

Untersuchungen zur Proteolyse des spannungsabhängigen Kaliumkanals $K_v7.1$

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

Vorgelegt von

Christian Raab

Kiel 2014

Erste/r Gutachter/in: _____ Prof Dr. Paul Saftig _____

Zweite/r Gutachter/in: _____ Prof Dr. Thomas Roeder _____

Tag der mündlichen Prüfung: _____ 17.09.2014 _____

Zum Druck genehmigt: Kiel _____ 17.09.2014 _____

gez. Prof Dr Wolfgang Duschl, Dekan

Wenn der menschliche Verstand sich einmal eine Meinung gebildet hat, führt er alle möglichen Gesichtspunkte an, die diese stützen und damit übereinstimmen sollen. Mag es auch eine große Anzahl gewichtiger anderer Anhaltspunkte geben, so vernachlässigt er diese entweder oder weist sie sogar zurück, um durch diese verhängnisvolle Voreingenommenheit die Autorität seiner vorherigen Schlussfolgerungen nicht zu gefährden.

Francis Bacon

1	EINLEITUNG	4
	BIOLOGISCHE MEMBRANEN	4
	RUHEMEMBRANPOTENTIAL	4
	IONENKANÄLE	5
	SPANNUNGSABHÄNGIGE KALIUMIONENKANÄLE	6
	FAMILIE DER K_v7 KANÄLE	7
	DER C-TERMINUS VON K_v7 KANÄLEN	8
	PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON K_v7.1	10
	MODULATION DER KANALAKTIVITÄT MITTELS DER B-UNTEREINHEITEN	11
	FUNKTION VON IONENKANÄLEN IN DER PROLIFERATION UND APOPTOSE	13
	APOPTOSE	13
	CASPASEN	14
	1.1.1 EXTRINSISCHER SIGNALTRANSDUKTIONSWEG	16
	1.1.2 INTRINSISCHER SIGNALTRANSDUKTIONSWEG	17
	SMAC/DIABLO	19
	PROTEOLYSE	20
2	FRAGESTELLUNG	22
3	METHODEN	23
	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	23
	3.1.1 CDNA KONSTRUKTE	23
	3.1.2 POLYMERASE KETTENREAKTION	23
	3.1.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	24
	3.1.4 RESTRIKTIONSVERDAU	24
	3.1.5 DEPHOSPHORYLIERUNG	25
	3.1.6 LIGATION	25
	3.1.7 TRANSFORMATION VON ELEKTROKOMPETENTEN ZELLEN	25
	3.1.8 HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN	25
	3.1.9 AUFREINIGUNG VON PLASMID-DNA	26
	3.1.10 ISOLIERUNG VON RNA	26
	3.1.11 UMSCHREIBEN VON CDNA IN cRNA	26
	3.1.12 UMSCHREIBEN VON RNA IN CDNA	26
	3.1.13 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	26
	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	27
	3.1.14 KULTIVIERUNG VON STANDARDZELLINIEN	27
	3.1.15 KULTIVIERUNG VON HL-1 ZELLEN	27
	3.1.16 BESCHICHTEN VON KULTURSCHALEN	27
	3.1.17 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON HL-1 ZELLEN	27
	3.1.18 HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN	27
	3.1.19 HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN AUS GEWEBE	28
	3.1.20 HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN AUS OOZYTEN	28
	3.1.21 ISOLIERUNG VON NRVCN - NEONATAL RAT VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES	28
	3.1.22 TRANSFEKTION	29
	3.1.23 STABILE TRANSFEKTION	29
	3.1.24 PROTEINSYNTHESE IN <i>XENOPUS LAEVIS</i> OOZYTEN	29
	3.1.25 <i>KNOCKDOWN</i> EXPERIMENTE MITTELS siRNA	29
	BIOCHEMISCHE METHODEN	30
	3.1.26 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	30
	3.1.27 <i>WESTERN BLOT</i> UND IMMUNDETEKTION	30
	3.1.28 <i>STRIPPEN</i> VON MEMBRANEN	30
	3.1.29 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	31
	3.1.30 IMMUNFLUORESCENZMIKROSKOPIE	31

3.1.31	IMMUNPRÄZIPITATION	31
3.1.32	ZWEI-ELEKTRODEN-SPANNUNGSKLEMME	32
	HEFE INTERAKTIONSSTUDIE – YEAST TWO HYBRID SCREEN	33
3.1.33	ERZEUGUNG KOMPETENTER <i>S. CEREVISIAE</i> (NMY51)- ZELLEN	33
3.1.34	TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN NMY51-ZELLEN	33
3.1.35	INTERAKTIONSTEST DES hK _v 7.1-BAIT-KONSTRUKTS	33
3.1.36	<i>LARGE-SCALE</i> TRANSFORMATION	34
3.1.37	ISOLIERUNG VON PLASMIDEN AUS HEFEKLONEN	34
3.1.38	STATISTIK	35

