninrests in S6 drastisch herabgesetzt wird. In der bisher detailliertesten Studie seiner Art zeigten Mitcheson *et al.* (2000), dass die Bindungsstelle eines Dofetilid verwandten Methansulfonanilids (MK-499) sich entlang der inneren Pore erstreckt. Sie identifizierten dabei in das Lumen gerichtete Reste in H5 und S6, wobei das von Lees-Miller *et al.* (2000) identifizierte Phenylalanin eine der Determinanten darstellte. Weiterhin wurde ein

Tyrosin als notwendig für eine hohe Substanzaffinität identifiziert. Dieses Tyrosin entspricht nach dem Sequenzvergleich von Doyle *et al.* (1998) dem Phenylalanin 340 in KCNQ1. Unsere Ergebnisse für 293B und den I_{KS} -Kanal werden daher durch analoge Ergebnisse für andere Kanalinhhibitoren unterstützt.

Auf der einen Seite identifizierten wir die innere Pore von KCNQ1 als die Zielstruktur für das Chromanol 293B, auf der anderen Seite konnten wir aber keine direkte Beteiligung von MinK an einer 293B-Interaktion zeigen. Dieses Ergebnis ist interessant bezüglich der molekularen Struktur des I_{KS} -Kanals. Tai und Goldstein (1998) sowie Wang, Tai und Goldstein (1996) postulierten, dass das MinK-Protein an der Ausbildung der Pore des I_{KS} -Kanals beteiligt ist. Unsere Ergebnisse unterstützen dieses Modell nicht. Die innere Pore von KCNQ1 wird nach unseren Ergebnissen wahrscheinlich nicht von MinK durchzogen. Andernfalls wäre anzunehmen, dass Mutationen in MinK auch die Pharmakologie von 293B drastisch verändern, wie es in der vorliegenden Arbeit für KCNQ1 zeigen konnten. Tai und Goldstein (1998) postulierten, dass die Aminosäure 57 in dem MinK-Protein von innen an den Selektivitätsfilter angrenzt. Das hieße, dass die Aminosäuren 58ff. in die innere Pore gerichtet sein sollten. Das wurde durch unsere Studie nicht gestützt. Wir finden erst ab den Aminosäuren 63ff. leichte Veränderungen, die aber so wenig ausgeprägt sind, dass man einen allosterischen Mechanismus der Konformationsänderung der inneren Pore annehmen kann.

Ein nur am Rande erwähntes Ergebnis sei hier noch kurz diskutiert. Nach Koexpression der Chimäre Q1tailQ2 (siehe Abbildung III.17) mit der Untereinheit MinK konnten in den Oozyten zwar die typischen I_{KS} -Ströme erzeugt werden, eine Amplitudenerhöhung der Ströme gegenüber denen homomerer Q1tailQ2-Kanäle war aber nicht zu beobachten. Diese Amplitudenerhöhung wurde als 4- bis 20-fach beschrieben (Barhanin *et al.*, 1997; Sanguinetti *et al.*, 1996). Der C-Terminus von KCNQ-Kanälen enthält eine hochkonservierte Region (siehe Abbildung III.3), die in die Zusammenlagerung der α -Untereinheiten involviert zu sein scheint (Schmitt *et al.*, 2000). Es ist eine interessante Beobachtung, dass auch die MinK-Interaktion bei Substitution dieser Region teilweise gestört ist.

IV.B Die KCNQ1-Inaktivierung

Die Inaktivierung von KCNQ1-Kanälen konnte im Abschnitt III.B erstmals molekular beschrieben werden. Es wurden drei Aminosäurereste identifiziert, die für die KCNQ1-Inaktivierung wahrscheinlich von Bedeutung sind. Sie waren in der Transmembranregion S5 (KCNQ1 Positionen 272 und 273) und in der Porenschleife H5 (genauer in der Helix dieser

Schleife an Position 307) lokalisiert. Da der Inaktivierungsmechanismus der klassischen N- und C-Typ-Inaktivierungen in *ShakerB*-Kaliumkanälen gut verstanden und sehr intensiv untersucht worden ist, war es interessant, unsere neuen Erkenntnisse über die KCNQ1-Inaktivierung mit diesen beiden Inaktivierungstypen zu vergleichen.

Die schnelle N-Typ-Inaktivierung wurde durch ein sehr anschauliches Modell erklärt, bei dem eine "Ball"-bildende Domäne an seinen Rezeptor in der Pore bindet, wodurch der Ionendurchfluss von der intrazellulären Seite her blockiert wird (Armstrong und Bezanilla, 1977; Zagotta *et al.*, 1990; Hoshi *et al.*, 1990; Rettig *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996). Der Ball wird hierbei entweder durch den N-Terminus der α -Untereinheit oder durch eine β -Untereinheit gebildet. Diese Porenokklusion geschieht unabhängig vom Membranpotential. Die KCNQ1-Inaktivierung zeigt dagegen eine Spannungsabhängigkeit (Pusch *et al.*, 1998; Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998) und weist weiterhin keine *Shaker*-ähnliche Ballstruktur auf. Der Unterschied der KCNQ1-Inaktivierung zur N-Typ-Inaktivierung wird durch unsere Resultate verstärkt. Die KCNQ1-Reste an den Positionen 272, 273 und 307 können als nicht zugänglich für eine komplexe Ballstruktur betrachtet werden, da sie in der innersten Pore lokalisiert und nicht dem Lumen zugewandt sind. Sie können daher keine mögliche Rezeptorstelle eines sich von intrazellulär nähernden Inaktivierungsballes darstellen.

Die langsame C-Typ-Inaktivierung unterliegt Konformationsänderungen in der äußeren Pore. Dies wird durch die Abhängigkeit der Inaktivierung von extrazellulärem Kalium und TEA verdeutlicht (Lopez-Barneo *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1991). KCNQ1 ist nur schwach sensitiv gegenüber TEA, weshalb die Abhängigkeit der Inaktivierung davon nicht bestimmt werden kann (Pusch *et al.*, 1998; Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998; Hadley *et al.*, 2000). Eine solche Abhängigkeit von extrazellulärem Kalium wurde jedoch nicht für die KCNQ1-Inaktivierung gezeigt, was diese Inaktivierungsform von dem C-Typ-Mechanismus unterscheidet. Andererseits bewirken bestimmte Mutationen innerhalb der Porenschleife H5 und dem S6-Segment in *Shaker*-ähnlichen Kaliumkanälen eine Veränderung der Inaktivierungskinetik (Lopez-Barneo *et al.*, 1993; Hoshi *et al.*, 1991). Sequenzaustausch und Punktmutationen in dieser Region beeinflussten auch in der vorliegenden KCNQ1-Studie die Inaktivierung (Q1S6Q2, Abbildung III.25; F340Y, Abbildung III.23; I337V, Abbildung III.19). Die für die KCNQ1-Inaktivierung als essentiell identifizierten Aminosäuren in der Porenhelix von H5 und in S5 sind bisher jedoch nicht als relevant für die C-Typ-Inaktivierung beschrieben worden. Zusammenfassend kann man festhalten, dass beide Formen der Inaktivierung, C- und KCNQ1-Typ, sich innerhalb der Porenregion S5 bis S6 ereignen, doch die identifizierten kritischen Aminosäurereste scheinen sich im Detail zu unterscheiden.