4 ERGEBNISSE **36**

	UNTERSUCHUNG DER PROTEOLYTISCHEN SPALTUNG VON K_v7.1	36
4.1.1	ÜBEREXPRESSION VON HUMANEM UND MURINEM K _v 7.1	36
4.1.2	ENDOGENE EXPRESSION VON K _v 7.1 IN NEONATALEN KARDIOMYOZYTEN DER RATTE	37
4.1.3	K _v 7.1 IN VERSCHIEDENEN ORGANEN DER MAUS	37
4.1.4	IDENTIFIZIERUNG DER SCHNITTSTELLE MITTELS TRUNKATIONSMUTANTEN VON K _v 7.1	38
4.1.5	IDENTIFIZIERUNG DER SCHNITTSTELLE DURCH DIE VERWENDUNG EINES <i>ALANINSCANS</i>	41
4.1.6	LQT-MUTATIONEN IM C-TERMINUS VON K _v 7.1	43
4.1.7	SPALTUNG VON K _v 7.1 IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION	44
4.1.8	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER K _v 7.1-D459A MUTANTE	45
4.1.9	VALIDIERUNG DER CASPASE VERMITTELTEN PROTEOLYSE VON K _v 7.1	46
4.1.10	INDUKTION DER PROTEOLYSE VON K _v 7.1 MITTELS STAUROSPORIN	48
4.1.11	PROZESSIERUNG DES C-TERMINUS VON K _v 7.1	49
4.1.12	CASPASE-8 INHIBITOR VERRINGERT DIE PROTEOLYSE VON K _v 7.1	50
4.1.13	siRNA BEHANDLUNG VON STABIL TRANSFIZIERTEN ZELLEN	51
4.1.14	ÜBEREXPRESSION VON CASPASE-3	52
4.1.15	EINFLUSS VON INAKTIVER CASPASE-3 AUF DIE GENERIERUNG DES CTF2	53
4.1.16	ARGININ UND TRYPTOPHAN MUTATIONEN INNERHALB DER CASPASE-3 SCHNITTSTELLE	54
4.1.17	INDUKTION DER K _v 7.1 PROTEOLYSE DURCH MG 132	55
4.1.18	INDUKTION DER PROTEOLYSE VON K _v 7.1 IN HL-1 ZELLEN	56
4.1.19	EINFLUSS VON K _v 7.1 AUF DIE APOPTOSE	57
4.1.20	EINFLUSS VON K _v 7.1 AUF DIE SPALTUNG/AKTIVIERUNG VON CASPASE-3	58
4.1.21	SPALTUNG VON K _v 7.1 UND AKTIVIERUNG VON CASPASE-3 IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KANALAKTIVITÄT	59
4.1.22	KÜNSTLICHE AORTENSTENOSE AN MÄUSEN	61
	CHARAKTERISIERUNG DER C-TERMINALEN FRAGMENTE VON K_v7.1	63
4.1.23	LOKALISATION DER C-TERMINALEN FRAGMENTE INNERHALB DER ZELLE	63
4.1.24	FRAGMENTIERUNG UND ABBAU DES C-TERMINALEN FRAGMENTES	63
4.1.25	NUKLEÄRE LOKALISATION DES C-TERMINALEN FRAGMENTES (CTF2) UND DESSEN FUNKTION ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR	65
4.1.26	GENEXPRESSIONSANALYSE	66
	IDENTIFIZIERUNG NEUER INTERAKTIONSPARTNER	68
4.1.27	YEAST-TWO HYBRID SCREEN	68

5 DISKUSSION **73**

	CHARAKTERISIERUNG DER PROTEOLYSE VON K_v7.1	73
	EINGRENZUNG DER SCHNITTSTELLE IM C-TERMINUS VON K_v7.1	74
	EINE CYSTEINPROTEASE IST VERANTWORTLICH FÜR DIE SPALTUNG VON K_v7.1	75
	CASPASE VERMITTELTE SPALTUNG VON K_v7.1	76
	EINFLUSS VON K_v7.1 AUF DIE APOPTOSE	79
	DER EINFLUSS DER PROTEOLYSE VON K_v7.1 AUF DEN KALIUMSTROM	80
	FUNKTION DES CTF2 VON K_v7.1	82
	DER EINFLUSS EINER KARDIALEN HYPERTROPHIE AUF DIE GENERIERUNG DES CTF2	83
	IDENTIFIKATION VON DIABLO ALS NEUER INTERAKTIONSPARTNER VON K_v7.1	84

6	ZUSAMMENFASSUNG	87
7	SUMMARY	88
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	MATERIAL	98
	CHEMIKALIEN	98
	PUFFER UND LÖSUNGEN	98
	ZELLINIE	99
	ANTIKÖRPER	100
	PLASMIDE UND VEKTOREN	100
	ANHANG	102
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
	TABELLENVERZEICHNIS	103
	ABKÜRZUNGEN	104
	TABELLEN	108
	LEBENS LAUF	114
	DANKSAGUNG	115
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	116

1 Einleitung

Biologische Membranen

Biologische Membranen sind für die Funktion von Zellen von essentieller Bedeutung. Sie sorgen für eine räumliche Abgrenzung und den Schutz der Zelle, wobei sie auch für die Bildung von Zellkompartimenten verantwortlich sind (Stoeckenius *et al.* 1969). Aufgrund ihrer Zusammensetzung und der amphiphilen Struktur sind biologische Membranen für größere Moleküle nicht durchlässig. Kleine gasförmige Moleküle wie Sauerstoff oder Kohlendioxid sind in der Lage, biologische Membranen leicht zu durchdringen. Größere Moleküle, wie Aminosäuren oder geladene Teilchen, benötigen hingegen die Hilfe von Proteinen, um durch die Membran zu gelangen. Dieser Transport kann aktiv oder passiv aufgrund von Poren in der Membran geschehen. Der aktive Transport ermöglicht es, Moleküle gegen ihren Konzentrationsgradienten in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus zu transportieren. Entgegen dem aktiven Transport verläuft die passive Diffusion immer in Richtung des chemischen Konzentrationsgradienten. Durch aktiven und passiven Transport sind die Zellen in der Lage, einen Konzentrationsgradienten für bestimmte Moleküle zwischen Extra- und Intrazellularraum aufzubauen (Hille *et al.* 1999). Eine Ungleichverteilung von z.B. Ionen, ist unter anderem für die Erregbarkeit der Zelle von großer Bedeutung. Hierdurch ist es der Zelle möglich, auf innere oder äußere Reize zu reagieren. Elektrophysiologische Erregbarkeit tritt bei Nerven- und Muskelzellen auf, wobei sie auf eine Änderung des Membranpotentials reagieren können und so Informationen gezielt weitergeben (Hille *et al.* 1999; Hille *et al.* 2001).

Ruhemembranpotential

Aufgrund ihrer Struktur sorgen biologische Membranen für eine Abgrenzung von Kompartimenten mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Ladungsträger, wie z.B. Ionen, sind bestrebt einen Ausgleich des Konzentrationsgradienten zu erreichen. Diese, als chemischer Gradient bezeichneter Verteilung, führt zu einem Fluss von der höheren zu der niedrigeren Konzentration des jeweiligen Moleküls (Ashcroft 2000). Daneben wirkt auf die Teilchen auch eine Triebkraft, die aus ihrer jeweiligen Ladung resultiert. Diese, als elektrischer Gradient bezeichnete Triebkraft, ist für den Ausgleich der Ladungsverteilung verantwortlich. Trotz der Anwesenheit eines chemischen Gradienten kann es vorkommen, dass Ionen diesem nicht folgen können, was auf die Abstoßung von Molekülen mit gleicher Ladung zurückgeführt werden kann. Durch das Zusammenwirken beider, chemisch und elektrischer Gradienten kommt es zu der Ausbildung eines Gleichgewichtspotentials, indem sich die chemischen und elektrischen Kräfte gegenseitig aufheben. Dieses Potential ist im Allgemeinen unterschiedlich

von Null und wird definiert als diejenige Spannung, bei der ein elektrisches Potential ein Fließen der Ionen zum Ort der geringeren Konzentration verhindert (Ashcroft 2000).

Tabelle 1: Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale ausgewählter Ionen. Die extrazellulären Konzentrationen beziehen sich auf humanes Blut, die intrazellulären Konzentrationen sind typisch für Säugerzellen (Tab. modifiziert nach Ashcroft, 2000).

	Extrazelluläre Konzentration (mM)	Intrazelluläre Konzentration (mM)	Gleichgewichtspotential (mV)
Na ⁺	135-145	12	+66
K ⁺	3,5-5	140	-93
Ca ²⁺	2,25-2,52	10 ⁻⁴	+135
Cl ⁻	115	2,5-50	-42

Wie aus der Tabelle 1 zu entnehmen ist, befindet sich der größte Teil der Natrium- und Kalziumionen im Extrazellulärenraum. Die Konzentration der Kaliumionen ist intrazellulär am höchsten. Ein Öffnen der entsprechenden Kanäle hat demnach einen Natriumein- und einen Kaliumausstrom zur Folge. Dieser Kaliumeinstrom sorgt in der Regel für die Repolarisation von Zellen nach einer Erregung. Das Ruhemembranpotential der meisten Zellen liegt bei ca. -70 mV, welches dem Kaliumgleichgewichtspotential entspricht. Hieraus ergibt sich, dass das Ruhepotential vor allem durch Kaliumionen und -kanäle bestimmt wird (Ashcroft 2000).

Ionenkanäle

Ionenkanäle bestehen aus Transmembranproteinen, die in der Zellmembran ionenspezifische Poren bilden und damit den Transport von geladenen Teilchen entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Aufgrund des passiven Transports sind sie nicht in der Lage selbst einen Gradienten aufzubauen (Hille *et al.* 1999). Die Einteilung der Ionenkanäle kann zum Einen nach der Ionenspezies, für welche der Kanal die größte Leitfähigkeit aufweist, erfolgen. Dadurch kann man Kanäle zum Beispiel in K⁺, Na⁺, Ca²⁺, H⁺ und Cl⁻ Kanäle einteilen. Anders als Pumpen bilden Ionenkanäle durchgehende Poren durch die Membran, die sich öffnen und schließen können (Zhou *et al.* 2010). Dies kann zufällig oder durch physikalische oder chemische Stimuli erfolgen. Neben der Leitfähigkeit für bestimmte Ionen, stellt zum Anderen der Aktivierungsmechanismus der Kanäle ein wichtiges Einteilungskriterium dar. Daraus folgt eine Einteilung in z.B. liganden- und spannungsabhängige Kanäle. Zur Gruppe der ligandengesteuerten Kanäle gehört beispielsweise der nikotinische Acetylcholinrezeptor an der postsynaptischen Membran von Neuronen im Gehirn. Nach Bindung von Acetylcholin findet ein Natriumeinstrom und ein für die Depolarisation verantwortlicher Kaliumausstrom

statt (Lindstrom *et al.* 1987; Miyazawa *et al.* 1999). Neben Acetylcholin sind Serotonin, Glycin, Glutamat, zyklische Nukleotide (cAMP, cGMP) und γ -Aminobuttersäure typische Aktivatoren der ligandengesteuerten Kanäle. Eine weitere Klasse von Ionenkanälen wird durch Änderung des Membranpotentials gesteuert (spannungsabhängige Ionenkanäle) (Hodgkin *et al.* 1952; Hille *et al.* 2001). Diese Gruppe von Kanälen ist zum Beispiel für die Entstehung des Aktionspotentials verantwortlich. Diese Untergruppe umfasst allein 140 Mitglieder und gehört damit zu einer der vielfältigsten, an der Signaltransduktion beteiligten Gruppen von Proteinen (Yu *et al.* 2005).

Spannungsabhängige Kaliumionenkanäle

Die größte Vielfalt unter den Ionenkanälen weisen die Kaliumionenkanäle auf. Sie lassen sich in spannungsabhängige, Kalzium aktivierte, mechanisch aktivierte, ATP-gesteuerte und G-Protein-gekoppelte Kanäle unterteilen (Hille *et al.* 2001). Der in dieser Arbeit untersuchte Ionenkanal $K_v7.1$ zählt zu der Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Anhand ihrer Topologie lassen sich die Kanäle noch weiter unterteilen. Am Weitesten verbreitet sind hierbei die 6TM-1P-Topologien. Hierbei handelt es sich um Proteine mit 6 Transmembrandomänen (TM) sowie einer Porenschleife (P-Schleife) zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Die Porenschleife übernimmt hierbei die Funktion des Selektivitätsfilters. Dieser ist für die Ionenspezifität eines jeden Kanals verantwortlich und enthält einen konservierten Bereich von Aminosäuren. Für Kaliumkanäle ist diese Sequenz TTVGYG (Catterall 1993; Hille *et al.* 2001). Da Ionen unter physiologischen Bedingungen hydratisiert vorliegen, ist es notwendig die Hydrathülle abzustreifen bevor die engste Stelle der Kanalpore passiert werden kann. Diese Dehydratisierung wird durch Carbonylgruppen kompensiert, welche die Wandung der Kanalpore auskleiden (Bucher *et al.* 2006; Roux *et al.* 2011). Neben der 6TM-1P-Topologie sind auch einfachere Topologien, wie zum Beispiel 2TM-1P bekannt (Gutman *et al.* 2003). Zusätzlich wird die funktionelle Diversität der spannungsabhängigen Kaliumkanäle noch durch Interaktionen mit akzessorischen Proteinen wie beispielsweise Calmodulin und β -Untereinheiten erhöht (Wen *et al.* 2002; Shamgar *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2012). Durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Ubiquitinierung, Glykosylierung, Phosphorylierung) oder alternatives Spleißen kann die funktionelle Vielfalt der Kanäle noch weiter erhöht werden.