IV.C Das 3D-Modell von KCNQ1

Unser durch Homologiemodellierung gewonnenes KCNQ1-Modell konnte gut an das KcsA-Modell von Doyle *et al.* (1998) angeglichen werden. Sowohl die Ausrichtung der Seitenketten als auch die Gesamtanordnung der Helices ist sehr ähnlich. In der Abbildung IV.1 ist das Modell mit den wichtigen Resten nochmals als Gesamtbild dargestellt. Ein Modell auf Basis des Homologiemodellierens kann nur eine vorläufige Struktur wiedergeben. Da es uns aber gelang, durch weitere Mutagenese die Bindungsstelle von 293B zu evaluieren und wir auch für den Inaktivierungsmechanismus wichtige Erkenntnisse aus dem Modell gewinnen konnten, scheint das KCNQ1-Modell wichtige Hinweise für die Struktur des Kanals liefern zu können. Es ist das erste evaluierte Modell für die KCNQ1-Porenstruktur. Es stellt sich natürlich die Frage, ob die abgebildete Struktur auch die des I_{Ks} -Kanals wiedergibt. Wie später in Abschnitt IV.D.2 diskutiert wird, stört MinK möglicherweise eine für die Inaktivierung wichtige H5/S5-Interaktion. Es führt zu weit, MinK in dieses Modell integrieren zu wollen, aber es scheint äußerst unwahrscheinlich, dass dieses Protein in irgendeiner Weise in der KCNQ1-Pore Platz finden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf einen allosterischen Modulationsmechanismus von MinK im kardialen I_{Ks} -Kanal.

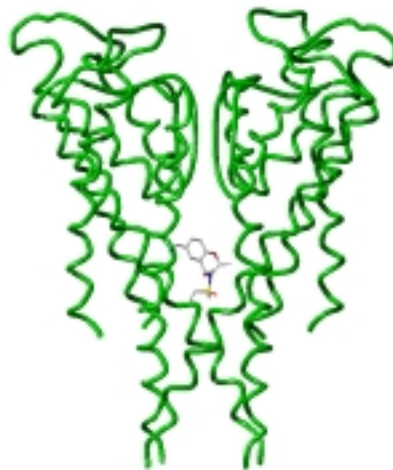


Abbildung IV.1: 3D-Modell des KCNQ1-Kanals. **Oben** ist das Gesamtmodell der S5/H5/S6-Porenregion mit vier sich aneinanderlagernden Untereinheiten abgebildet. Rote Proteinteile geben Helices im Kanal wieder, gelbe Bereiche stellen β -Faltblattstrukturen dar. Die für die Inaktivierung und die Inhibition durch 293B wichtigen Aminosäurereste sind auch mit Seitenketten dargestellt und nummeriert. **Unten** ist das Gesamtmodell abgebildet mit 293B an seiner putativen Bindungsstelle.

IV.D *In-vivo-Relevanz der Ergebnisse*

IV.D.1 **Relevanz der Ergebnisse für die Entwicklung neuartiger Antiarrhythmika**

I_{Ks} -Kanäle sind durch das Chromanol 293B potent zu inhibieren (Suessbrich *et al.*, 1996b; Busch *et al.*, 1996b). Im Abschnitt III.A konnten wir die Spezifität, die Stereoselektivität und das genaue molekulare Ziel dieser Inhibition detailliert definieren. Ein Interesse an diesen Ergebnissen entstand aus der Vermutung, dass durch I_{Ks} -Inhibitoren eine effektive antiarrhythmische Wirkung erzielt werden kann. Diese Annahme beruht darauf, dass sich bei hoher Herzfrequenz und β -adrenergem Tonus der Anteil der I_{Ks} -Leitfähigkeit an der Repolarisation der Membran auf Kosten der I_{Kr} -Leitfähigkeit bei Ablauf eines Aktionspotentials vergrößert (Sanguinetti und Jurkiewicz, 1990; Jurkiewicz und Sanguinetti, 1993). Unter solchen Stress-Bedingungen ist das ventrikuläre Aktionspotential verkürzt, und es sind beste Voraussetzungen für maligne ventrikuläre Tachyarrhythmien gegeben (Schreieck *et al.*, 1997). In der Tat konnten Schreieck *et al.* (1997) in isolierten Kaninchenherzen zeigen, dass eine Aktionspotentialverlängerung durch 293B unter Isoproterenolbehandlung noch verstärkt ist. I_{Kr} -Blocker sind wegen der verminderten I_{Kr} -Leitfähigkeit unter diesen Bedingungen weniger potent und wirken oft selbst proarrhythmisch [z.B. Sotalol, Singh (1992); aber auch die HERG-blockierenden Antihistaminika Terfenadin und Astemizol, Suessbrich *et al.* (1996a)]. Es sei hier nochmals erwähnt, dass die I_{Kr} -Leitfähigkeit im wesentlichen durch den HERG-Kanal bedingt ist (Sanguinetti *et al.*, 1995). Aus den genannten Gründen stellt die I_{Ks} -Blockade einen vielversprechenden Ansatz dar. Weiterhin ist bisher kein Arzneimittel bekannt, welches durch alleinige I_{Ks} -Blockade eine unerwünschte kardiale Nebenwirkung hervorruft. Dagegen gibt es unzählige Beispiele für HERG-blockierende Substanzen, die ein erworbenes LQT-Syndrom und Torsades-de-pointes auslösen können (als Beispiele seien hier wieder die Antihistaminika Terfenadin und Astemizol sowie das Neuroleptikum Haloperidol genannt, Monahan *et al.*, 1990; Simons *et al.*, 1988; Fayer, 1986). Die vorliegenden Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung neuer Antiarrhythmika, da sie die Spezifität und das Vorhandensein einer Stereoselektivität der Chromane/Chromanole verdeutlichen und eine Computer-gestützte 3D-Entwicklung neuer und potenterer Substanzen ermöglichen.

IV.D.2 Physiologische Relevanz der Ergebnisse der Inaktivierungsstudie

Durch die Analyse unseres 3D-KCNQ1-Modells (Abbildung III.22) postulierten wir eine Interaktion der Porenhelix in H5 mit der S5-Helix, die möglicherweise dem Inaktivierungsmechanismus zugrunde liegt. MinK hebt die Inaktivierung des KCNQ1-Wild-Typs auf (Pusch *et al.*, 1998; Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998). In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass dies bei der verstärkt inaktivierenden KCNQ1-Mutante L273F nicht mehr der Fall ist. Deshalb kann man spekulieren, dass MinK die H5/S5-Interaktion aufhebt. Die Interaktion zwischen dem im Vergleich zu dem natürlich codierten Leucin größeren Phenylalanin (an Position 273) und H5 könnte hierbei so stark sein, dass sie auch durch MinK-Interaktion nicht mehr aufgehoben werden kann.