Familie der K_v7 Kanäle

Zur Familie der K_v7 Kanäle gehören fünf Mitglieder, K_v7.1 - K_v7.5. Da der Transport von Kaliumionen an einer Vielzahl wichtiger Prozesse wie Erregbarkeit, Volumenregulation und Sekretion von großer Bedeutung ist, werden auch Kaliumkanäle in fast allen pro- und eukaryotischen Zellen exprimiert. Die K_v7 Kanäle spielen dabei besonders bei der Funktion des Herzens, des Gehirns, des Gleichgewichtsorgans und von Epithelien eine große Rolle. Dementsprechend ist auch ihre Expression in den verschiedenen Geweben des Menschen sehr unterschiedlich (Gutman *et al.* 2005). In Tabelle 2 sind die fünf Mitglieder der K_v7 Familie mit dem Ort ihrer jeweiligen Expression, der Funktion sowie assoziierten Krankheitsbildern aufgelistet.

Tabelle 2: Verteilung der K_v7 Kanäle in verschiedenen Geweben. RWS-Romano Ward Syndrom; JLNS-Jervell und Lange Nielsen Syndrom; EBN1-*benign familial neonatal convulsions with myokymia*; EBN2- *benign familial neonatal convulsions*; BFNS-*benign familial neonatal seizures*; DFNA2-*autosomal dominant nonsyndromic deafness type 2* (Tabelle nach (Gutman *et al.* 2005))

	Expression	Funktion	Krankheitsbild
K_v7.1	Herz, Cochlea, Darm, Magen, Pankreas	Repolarisation des kardialen Aktionspotentials	RWS, JLNS
K_v7.2	Gehirn, Ganglien, Lunge, Herz, Plazenta	Modulation der neuronalen Erregbarkeit, M-Strom (zusammen mit K _v 7.3)	EBN1/BFNS1
K_v7.3	Gehirn, Retina, Darm	M-Strom (zusammen mit K _v 7.2)	EBN2/BFNS2
K_v7.4	Cochlea, Plazenta	Kaliumausstrom in den äußeren Haarsinneszellen	DFNA2
K_v7.5	Gehirn, Ganglien, Skelettmuskulatur	Modulation der neuronalen Erregbarkeit	

Wie bei den meisten Kaliumkanälen sind auch die α -Untereinheiten der K_v7-Familie aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut (siehe Abb. 1). Der Amino- und der Carboxy-Terminus jeder Untereinheit sind intrazellulär lokalisiert (Panaghie *et al.* 2007). Für die Assemblierung eines funktionellen Kanals werden vier Untereinheiten benötigt, welche im Gegensatz zu Natrium- und Kalziumkanälen nicht aus einem Polypeptid gebildet werden, sondern aus vier getrennt synthetisierten Untereinheiten. Für die Interaktion der einzelnen Untereinheiten sind Bereiche im C-Terminus verantwortlich, welche als SID (engl. *subunit interaction domain*)

bezeichnet werden (Schwake *et al.* 2003). Die Bildung des Kanals erfolgt dabei zuerst über die Dimerisierung zweier Untereinheiten, welche dann wiederum mit einem Dimer zu einem symmetrischen Tetramer assemblieren. Dieser Vorgang ist ebenfalls für den Transport der Kanalproteine an die Plasmamembran von Bedeutung (Papazian 1999; Wiener *et al.* 2008). Veränderungen der K_v7 Kanäle führen zu schweren Auswirkungen auf den Organismus. Mutationen innerhalb der für K_v7 kodierenden Gene führen zu vererbaren Krankheiten, welche als Kanalkrankheiten (engl. *channelopathies*) bezeichnet werden (Ashcroft 2000; Brown 2008). Eine durch Mutationen im *KCNQ1* Gen, das für den Kanal $K_v7.1$ kodiert, hervorgerufene Krankheit wird als Long-QT-Syndrom 1 (LQT1) bezeichnet. Das Krankheitsbild ist assoziiert mit einer Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm und damit einhergehenden Herzrhythmusstörungen (Wang *et al.* 1996).

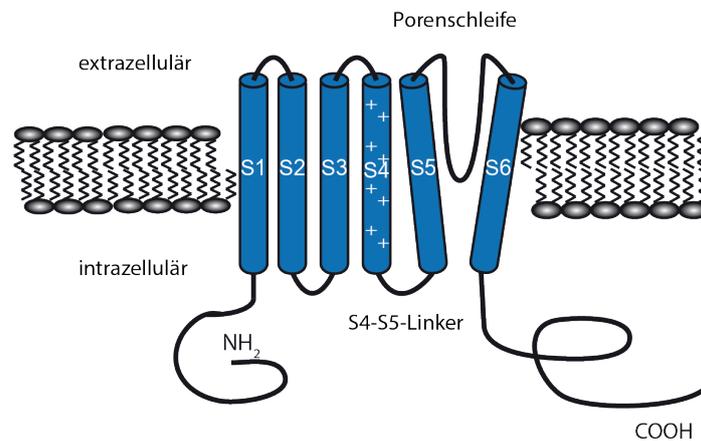


Abb. 1 Schematischer Aufbau einer K_v7 -Kanal- α -Untereinheit. N- und C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. S1-S6 kennzeichnen die sechs Transmembrandomänen. Der Spannungssensor in S4 enthält positive Ladungen. Membranpotential induzierte Bewegungen der S4 Transmembrandomäne werden über den S4-S5-Linker auf die Porenregion übertragen, welche durch S5 und S6 gebildet wird. Die Porenschleife, zwischen S5 und S6 enthält den Selektivitätsfilter.

Die Diversität der Kaliumkanäle wird noch dadurch erhöht, indem sich nicht nur homomere sondern auch heteromere Tetramere bilden können. Die einzige Ausnahme hierbei ist $K_v7.1$. Der Grund hierfür sind Sequenzunterschiede im C-Terminus der einzelnen K_v7 Kanäle (Schwake *et al.* 2003).

Der C-Terminus von K_v7 Kanälen

Der C-Terminus der K_v7 Ionenkanäle macht, mit einer Länge von 300-500 Aminosäuren fast die Hälfte des Molekulargewichts einer α -Untereinheit aus. Er ist verantwortlich für den Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran, sowie für die Oligomerisierung der Untereinheiten (Wiener *et al.* 2008). Weiterhin wird durch die

Interaktion mit anderen Proteinen über den C-Terminus die Kinetik des Kanals beeinflusst (Haitin *et al.* 2008). Vier helikale Bereiche im C-Terminus (Helix A-D) sind in den Mitgliedern der K_v7 Familie hoch konserviert. Im proximalen Bereich befinden sich Helix A und B, die für die Interaktion mit Calmodulin (CaM) verantwortlich sind. Die beiden Bindestellen sind hierbei auf beide Helices verteilt und werden als IQ-Motive bezeichnet (Wen *et al.* 2002; Yus-Najera *et al.* 2002; Gamper *et al.* 2003). Wie bereits beschrieben, werden durch Interaktionen im C-Terminus auch die Funktionen des Kanals beeinflusst. Eine Möglichkeit der Modulation der Kanalkinetik stellt die Interaktion mit PIP_2 (Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat) dar. Die Bindung von PIP_2 innerhalb der Helix A stabilisiert den offenen Kanalzustand von $K_v7.2$ und $K_v7.3$ und erhöht damit die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Hernandez *et al.* 2009). Im distalen Bereich des C-Terminus befinden sich zwei weitere helikale Strukturen, welche als Helix C und D bezeichnet werden. Helix C scheint für die Assemblierung der Kanaluntereinheiten, sowie für den Transport der synthetisierten Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran verantwortlich zu sein (Haitin *et al.* 2008; Wiener *et al.* 2008). Eine schematische Darstellung des Aufbaus und der Strukturen innerhalb des C-Terminus der K_v7 Familie ist in Abb. 2 dargestellt. Wie weiter oben bereits erwähnt sind die Mitglieder der K_v7 Kanalfamilie in der Lage, Heteromere aus verschiedenen Kanaluntereinheiten zu bilden. Die einzige Ausnahme hierbei ist $K_v7.1$, welcher nur Homomere bilden kann. Verantwortlich hierfür ist die Helix D, welche sich stark zwischen den einzelnen Mitgliedern unterscheidet (Schwake *et al.* 2003; Schwake *et al.* 2006). Die Interaktion der β -Untereinheiten wird ebenfalls über den distalen Bereich des C-Terminus gesteuert. Alle diese Interaktionen beeinflussen die Funktion der Kanäle. Dies kann entweder durch Modulation der Kanalkinetik erfolgen oder über Veränderungen des Kanaltransports zur Plasmamembran (Wu *et al.* 2006; Alzamora *et al.* 2010; Roura-Ferrer *et al.* 2010).

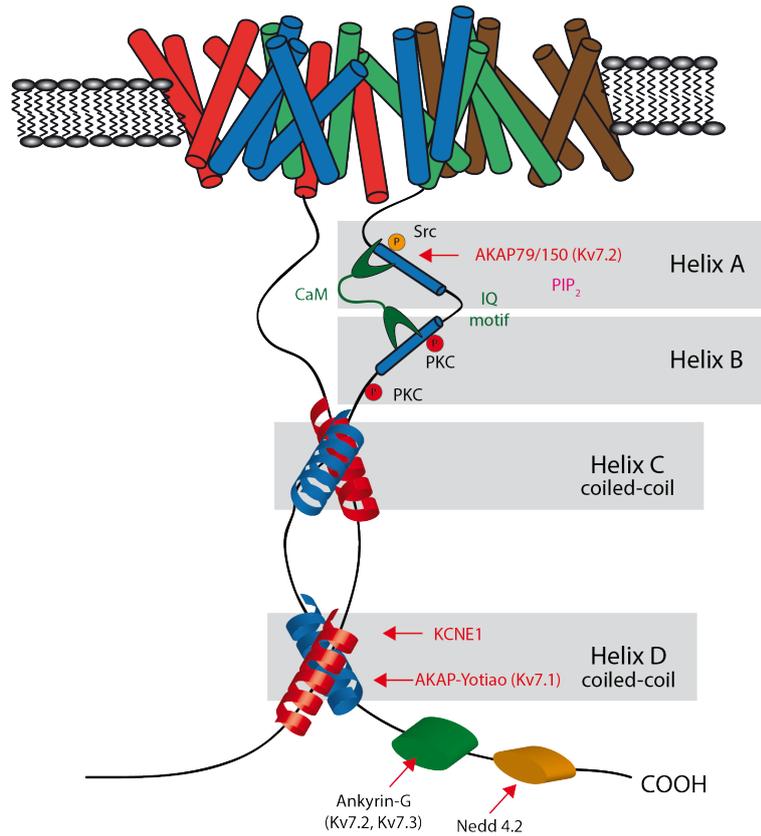


Abb. 2 Übersicht über Strukturen im C-Terminus von Kv7.1 und dessen Interaktionspartner. Es sind nur die C-Termini zweier Untereinheiten abgebildet. Src-Tyrosinkinase; CaM-Calmodulin; PKC-Proteinkinase C; PIP₂-Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat; AKAP-a kinase anchoring protein; Ankyrin-G-Adapterprotein; Nedd4.2-Ubiquitin Ligase (Abbildung modifiziert nach (Haitin *et al.* 2008).

Physiologische Funktion von Kv7.1

Kv7.1 (auch KCNQ1 oder KvLQT1) wird durch das Gen *KCNQ1* kodiert und wurde erstmals 1996 bei Untersuchungen an Patienten mit *Long-QT1*-Syndrom (LQT1) entdeckt (Wang *et al.* 1996). Die Expression konnte bisher in einer Vielzahl unterschiedlicher Organe nachgewiesen werden (Ohr, Lunge, Pankreas, Niere, Magen, Darm und Herz) (Sanguinetti *et al.* 1996; Wang *et al.* 1996; Chouabe *et al.* 1997; Neyroud *et al.* 1997). Je nach Organ erfüllt Kv7.1 dabei verschiedene physiologische Funktionen. Diese Funktionsvielfalt wird durch die Interaktion der α - mit den β -Untereinheiten (KCNE1-5) gewährleistet. Im Herzen assoziiert Kv7.1 mit KCNE1 (auch MinK) und bildet dort einen Kanalkomplex, welcher für den verzögert auswärtsgerichteten Kaliumstrom (I_{Ks}) verantwortlich ist. Dieser Strom ist größtenteils für die Repolarisation des kardialen Aktionspotentials verantwortlich (Sanguinetti *et al.* 1990; Barhanin *et al.* 1996; Sanguinetti *et al.* 1996). Das kardiale Aktionspotential lässt sich in 5 Phasen unterteilen (siehe Abb. 3) und wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Ionenströme generiert. Die Depolarisation der Membran zu Beginn des Aktionspotentials wird