Da I_{Ks} -Kanäle, die in der α -Untereinheit die LQT1-Mutation L273F tragen, im Gegensatz zu Wild-Typ- I_{Ks} -Kanälen inaktivierten, resultierte auch eine pathophysiologische Bedeutung der KCNQ1-Inaktivierung aus unseren Ergebnissen. I_{Ks} -Kanäle mit der LQT1-Mutation haben eine verringerte Stromamplitude (Shalaby *et al.*, 1997), was durch die signifikante Anzahl inaktivierter Kanäle erklärt werden konnte. Dies sollte auch eine verminderte I_{Ks} -Leitfähigkeit im Herzen zur Folge haben und somit einen Beitrag zum LQT-Syndrom leisten.

Für die schnelle Inaktivierung in Natriumkanälen konnte gezeigt werden, dass sie bei einigen Erbkrankheiten Relevanz besitzt. Durch Mutationen in kardialen Natriumkanälen (LQT3-Syndrom) wird die Inaktivierung ebenso aufgehoben (Bennett *et al.*, 1995) wie durch Mutationen in muskulären Natriumkanälen bei einer genetisch bedingten Myotonieform (Lerche H. *et al.*, 1993). Eine physiologische Bedeutung der KCNQ1-Inaktivierung konnte dagegen bisher nicht gezeigt werden (Pusch *et al.*, 1998; Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998). Sie konnte aufgrund ihrer Abwesenheit in den physiologisch vorliegenden I_{Ks} -Kanälen auch nicht angenommen werden. Unsere Ergebnisse suggerieren jedoch einen wichtigen Einfluss der KCNQ1-Inaktivierung auf die Stromamplitude von I_{Ks} -Kanälen. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Stromamplitude von I_{Ks} -Kanälen umso größer ist, je mehr die KCNQ1-Inaktivierung durch MinK aufgehoben ist. Wang, Xia und Kass (1998) zeigten mithilfe von Fusionsproteinen, dass der I_{Ks} -Kanal eine offensichtlich variable Stöchiometrie besitzt. Früher schon wurde eine zunehmende Stromamplitude des I_{Ks} -Stroms bei steigendem Anteil der MinK-Untereinheiten nachgewiesen (Cui *et al.*, 1994; Blumenthal und Kaczmarek, 1994). Eine Regulation der MinK-Expression in Geweben könnte auch das Ausmaß des I_{Ks} -Stroms regulieren. Diese These ist schon früher diskutiert worden (z.B. Romey *et al.*, 1997). Es gibt aber bisher nur einen Hinweis darauf, wie die Amplitudenvergrößerung (mindestens 4-fach,

Romey *et al.* (1997); bis zu 20-fach, eigene Beobachtungen) der I_{Ks} -Kanäle verglichen zu homomeren KCNQ1-Kanälen zustande kommt. Parallel zeigten nämlich Yang und Sigworth (1998) und Pusch (1998), dass I_{Ks} -Kanäle eine ca. dreifach erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit verglichen mit KCNQ1-Kanälen besitzen. Unsere Ergebnisse stellen somit einen weiteren Baustein in der Aufklärung der komplexen und immer noch in vielerlei Hinsicht ungeklärten KCNQ1/MinK-Interaktion dar.

V Zusammenfassung

Das Chromanol 293B stellt die Leitsubstanz einer möglicherweise neuen Kategorie von Klasse-III-Antiarrhythmika dar. Im Herzen inhibiert es potent und spezifisch den Kaliumkanal I_{Ks} , der an der Repolarisation der Membran bei Ablauf eines Aktionspotentials beteiligt ist. Er ist aus der α -Untereinheit KCNQ1 und der β -Untereinheit MinK aufgebaut. Es bestehen deutliche biophysikalische Unterschiede zwischen den Strömen homomerer KCNQ1- und heteromerer I_{Ks} (KCNQ1/MinK)-Kanäle. Die Koexpression mit MinK verändert aber auch die Pharmakologie von KCNQ1. In der vorliegenden Arbeit trugen zwei unabhängige Lösungsansätze dazu bei, die Interaktion der beiden Untereinheiten molekular besser zu verstehen. Dabei wurden als Methoden die zielgerichtete Mutagenese, die Expression der Wild-Typ-Proteine und der Mutanten in *Xenopus*-Oozyten und deren elektrophysiologische Analyse angewendet. Im ersten Teil wurde die Bindungsstelle des I_{Ks} -Inhibitors 293B molekular identifiziert, während im zweiten Teil der Mechanismus der Inaktivierung der α -Untereinheit KCNQ1 untersucht wurde. In den beiden Ansätzen wurde ausgenutzt, dass die zu KCNQ1 eng verwandten KCNQ2-Kanäle weder sensitiv gegenüber 293B waren noch eine Inaktivierung zeigten.

Die Expression von MinK-Mutanten, die alle veränderbaren Regionen des Proteins abdeckten, ergab, dass keine dieser Mutationen die Affinität des I_{Ks} -Kanals gegenüber 293B wesentlich beeinflusste. Das war erstaunlich, da homomere KCNQ1-Kanäle durch das Chromanol 293B um den Faktor 4-5 schwächer zu blockieren sind als I_{Ks} -Kanäle und da zusätzlich gezeigt wurde, dass sich auch das Ausmaß der Stereoselektivität von 293B und anderer verwandter I_{Ks} -Inhibitoren in Bezug auf KCNQ1 und I_{Ks} stark unterscheidet. Es konnte aus den Ergebnissen indirekt vermutet werden, dass MinK offensichtlich auf allosterische Art die Affinität des Inhibitors erhöht.

Um einen Hinweis auf die I_{Ks} -Spezifität des Blocks durch 293B auch innerhalb der KCNQ-Familie zu erhalten, wurde zunächst die Inhibition der verwandten KCNQ2 und KCNQ3-Kanäle getestet, die sich als kaum signifikant erwies. In diesem Zusammenhang wurde auch ein neues Mitglied der KCNQ-Familie kloniert, KCNQ5, das schwach sensitiv gegen 293B war, nicht im Herzen vorkommt aber wahrscheinlich zusammen mit KCNQ2/KCNQ3 zum neuronalen M-Strom beiträgt. Dies ergab Hinweise darauf, dass von anderen KCNQ-Kanälen differente Proteinsequenzen die hohe Sensitivität des KCNQ1-Kanals gegenüber 293B determinieren.

Die Bindungsstelle an der α -Untereinheit KCNQ1 wurde anschließend durch KCNQ1/KCNQ2-Chimären auf die innere Porenregion eingegrenzt. Durch detaillierte Untersuchung mithilfe von Punktmutationen identifizierten wir Aminosäuren in der Transmembranregion S6 (I337) und

der Porenschleife H5(V307), deren Austausch gegen die entsprechenden KCNQ2-Aminosäuren die Affinität von 293B zu KCNQ1- sowie zu I_{Ks} -Kanälen um den Faktor 4-20 herabsetzten. Durch Analogiemodellierung mithilfe der bekannten Kristallstruktur des KcsA-Kaliumkanals konnte ein 3D-Modell der KCNQ1-Porenregion erstellt werden, aus dem sich ergab, dass die Seitenketten der Aminosäure Isoleucin 337 in das Lumen der inneren Pore gerichtet sind. Aus dem Modell konnte weiterhin das Phenylalanin 340 als in das Lumen gerichtet identifiziert werden. Dieses Ergebnis konnte durch weitere Mutagenese-Experimente evaluiert werden, aus denen hervorging, dass Veränderungen an dieser und benachbarten Positionen die Sensitivität sowohl von KCNQ1- als auch von I_{Ks} -Kanälen gegenüber 293B um den Faktor 10-100 verminderten. Das 293B-Molekül konnte so in das Modell integriert werden, dass sich attraktive Interaktionen mit diesen beiden Resten (F340 und I337) ausbilden. Die innere Porenregion stellt auch für viele Inhibitoren anderer Kaliumkanäle eine wichtige Determinante für hohe Affinität dar.

Die in H5 gelegene Aminosäure V307 schien nach dem Modell nicht an einer 293B-Interaktion direkt beteiligt zu sein. Es fiel aber bei der Charakterisierung auf, dass das veränderte Protein nicht mehr inaktivierte. Daher sollte ein Zusammenhang zwischen dem 293B-Wirkmechanismus und der intrinsischen KCNQ1-Inaktivierung untersucht werden. Es wurden wiederum durch einen Chimärenansatz zunächst die Regionen identifiziert, die für eine KCNQ1-Inaktivierung notwendig sind. Anschließend wurde nach punktuellm Austausch von KCNQ1-Aminosäuren gegen analoge KCNQ2-Reste für eine weitere Position im Transmembransegment S5 (G272) ein Verlust der Inaktivierung festgestellt. Die zweite nicht-inaktivierende Mutante G272C war Wild-Typ-gleich 293B-empfindlich, woraus sich vermuten ließ, dass die schwache Empfindlichkeit gegenüber 293B und der Verlust der Inaktivierung der KCNQ1-Mutante V307L nicht in Zusammenhang stehen. Die Ergebnisse machten aber molekular den Unterschied der KCNQ1-Inaktivierung zu den beiden klassischen Inaktivierungsarten von Kaliumkanälen, N- und C-Typ, deutlich. Zuvor war dies nur anhand unterschiedlicher biophysikalischer Eigenschaften gezeigt worden. Das zuvor erstellte KCNQ1-Modell unterstützte die Resultate, da sich in ihm die beiden Regionen S5 und die Porenhelix H5 etwa auf Höhe der beiden Aminosäuren V307 und G272 kreuzen, was eine Interaktion dieser Regionen suggeriert.

Zudem ist bei der ein Long-QT-Syndrom verursachenden KCNQ1-Mutation L273F die mutierte Stelle unmittelbar neben dem Valinrest 307 lokalisiert. Diese besonders stark inaktivierende LQT1-Mutante erhielt auch unter der Einwirkung von MinK eine nachweisbare Inaktivierung aufrecht. Da die KCNQ1-Inaktivierung durch MinK-Koexpression normalerweise aufgehoben wird, spricht dies für eine pathophysiologische Relevanz der KCNQ1-Inaktivierung.

VI Literaturverzeichnis

Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T. & Goldstein, S.A.N. (1999). Mirp1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**:175-187.

Abitbol, I., Peretz, A., Lerche, C., Busch, A.E. & Attali, B. (1999). Stilbenes and fenamates rescue the loss of I_{Ks} channel function induced by an LQT5 mutation and other I_{Ks} mutants. *EMBO J.* **18**(15):4137-48.

Armstrong, C.M. & Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* **70**:567-590.

Ashcroft, F.M. (2000). Ion channels and disease. *Academic Press*, San Diego, California, USA.

Bargmann, C.I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **11**;282(5396):2028-33.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. & Romey, G. (1996). KCNQ1 and I_{Ks} (MinK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium channel. *Nature* **384**:78-80.

Bennett, P.B., Yazawa, K., Makita, N. & George, A.L.Jr. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* **376**(6542):683-5.

Bezanilla, F., Vergara, J. & Taylor, R.E. (1982). Voltage clamping of excitable membranes. In: Ehrenstein, G. & Lecar, H. (eds), *Methods of experimental physics*. New York, *Academic Press* **20**:445-511.

Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J. & Steinlein, O.K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* **279**:403-406.

Blumenthal, E.M. & Kaczmarek, L. (1992). Modulation by cAMP of a slowly activating potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **12**:290-295.

- Blumenthal, E.M. & Kaczmarek, L.K. (1994). The minK potassium channel exists in functional and nonfunctional forms when expressed in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **14**(5 Pt 2):3097-105.
- Brown, D.A. & Adams, P.R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* **283**(5748):673-6.
- Busch, A.E., Hurst, R.S., North, R.A., Adelman, J.P. & Kavanaugh, M.P. (1991). Molecular mechanism of inactivation of a cloned voltage-dependent lymphocyte potassium channel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **179**:1384-1390.
- Busch, A.E., Waldegger, S., Murer, H. & Lang, F. (1996a). The molecules of proximal tubular transport - insights from electrophysiology. *Nephron* **72**:1-8.
- Busch, A.E., Suessbrich, H., Waldegger, S., Sailer, E., Greger, R., Lang, H.J., Lang, F., Gibson, K.J. & Maylie, J.G. (1996b). Inhibition of I_{Ks} in guinea pig cardiac myocytes and I_{SK} channels by the chromanol 293B. *Pflügers Arch.* **432**:1094-1096.
- Busch, A.E., Busch, G.L., Ford, E., Suessbrich, H., Lang, H.J., Greger, R., Kunzelmann, K., Attali, B. & Stuhmer, W. (1997). The role of the I_{Ks} protein in the specific pharmacological properties of the I_{Ks} channel complex. *Br. J. Pharmacol.* **122**(2):187-189.
- Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J. & Leppert, M (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat. Genet.* **18**:53-5.
- Choi, K.L., Aldrich, R.W & Yellen, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**(12):5092-5095.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* **16** (17):5472-5479.
- Cui, J., Kline, R.P., Pennefather, P. & Cohen, I.S. (1994). Gating of I_{Ks} expressed in *Xenopus* oocytes depends on the amount of mRNA injected. *J. Gen. Physiol.* **104**:87-105.

Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D. & Keating, M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**:795-803.

Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **22** (4):317-387.

Davies, A.J., Harindra, V., McEwan, A. & Ghose, R.R. (1989). Cardiotoxic effect with convulsions in terfenadine overdose. *Brit. Med. J.* **298**:325.

van Dongem, A.M.J., Frech, G.C., Drewe, J.A., Joho, R.H. & Brown, A.M. (1990). Alteration and deletion of K⁺ channel function by deletions at the N- and C-termini. *Neuron* **5**:433-443.

Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.

Duggal, P., Vesley, M.R., Wattanasirichaigoon, D., Villafane, J., Kaushik, V. & Beggs, A.H. (1998). Mutations of the gene for I_{Ks} associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of the Long-QT syndrome. *Circulation* **97**:142-146.

Ecke, D., Bleich, M., Lohrmann, E., Hropot, M., Englert, H.C., Lang, H.J., Warth, R., Rohm, W., Schwartz, B., Frase, G. & Greger, R. (1995). A chromanol type of K⁺ channel blocker inhibits forskolin but not carbachol mediated Cl⁻ secretion in rat and rabbit colon. *Cell. Physiol. Biochem.* **5**:204-210.