durch einen Natriumeinstrom ausgelöst. Die teilweise Repolarisation ist auf die Inaktivierung der Natriumkanäle und eine Aktivierung von Kaliumkanälen zurückzuführen. Die darauffolgende terminale Repolarisation wird durch einen Kalziumeinwärtstrom sowie einen Kaliumauswärtstrom gewährleistet (Tamargo *et al.* 2004). Der auswärts gerichtete Kaliumstrom (I_K) setzt sich hierbei aus zwei Komponenten zusammen, dem schnell aktivierenden (I_{Kr}) und den langsam aktivierenden (I_{Ks}) (Tamargo *et al.* 2004). Der Kanalkomplex aus $K_v7.1$ und $KCNE1$ ist die molekulare Grundlage für den langsam auswärts-gerichtenden Kaliumstrom (I_{Ks}) (Sanguinetti *et al.* 1990; Barhanin *et al.* 1996). Beide Komponenten sind für die Terminierung des Aktionspotentials verantwortlich und bestimmen somit die Aktionspotentialdauer. Das sich anschließende Ruhemembranpotential wird durch einwärts-gleichrichtende Kaliumströme reguliert (Tamargo *et al.* 2004). Ein Funktionsverlust von $K_v7.1$ und $KCNE1$ führt zu einem Verlust der normalen Herzrhythmickeit und zu einem verlängerten QT-Intervall im EKG. Aufgrund des Phänotyps wird diese Form der Herzrhythmusstörung als *Long-QT-Syndrom* (LQT) bezeichnet. Die Ursache von LQT ist eine verzögerte Repolarisation des kardialen Aktionspotentials verursacht durch eine Funktionsstörung der beteiligten Proteine. Diese Arrhythmien können Synkopen oder den plötzlichen Herzstillstand verursachen (Wang *et al.* 1996; Priori *et al.* 2001). Als molekulare Grundlage wird oftmals ein Veränderter Transport des Kanals zur Plasmamembran diskutiert (Harmer *et al.* 2014).

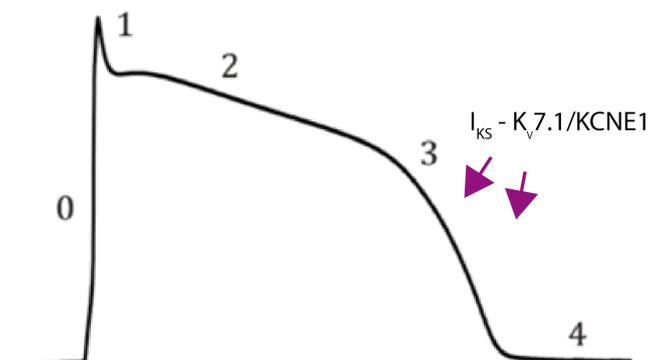


Abb. 3 Die 5 Phasen des kardialen Aktionspotentials. Phase 0 – Depolarisation; Phase 1 – partielle Repolarisation; Phase 2 – Plateau-Phase; Phase 3 – terminale Repolarisation; Phase 4 – einstellen des Ruhemembranpotentials (Abb. Modifiziert nach (Tamargo *et al.* 2004).

Modulation der Kanalaktivität mittels der β -Untereinheiten

Wie bereits beschrieben ist der C-Terminus der K_v7 Kanäle von entscheidender Bedeutung für die Interaktion mit anderen Proteinen. In Zellen assoziieren die α -Untereinheiten der K_v7

Kanäle mit wichtigen akzessorischen Proteinen, welche als KCNE Proteine oder auch als β -Untereinheiten bezeichnet werden. Von diesen Proteinen sind bislang 5 Mitglieder identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um kleine Typ-1 Transmembranproteine, die aufgrund ihrer Struktur, selbst nicht in der Lage sind einen Kanal zu bilden (McCrossan *et al.* 2004). Die gewebespezifische Assemblierung der β -Untereinheiten mit z.B. $K_v7.1$ führt zu einer Veränderung in der Kinetik des Kanals (siehe Abb. 4) und hat Auswirkungen auf den Transport des Kanals zur Plasmamembran (Wu *et al.* 2006; Roura-Ferrer *et al.* 2010). Das erste Mitglied der KCNE Familie wurde 1988 entdeckt und als MinK (*minimal K⁺ channel protein*) bezeichnet. Es wurde für einen spannungsabhängigen und sehr langsam aktivierenden Kaliumstrom verantwortlich gemacht (Takumi *et al.* 1988). Erst später wurde entdeckt, dass nicht MinK selbst, sondern die Assemblierung mit $K_v7.1$ für diesen sehr langsam aktivierenden Kaliumstrom verantwortlich ist (Barhanin *et al.* 1996; Sanguinetti *et al.* 1996). Neben der Interaktion von $K_v7.1$ mit MinK (KCNE1) wurden auch die Interaktionen mit den weiteren 4 Mitgliedern der KCNE Familie beschrieben (Bendahhou *et al.* 2005; Wrobel *et al.* 2012). Die Stöchiometrie zwischen den α - und β -Untereinheiten wurde in den letzten Jahren vermehrt untersucht und wird aktuell für $K_v7.1$ und KCNE1 mit 4:2 (α : β) beschrieben (Nakajo *et al.* 2010; Plant *et al.* 2014).

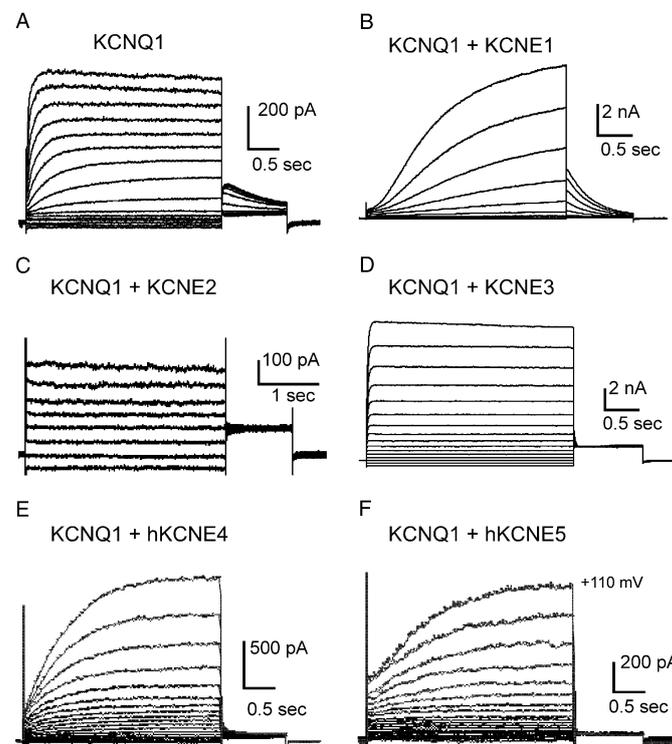


Abb. 4 Einfluss der β -Untereinheiten auf $K_v7.1$ (KCNQ1). Cos7 Zellen wurden mit $K_v7.1$ allein oder zusammen mit KCNE1-5 exprimiert. Die Stöme wurden mittels Patch-Clamp-Technik aufgezeichnet. (Abbildung aus (Bendahhou *et al.* 2005).