Fayer, S.A. (1986). Torsades de pointes ventricular tachyarrhythmia associated with haloperidol. *J. Clin. Psychopharmacol.* **6**:375-376.

Ficker, E., Jarolimek, W., Kiehn, J., Baumann, A., Brown, A.M. (1998). Molecular determinants of dofetilide block of HERG K⁺ channels. *Circ. Res.* **82**(3):386-95.

Finkel, A.S. & Gage, P.W. (1985). Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In: Smith, T.G. Jr., Lecar, H., Redman, S.J. und Gage, P.W. (eds.), Voltage and patch clamping with microelectrodes. *American Physiological Society*, Bethesda, MA, USA.

- Franqueza, L., Lin, M., Shen, J., Splawski, I., Keating, M.T. & Sanguinetti, M.C. (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the S4-S5 linker of KvLQT1 potassium channels modify gating and interaction with MinK subunits. *J. Biol. Chem.* **274**(30):21063-21070.
- Fujisawa, S., Ono, K., & Iijima T. (2000). Time-dependent block of the slowly activating delayed rectifier K⁺ current by chromanol 293B in guinea-pig ventricular cells. *Br. J. Pharmacol.* **129**:1007-1013.
- Gellens, M., George, A., Chen, L., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. & Kallen, R. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:554-558.
- George, A.L., Varkony, T.A., Drabkin, H.A., Han, J., Knops, J.F., Finley, W.H., Brown, G.B., Ward, D.C. & Hass, M. (1995). Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel α -subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet. Cell Genet.* **68**:67-70.
- Gögelein, H., Bruggemann, A., Gerlach, U., Brendel, J. & Busch, A.E. (2000). Inhibition of IKs channels by HMR 1556. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **362**(6):480-8.
- Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**(15):2714-23.
- Hadley, J.K., Noda, M., Selyanko, A.A., Wood, I.C., Abogadie, F.C. & Brown, D.A. (2000) *Br. J. Pharmacol.* **129**(3):413-415.
- Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**(5085):1152-5.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**(4):1061-7.
- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K. & Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **356**:441-3
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Second edition. *Sinauer Associates Inc. Publishers*, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Hockerman, G.H., Johnson, B.D., Abbott, M.R., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1997). Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment III S6 and the pore region of the alpha1 subunit. *J. Biol. Chem.* **272**(30):18759-65.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. & Katz, B. (1952). Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**:424-448.
- Hollmann, M., Maron, C., Heinemann, S. (1994). N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* **13**(6):1331-43.
- Holmgren, M., Jurman, M.E. & Yellen, G. (1996). N-type inactivation and the S4-S5 linker region of the *Shaker* K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **108**:195-206.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. & Aldrich, R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* **250**:533-538.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. & Aldrich, R.W. (1991). Two types of inactivation in *Shaker* K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**:547-556.
- Hunt, N. & Stern, T.A. (1995). The association between intravenous haloperidol and torsades de pointes. Three cases and a literature review. *Psychosomatics* **36**:541-549.
- Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K⁺ channel. *Nature* **353**:86-90.
- Jentsch, T.J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**(1):21-30.
- Jervell, A. & Lange-Nielsen, L. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with the prolongation of QT interval, and sudden death. *Am. Heart J.* **54**:59-68.
- Jiang, C., Atkinson, D., Towbin, J.A., Splawski, I., Lehmann, M.H., Li, H., Timothy, K., Taggart, R.T., Schwartz, P.J., Vincent, G.M., Moss, A.J. & Keating, M.T. (1994). Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nature Genet.* **8**:141-147.

- Jurkiewicz, N.K. & Sanguinetti, M.C. (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent: specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ. Res.* **72**(1):75-83.
- Keating, M.T., Atkinson, D., Dunn, C., Timothy, K., Vincent, G.M. & Leppert, M. (1991). Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey *ras-1* gene. *Science* **252**:704-706.
- Kraus, R.L., Hering, S., Grabner, M., Ostler, D. & Striessnig, J. (1998). Molecular mechanism of diltiazem interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **273**(42):27205-12.
- Kubisch, C., Schroeder, B.C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C. & Jentsch, T.J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* **96**(3):437-446.
- Lehmann-Horn, F. & Rüdell, R. (1996). Molecular pathophysiology of voltage-gated ion channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharm.* **128**:195-268.
- Lamas, J.A., Selyanko, A.A. & Brown, D.A. (1997). Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (I_{K(M)}) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.* **9**(3):605-16.
- Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**:283-289.
- Lees-Miller, J.P., Duan, Y., Qi Teng, G. & Duff, J. (2000). Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to *HERG1* expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol. Pharmacol.* **57**:367-374.
- Lerche, C., Scherer, C.R., Seeböhm, G., Derst, C., Wei, A.D., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.* **275**(29):22395-400.
- Lerche, H., Heine, R., Pika, U., George, A.L.Jr., Mitrovic, N., Browatzki, M., Weiss, T., Rivet-Bastide, M., Franke, C., Lomonaco, M., Ricker, K. & Lehmann-Horn, F. (1993). Human sodium channel myotonia: slowed channel inactivation due to substitutions for a glycine within the III-IV linker. *J. Physiol.* **470**:13-22.

- Liu, Y., Jurman, M.E. & Yellen, G. (1996). Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* **16**:859-867.
- Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M.E. & Yellen, G. (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* **19**(1):175-84.
- Lohrmann, E., Burhoff, I., Nitschke, R.B., Lang, H.J., Mania, D., Englert, H.C., Hropot, M., Warth, R., Rohm, W. & Bleich, M. (1995). A new class of inhibitors of cAMP-mediated Cl⁻ secretion in rabbit colon, acting by the reduction of cAMP-activated K⁺ conductance. *Pflügers Arch.* **429**(4):517-530.
- Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heineman, S.H. & Aldrich, R.W. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors channels* **1**:66-71.
- Lorenz, C., Pusch, M. & Jentsch, T.J. (1996). Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**(23):13362-6.
- Loussouarn, G., Charpentier, F., Mohammad-Panah, R., Kunzelmann, K., Baro, I. & Escande, D. (1997). KCNQ1 potassium channel but not I_{Ks} is the molecular target for trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-chromane. *Mol. Pharmacol.* **52**:1131-1136.
- MacKinnon, R. & Yellen, G. (1990). Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* **250**(4978):276-9.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**(6315):232-5.
- MacKinnon, R., Cohen, S.L., Kuo, A., Lee, A. & Chait, B.T. (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280**(5360):106-9.
- McDonald, T.V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M.B., Wang, K.W., Goldstein, S.A. & Fishman, G.I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* **388**(6639):289-92.

- Metzger, E. & Friedman, R. (1993). Prolongation of the corrected QT and torsades de pointes cardiac arrhythmia associated with intravenous haloperidol in the medically ill. *J. Clin. Psychopharmacol.* **13**:128-132.
- Mitcheson, J.S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C. & Sanguinetti, M.C. (2000). A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**(22):12329-33.
- Monahan, B.P., Ferguson, C.L., Killeavy, E.S., Lloyd, B.K., Troy, J. & Cantilena, L.R. (1990). Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA* **264**:2788-2790.
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K. & Guicheney, P. (1997). A novel mutation in the potassium channel KCNQ1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics* **15**:186-189.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**:749-753.
- Pieniaszek, H.J.Jr., Fiske, W.D., Saxton, T.D., Kim, Y.S., Garner, D.M., Xilinas, M. & Martz, R. (1995). Single-dose pharmacokinetics, safety, and tolerance of linopirdine (DuP 996) in healthy young adults and elderly volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **35**(1):22-30.
- Pusch, M., Magrassi, R., Wollnik, B. & Conti, F. (1998). Activation and inactivation of homomeric KCNQ1 potassium channels. *Biophys. J.* **75**:785-792.
- Pusch, M. (1998). Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflügers Arch.* **437**(1):172-4.
- Pusch, M., Bertorello, L. & Conti, F. (2000). Gating and flickery block differentially affected by rubidium in homomeric KCNQ1 and heteromeric KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Biophys. J.* **78**(1):211-26.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O. & Pongs, O. (1994). Inactivation properties of the voltage-gated K⁺ channels altered by presence of β -subunit. *Nature* **369**:289-294.

Rockwood, K., Beattie, B.L., Eastwood, M.R., Feldman, H., Mohr, E., Pryse-Phillips, W. & Gauthier, S. (1997). A randomized, controlled trial of linopirdine in the treatment of Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **24**(2):140-5.

Romano, C. (1965). Congenital cardiac arrhythmia. *Lancet* **1**:658-659.

Romey, G., Attali, B., Chouabe, C., Abitbol, I., Guillamare, E., Barhanin, J. & Lazdunski, M. (1997). Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KCNQ1 channel activity. *J. Biol. Chem.* **272**:16713-16716.

Rundfeld, C. & Netzer, R. (2000). The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci. Lett.* **282**(1-2):73-6.

Salata, J.J., Jurkiewicz, N.K., Wang, J., Evans, B.E., Orme, H.T. & Sanguinetti, M.C. (1998). A novel Benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K⁺ currents. *Mol. Pharmacol.* **54**(1):220-230.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5463-5467.

Sanguinetti, M.C. & Jurkiewicz, N.K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. *J. Gen. Physiol.* **96**:195-215.

Sanguinetti, M.C. & Jurkiewicz, N.K. (1991). Delayed rectifier outward K⁺ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am. J. Physiol.* **260**:393-399.

Sanguinetti, M.C., Jurkiewicz, N.C., Scott, A. & Siegel, P.K.S. (1991). Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea-pig myocytes: mechanism of action. *Circ. Res.* **68**:77-84.

Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. & Keating, M.T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**:299-307.

Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L. & Keating, M.T. (1996). Coassembly of KCNQ1 and MinK (I_{Ks}) to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.

Sanguinetti, M.C. (1999). Dysfunction of delayed rectifier potassium channels in an inherited cardiac arrhythmia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **868**:406-13. Review.

Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B. & Pongs O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 19(3):332-340.

Schönherr, R. & Heinemann, S.H. (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol.* **493**:601-605.

Schott, J.J., Charpentier, F., Peltier, S., Foley, P., Drouin, E., Bouhour, J.B., Donnelly, P., Vergnaud, G., Bachner, L., Moisan, J.P., *et al.* (1995). Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am. J. Hum. Genet.* **57**(5):1114-22.

Schreieck, J., Wang, Y., Gjini, V., Korth, M., Zrenner, B., Schomig, A. & Schmitt, C. (1997). Differential effect of beta-adrenergic stimulation on the frequency-dependent electrophysiologic actions of the new class III antiarrhythmics dofetilide, ambasilide, and chromanol 293B. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **8**(12):1420-1430.

Schroeder, B.C., Kubisch, C., Stein, V. & Jentsch, T.J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K^+ channels causes epilepsy. *Nature* **396**:687-90

Schroeder, B.C., Waldegger, S., Fehr, S.; Bleich, M., Warth, R., Greger, R. & Jentsch, T.J. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**:196-199.

Schulze-Bahr, E., Heverkamp, W., Wedekind, H., Rubie, C., Hordt, M., Borggrefe, M., Assmann, G., Breithardt, G. & Funke, H. (1997). Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum. Gen.* **100**:573-576.

Seeböhm, G., Lerche, C., Gerlach, U., Busch, A.E. & Brüggemann, A. (2000). A pharmacological way to discriminate different gating states of KvLQT1 and I_{Ks} . *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* **361**(4):R75.

Selnick, H.G., Liverton, N.J., Baldwin, J.J., Butcher, J.W., Claremon, D.A., Elliott, J.M., Freidinger, R.M., King, S.A., Libby, B.E., McIntyre, C.J., Pribush, D.A., Remy, D.C., Smith, G.R., Tebben, A.J., Jurkiewicz, N.K., Lynch, J.J., Salata, J.J., Sanguinetti, M.C., Siegl, P.K., Slaughter D.E. & Vyas, K. (1997). Class III antiarrhythmic activity in vivo by selective blockade of the slowly activating cardiac delayed rectifier potassium current IKs by (R)-2-(2,4-trifluoromethyl)-N-[2-oxo-5-phenyl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl]acetamide. *J. Med. Chem.* **40**(24):3865-3868.

Selyanko, A.A., Hadley, J.K., Wood, I.C., Abogadie, F.C., Jentsch, T.J. & Brown, D.A. (2000). Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M1 muscarinic acetylcholine receptors. *J. Physiol.* **522** (Pt 3):349-55.

Shalaby, F.Y., Levesque, P.C., Yang, W.P., Little, W.A., Conder, M.L., Jenkins, West, T. & Blarar, M.A. (1997). Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. *Circulation.* **96**(6):1733-1736.

Shieh, C.C., Klemic, K.G. & Kirsch, G.E. (1997). Role of transmembrane segment S5 on gating of voltage-dependent K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **109**(6):767-78.

Simons, F.E.R., Kesselman, M.S., Giddins, N.G., Pelech, A.N. & Simons, K.J. (1988). Astemizole-induced torsade de pointes. *Lancet* **2**, 624.

Singh, B.N. (1992). Antiarrhythmic actions of DL-sotalol in ventricular and supraventricular arrhythmias. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20** Suppl 2:S75-90. Review.

Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R., Ronen, G.M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J.V., McHarg, M.L., Gagnon, D., Rosales, T.O., Peiffer, A., Anderson, E. & Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat. Genet.* **18**:25-9.

Smith, P.L., Baukrowitz, T. and Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**:833-836.

Snyders, D.J.(1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **42**:377-390.

Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M.H., Sanguinetti, M.C. & Keating, M.T. (1997). Mutations in the h*MinK* gene cause long QT syndrome and suppress I_{Ks} function. *Nat. Genet.* **17**:338-340.

Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H. & Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**:597-603.

Suessbrich, H., Waldegger, S., Lang, F. & Busch, A.E. (1996a). Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett.* **395**:77-80.