Funktion von Ionenkanälen in der Proliferation und Apoptose

Ionenkanäle spielen, wie bereits beschrieben, nicht nur in der Regulation und Stabilisierung des Membranpotentials eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Aufrechterhaltung des Zellvolumens sowie der Progression durch den Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose (Kunzelmann 2005). Je nach Lokalisation des Ionenkanals, der Spezifität oder der Art der Aktivierung üben die Ionenkanäle unterschiedliche Effekte auf die Zelle aus:

- I. Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration und damit verbunden eine Aktivierung der Apoptose (Takei *et al.* 1994).
- II. Ionenfluss zwischen Zytosol und Mitochondrium und einer daraus resultierenden pro- oder anti-apoptischen Wirkung je nach Ionenkanal.
- III. Permeabilisierung der Membran für größere Moleküle z.B. Cytochrom c.
- IV. Kalium- und Kalziumausstrom und dadurch bedingt ein Schrumpfen der Zelle (Bortner *et al.* 1997; Yu *et al.* 1997).

Neben den oben beschriebenen pro- und antiapoptischen Effekten sind Ionenkanäle auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Hierbei spielt vor allem die Ionenverteilung sowie das Membranpotential eine entscheidende Rolle (Urrego *et al.* 2014). Bereits 1984 wurde erstmals der inhibitorische Effekt von Kaliumkanalblockern auf die Proliferation von T-Lymphozyten beschrieben (DeCoursey *et al.* 1984). Dieser Effekt wurde bis heute für verschiedenen Gewebe- und Zelltypen bestätigt (Takahashi *et al.* 1993; Arcangeli *et al.* 1995).

Apoptose

In der Biologie wird der Begriff Apoptose gebraucht, um das Absterben von Zellen nach einem definierten Programm zu beschreiben, daher spricht man auch von programmiertem Zelltod (Kerr *et al.* 1972). Hierbei handelt es sich um einen schnellen Prozess, dessen Aktivierung sowie Ausführung streng reguliert wird (Chinnaiyan *et al.* 1997; Irmeler *et al.* 1997; Wu *et al.* 1997). Apoptose ist ein evolutionär hoch konservierter Mechanismus mit einer besonderen Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase (Vaux *et al.* 1988; Raff 1998). Durch diesen Mechanismus ist es der Zelle möglich, sich ohne Schädigung des Nachbargewebes aus dem Zellverbund zu lösen und zu Grunde zu gehen (Ellis *et al.* 1991). Über diese Form des altruistischen Zelltodes verfügt jede Zelle im menschlichen Körper (Jacobson *et al.* 1997). Verschiedene morphologische und biochemische Veränderungen definieren die Apoptose. Zu den morphologischen Veränderungen zählen das Schrumpfen der Zelle, die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen sowie die Kondensation des Chromatins, wobei die Membranintegrität erhalten bleibt. Im fortgeschrittenem Verlauf kommt es zur Abschnürung von Membranvesikeln, welche Bestandteile der Zelle enthalten und durch phagozytierende Zellen aufgenommen werden können. Hierdurch wird verhindert, dass zytosolische

Bestandteile in den extrazellulären Raum gelangen und somit eine inflammatorische Antwort ausgelöst werden kann (Hengartner 2000; Maeno *et al.* 2000; Kroemer *et al.* 2005). Biochemische Veränderungen wie beispielsweise die Aktivierung von Caspasen, der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Exposition von Phosphatidylserin an der Plasmamembran sind weitere Anzeichen der Apoptose (Schutte *et al.* 1998; van Engeland *et al.* 1998; Tafani *et al.* 2001). Hierbei handelt es sich jedoch meist nicht um einen *Point-of-no-return* Mechanismus, sondern viele dieser Prozesse sind, bis zu einem bestimmten Punkt, reversibel (Yang *et al.* 2002; de Graaf *et al.* 2004; Kroemer *et al.* 2005). Die Dysregulation der Apoptose spielt bei verschiedenen Krankheitsbildern eine wichtige Rolle. Eindeutig belegt ist der Zusammenhang zwischen Suppression der Apoptose und der malignen Entartung von Zellen (Vermeulen *et al.* 2005). Apoptosesignalwege können entweder durch inaktivierende Mutationen pro-apoptotischer Gene oder durch Überexpression antiapoptotischer Gene gehemmt werden. Die so veränderten Zellen entziehen sich sowohl der Selbst- als auch der Kontrolle durch das Immunsystem. Apoptose kann über zwei Signaltransduktionswege ausgelöst werden, welche als extrinsischer- und intrinsischer Weg bezeichnet werden (Fulda *et al.* 2006). Beide Signalwege aktivieren eine Vielzahl von proteolytischen Enzymen, so genannte Caspasen, welche für den Abbau der zellulären Architektur verantwortlich sind.

Caspasen

Caspasen gehören zu einer evolutionär konservierten Familie von Aspartat-spezifischen Cystein-abhängigen Proteasen mit zentralen Funktionen in apoptotischen und inflammatorischen Signalwegen (Lamkanfi *et al.* 2007). Die Geschichte der Caspasen begann mit der Entdeckung des *ced-3* Gens in *C.elegans* und dessen Homologen im Menschen, dem Interleukin-1 prozessierenden Enzym (ICE). Später wurde entdeckt, dass die Überexpression von ICE, später umbenannt in Caspase-1, ausreicht um Apoptose auszulösen (Yuan *et al.* 1990; Cerretti *et al.* 1992; Thornberry *et al.* 1992). Alle Caspasen besitzen Gemeinsamkeiten in ihrer Substratspezifität, Struktur und Aminosäuresequenz. Sie werden als inaktive Proenzyme (Zymogene), bestehend aus einer Prodomäne, einer großen Untereinheit (p20) und einer kleinen Untereinheit (p10) synthetisiert (siehe Abb. 5) (Degterev *et al.* 2003; Degterev *et al.* 2008). Die Aktivierung der Zymogene erfolgt durch mehrere proteolytische Spaltungen, wobei zuerst die kleine und die große Untereinheit getrennt und erst danach die Prodomäne entfernt wird (Ramage *et al.* 1995; Yamin *et al.* 1996). Aktive Caspasen formen jeweils ein Heterotetramer aus zwei identischen großen und zwei kleinen Untereinheiten, wobei sich die beiden Heterodimere in einer Kopf-zu-Schwanz-Konfiguration ausrichten (Rupinder *et al.* 2007).