Suessbrich, H., Bleich, M., Ecke, D., Rizzo, M., Waldegger, S., Lang, F., Szabo, I., Lang, H.J., Kunzelmann, K., Greger, R. & Busch, A.E. (1996b). Specific blockade of slowly activating I(sK) channels by chromanols – impact on the role of I(sK) channels in epithelia. *FEBS Lett.* **396**(2-3):271-275.

Suessbrich, H. (1997). Untersuchungen zur Pharmakologie und physiologischen Rolle von HERG- und I_{Ks} -Kaliumkanälen. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Tai, K.K. & Goldstein, S.A.N. (1998). The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature* **391**:605-608.

Takumi, T., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1988). Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* **242**(4881):1042-1045.

Takumi, T., Moriyoshi, K., Aramori, I., Ishii, T., Oiki, S., Okada, Y., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1991). Alteration of channel activities and gating by mutations of slow ISK potassium channel. *J. Biol. Chem.* **266**:22192-22198.

Tinel, N., Lauritzen, I., Chouabe, C., Lazdunski, M. & Borsotto, M. (1998). The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett.* **438**(3):171-6.

- Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M.C. (1998). Voltage-dependent inactivation of human K⁺ channel KCNQ1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (MinK) subunits. *J. Physiol.* **510** (1):37-45.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:615-619.
- Waldegger, S., Fakler, B., Bleich, M., Barth, P., Hopf, A., Schulte, U., Busch, A.E., Aller, S.G., Forrest, J.N.Jr., Greger, R. & Lang, F. (1999). Molecular and functional characterization of s-KCNQ1 potassium channel from rectal gland of *Squalus acanthias*. *Pflügers Arch.* **437**(2):298-304.
- Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E. & McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* **282**:1890-3.
- Wang, H.S., Brown, B.S., McKinnon, D. & Cohen, I.S. (2000). Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I_{Ks} channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol. Pharmacol.* **57**:1218-1223.
- Wang, K.W., Tai, K.K. & Goldstein, S.A. (1996). MinK residues line a potassium channel pore. *Neuron* **16**(3):571-7.
- Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A. & Keating, M.T. (1995). SCNA5 mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**:805-811.
- Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T.C., Millholland, J.M., Van Raay, T.J., Shen, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., De Jager, T., Schwarz, P.J., Towbin, J.A., Moss, A.J., Atkinson, D.L., Landes, G.M., Connors, T.D. & Keating, M.T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KCNQ1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics* **12**:17-23.
- Wang, W., Xia, J. & Kass, R. (1998). MinK-KCNQ1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled I_{Ks} channel. *J. Biol. Chem.* **273** (51):34069-34074.

- Wang, Z., Tristani-Firouzi, M., Xu, Q., Lin, M., Keating, M.T. & Sanguinetti, M.C. (1999). Functional effects of mutations in KvLQT1 that cause long QT syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**(6):817-26.
- Ward, O.C., (1964). A new familial cardiac syndrome in children. *J. Ir. Med. Ass.* **54**:103-106.
- Warmke, J.E. & Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3438-3442.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowsky, J. & Zoller, M. (1992). Recombinant DNA, second edition. *Scientific American Books*, New York, USA.
- Wei, A., Jegla, T. & Salkow, L. (1996). Eight potassium channel families revealed by *C. elegans* genome project. *Neuropharmacol.* **35**:805-829.
- Wollnik, B., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Esperer, H.D., Wieacker, P. & Jentsch, T.J. (1997). Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K⁺ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum. Mol. Genet.* **6**(11):1943-1949.
- Yang, I.C.H., Scherz, M.W., Bahinski, A., Bennett, P.B. & Murray, K.T. (2000). Stereoselective interactions of the enantiomers of chromanol 293B with human voltage-gated potassium channels. *J. Pharm. Exp. Ther.* **294**(3):955-962.
- Yang, N. & Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**:213-8.
- Yang, N., George, A.L. & Horn, R. (1996). Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* **16**:113-22.
- Yang, T., Kupersmidt, S., Roden, D.M. & Snyders, J. (1998). Coexpression of Mink modifies hKv1.5 activation in mammalian cells. *Biophys. J.* **74**(2):A346.
- Yang, W.P., Levesque, P.C., Little, W.A., Conder, M.L., Ramakrishnan, P., Neubauer, M.G. & Blana, M.A. (1998). Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J. Biol. Chem.* **273**(31):19419-23.

Yang, Y. & Sigworth, F.J. (1998). Single-channel properties of IKs potassium channels. (1998). *J. Gen. Physiol.* **112**(6):665-678.

Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* **251**(4996):939-42.

Zagotta, W.N., Hoshi, T. and Aldrich, R.W. (1990). Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* **250**:568-571.

VII Publikationen und Kongressbeiträge

Originalveröffentlichungen

Kostenis, E., Gomeza, J., **Lerche, C.** & Wess, J. (1997). Genetic analysis of receptor-Galphaq coupling selectivity. *J. Biol. Chem.* **272**(38):23675-81.

Wess, J., Liu, J., Blin, N., Yun, J., **Lerche, C.** & Kostenis, E. (1997). Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. *Life Sci.* **60**(13-14):1007-14.

Abitbol, I., Peretz, A., **Lerche, C.**, Busch, A.E. & Attali, B. (1999). Stilbenes and fenamates rescue the loss of I_{Ks} channel function induced by an LQT5 mutation and other IsK mutants. *EMBO J.* **18**(15):4137-48.

Lerche, C., Scherer, C.R., Seebohm, G., Derst, C., Wei, A.D., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.* **275**(29):22395-400.

Lerche, C., Seebohm, G., Wagner, C.I., Scherer, C.R., Dehmelt, L., Abitbol, I., Gerlach, U., Brendel, J., Attali, B. & Busch, A.E. (2000). Molecular impact of MinK on the enantiospecific block of I_{Ks} by chromanols. *Brit. J. Pharmacol.* **131**(8):1503-1506.

Seebohm, G., Scherer, C.R., Busch, A.E. & **Lerche, C.** (2001). Identification of specific pore residues mediating KCNQ1-inactivation: a novel mechanism for long QT syndrome? *J. Biol. Chem.* **276**(17):13600-13605.

In Vorbereitung oder in Revision

Lerche, C., Wei, A.D. Seebohm, G., Fengler, A. & Busch, A.E. Mapping the molecular binding region of the chromanol 293B in KCNQ1 and I_{Ks} channels. *In Vorbereitung (J. Biol. Chem.)*.

Scherer, C.R., **Lerche, C.**, Pinto, Y.M., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. The antihistamine fexofenadine does not affect I_{Kr} -currents in a patient reported to have fexofenadine-induced cardiac arrhythmia. *In Vorbereitung (Brit. J. Pharmacol.)*.

Seebohm, G., **Lerche, C.**, Pusch, M., Steinmeyer, K., Brueggemann, A. and Busch, A.E. A kinetic study on the stereospecific inhibition of KCNQ1 and I_{Ks} by the Chromanol 293B. *In Revision (Brit. J. Pharmacol.)*.

Seebohm, G., **Lerche, C.**, Busch, A.E. & Bachmann, A.. An endogenous I_{Ks} interacting factor in Cardiac Myocytes and in *Xenopus* Oocytes? *In Revision (Pflügers Arch.)*.

Kongressbeiträge

Abitbol, I., **Lerche, C.**, Peretz, A., Busch, A.E. & Attali, B. (1998). Allosteric modulation of the I_{Ks} potassium channel complex. *Biophys. J.* **74**(2):A345.

Lerche, C., Seebohm, G., Wagner, C.I., Wei, A.D., Gerlach, U., Lang, H.J., Attali, B., Brüggemann, A. & Busch, A.E. (1999). Different block of closely related potassium channels by the chromanol 293B *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* **359**(3):R76.

Seebohm, G., **Lerche, C.**, Kelety, B., Burgard, A., Gerlach, U., Lang, H.-J., Gögelein, H., Busch, A.E. & Brüggemann, A. (1999). Specific I_{Ks} potassium channel blocker chromanol 293B shows enantiomer specific blocking mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* **359**(3):R76.

Lerche, C., Seebohm, G., Wei, A.D., Wagner, C.I., Gerlach, U., Lang, H.J., Attali, B., Brüggemann, A. & Busch, A.E. (1999). Block of KvLQT1 related potassium channels by the chromanol 293B. *Biophys. J.* **76**(2):A89.

Seebohm, G., **Lerche, C.**, Kelety, B., Burgard, A., Gerlach, U., Lang, H.-J., Gögelein, H., Busch, A.E. & Brüggemann, A. (1999). State, frequency and enantiomer dependent block of the potassium channel I_{Ks} by the chromanol 293B. *Biophys. J.* **76**(2):A187.

Lerche, C., Seebohm, G., Wagner, C.I., Gerlach, U., Brüggemann, A., Attali, B. & Busch, A.E. (2000). Mapping the binding site of the chromanol 293B on the I_{Ks} -channel. *Biophys. J.* **78**(1):204A.

Seebohm, G., **Lerche, C.**, Brüggemann, A. & Busch, A.E. (2000). Identification of a novel region involved in KvLQT1 inactivation. *Biophys. J.* **78**(1):205A.

Scherer, C.R., **Lerche, C.**, Pinto, Y.M., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. (2000). The antihistamine fexofenadine does not affect I_{Kr} -currents in a patient reported to have fexofenadine-induced cardiac arrhythmia. *Biophys. J.* **78**(1):342A.

Seeböhm, G., **Lerche, C.**, Gerlach, U., Busch, A.E. & Brüggenmann, A. (2000). A pharmacological way to discriminate different gating states of KvLQT1 and I_{Ks} . *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* **361**(4):R75.

Scherer, C.R., **Lerche, C.**, Pinto, Y.M., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. (2000). The antihistamine fexofenadine does not affect cardiac I_{Kr} currents: a functional study of wild-type and a novel HERG mutant identified in a patient reported to have drug-induced cardiac arrhythmia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* **361**(4):R78.

Lerche, C., Seeböhm, G., Schiebe, M., Busch, A.E. & Lerche, H. (2000). Evidence for assembly of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels via the C-terminus. *Soc. Neurosci. Abs.* **26**:1909.

Maljevic, S., **Lerche, C.**, Seeböhm, G., Wuttke, T., Alekov, A., Busch, A.E. & Lerche, H. (2001). Evidence for assembly of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels via the C-terminus. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **441**:R143.

Vortrag

Lerche, C., Seeböhm, G., Wagner, C.I., Gerlach, U., Arndt, P. & Busch, A.E. (2000). Chromanol 293B wirkt in der inneren Porenregion des I_{Ks} -Kanals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* **361**(4):R77.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten	geboren am 19. Dezember 1970 in Düsseldorf
Ausbildung	
1977-1990	Grundschule und Gymnasium in Düsseldorf, Abitur 1990 (altsprachlicher Zweig)
1991-1992	Medizinstudium an der Rheinisch-Westfälischen-Technischen-Hochschule (RWTH) Aachen
1992-1997	Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, 3. Staatsexamen im Juni 1997 (bei den Professoren Rücker, Mohr, Steffens und Leistner)
seit August 1997	Anfertigung einer Dissertation in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt/Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A.E. Busch und Herrn Prof. Dr. Dr. med. E. Mutschler
Praktika	
1994 und 1995	jeweils sechswöchige Tätigkeit als Werkstudent in der galenischen Forschung und in der Produktion von Farbfilmkomponenten bei der Bayer AG, Leverkusen
1996-1997	Pharmaziepraktikant in der Stadion-Apotheke zu Köln
Grundwehrdienst	
1990-1991	Grundausbildung zum Sanitäter, Heeresmusikkorps Kassel
Auslandsaufenthalte	
April – Oktober 1995	Studium der Pharmazie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) Zürich als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
April – Oktober 1996	Forschungsaufenthalt an den National Institutes of Health (NIH-NIDDK, Bethesda, USA) im Rahmen des Praktischen Jahres bei Priv. Doz. Dr. Jürgen Wess
August – Dezember 1997	Forschungsaufenthalt am Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) bei Prof. Bernard Attali
Berufstätigkeit	
seit September 2000	Vorstandsassistent für die Geschäftsbereiche CropScience und Pharma, Aventis, Strasbourg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt-Höchst unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. A.E. Busch angefertigt. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. A.E. Busch für das Bereitstellen des Themas, sein Interesse an der Arbeit und an der Person, seine Motivation durch klare Zielvorgabe aber auch durch Spass und seine zuverlässige Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Mutschler an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt a.M. für die freundliche Unterstützung durch die Betreuung seitens der Universität, durch die diese Arbeit erst ermöglicht wurde.

Guiscard Seeböhm für ein sehr freundschaftliches und äußerst produktives Teamwork, das mit viel Spass verbunden war.

Constanze Scherer für eine effektive Zusammenarbeit, außerdem für Motivation, Freude, viel Geduld und Unterstützung in jeder Hinsicht (auch die beiden Northern Blots und intensives Korrekturlesen).

Herrn PD Dr. Klaus Steinmeyer für fachliche Unterstützung und Beratung und seine Kooperation beim Erstellen von Publikationen.

Ferner gilt mein Dank:

Dr. Bernard Attali für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und seine Gastfreundschaft.

Dr. Aguan D. Wei für den Hinweis auf einen KCNQ5-Klon in der Datenbank und, sowie auch *Dr. Annett Fengler*, für die äußerst konstruktive Zusammenarbeit beim Erstellen des 3D-Modells.

Meinem Bruder Holger für viele fruchtbare Diskussionen und Kollaborationen sowie für kritisches Korrekturlesen.

Dr. Uwe Gerlach und Dr. Joachim Brendel für die Synthese der Chromanole, Chromane und dem Benzodiazepin L-768.

Herrn Stefan Müller und Frau Birgit Herzog für exzellente technische Unterstützung bei der Präparation der *Xenopus*-Oozyten bzw. bei der cRNA-Synthese.

Dr. Evi Kostenis, Dr. Andrea Brüggemann, Dr. Hans-Willi Jansen, Dr. Petra Arndt, Dr. Alexander Bachmann, Ursula Stillger und Andreas Hertler für stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie *allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe* für eine freundliche und angenehme Atmosphäre.