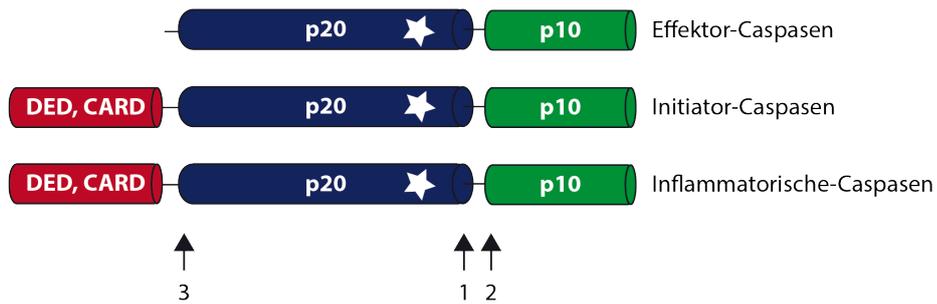


Abb. 5 Aufbau der Caspasen. Dargestellt ist der vereinfachte Aufbau der verschiedenen Typen von Caspasen. Die Pfeile geben den Ort und die Reihenfolge der Aktivierung an. Der Stern kennzeichnet den Cysteinrest im aktiven Zentrum. DED-death effector domain; CARD-caspase recruitment domain; p20-große Untereinheit; p10-kleine Untereinheit (Abbildung modifiziert nach (Degterev *et al.* 2003; Degterev *et al.* 2008)).

Aufgrund ihrer Struktur und Funktion werden Caspasen in drei Gruppen unterteilt: die Initiator-, Effektor und inflammatorische Caspasen (siehe Abb. 5). Inflammatorische Caspasen (Caspase-1, -4 und -5) sind z.B. verantwortlich für die Spaltung von Interleukin-1 β (Sansonetti *et al.* 2000). Initiator Caspasen sind verantwortlich für die Spaltung von Effektor Caspasen, die dann wiederum für die Prozessierung anderer zellulärer Proteine verantwortlich sind (siehe Abb. 6).

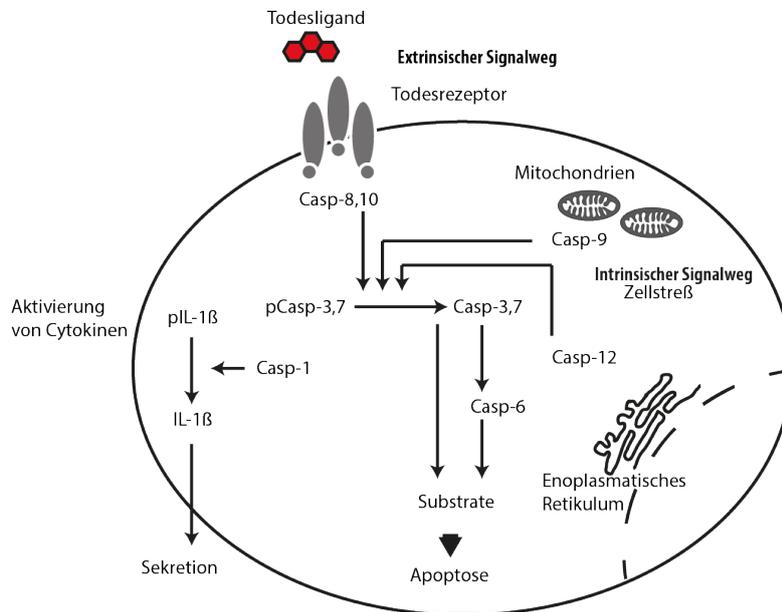


Abb. 6 Aktivierung von Caspasen durch den extrinsischen- und intrinsischen Signalweg. (Abbildung modifiziert nach (Grutter 2000))

1.1.1 Extrinsischer Signaltransduktionsweg

Der Begriff „extrinsisch“ bezeichnet eine Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch Stress-Signale von außerhalb der Zelle. Diese Signale werden durch Transmembranrezeptoren an die Zelle weitergeleitet (siehe Abb. 7). Die Entdeckung eines extrinsischen Signalweges geht zurück auf einen deutschen Wissenschaftler, Dr. P. Bruns, welcher 1868 die hemmende Wirkung einer bakteriellen Infektion auf das Wachstum von Geschwulsten beschrieb (Bruns 1868). Erst ein Jahrhundert später wurde der Tumornekrosefaktor (TNF) isoliert und für die apoptotische Wirkung verantwortlich gemacht. Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Todesliganden (TRAIL, FasL, TNF) an die entsprechenden Todesrezeptoren (DR4/5, FAS, TNF-R1) induziert. Die Rezeptoren DcR1-3 sind zwar ebenfalls in der Lage Liganden mit hoher Affinität zu binden, jedoch wird dadurch keine Apoptose induziert. Die Stabilität von spontan gebildeten FAS-Rezeptor Trimeren wird durch die Bindung des Liganden noch verstärkt (Siegel *et al.* 2000; Fulda *et al.* 2006). Aufgrund der Bindung des Todesliganden an den Todesrezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Assemblierung von Multiproteinkomplexen auf der zytosolischen Seite der Membran erlaubt (siehe Abb. 7). Diese Assemblierung wird durch eine 80 Aminosäure lange Sequenz (DD engl. *Death Domain*) ermöglicht, welche bei allen Todesrezeptoren vorhanden ist (Boldin *et al.* 1995; Schulze-Osthoff *et al.* 1998). Dieser proapoptotische Multiproteinkomplex, bezeichnet als DISC (engl. *Death Inducing Signaling Complex*), reguliert die Aktivierung von Caspase-8 und -10, welche durch ein Adapterprotein FADD (engl. *FAS-associated protein with DD*) an die zytoplasmatische Todesdomäne des Todesrezeptors binden (Kischkel *et al.* 1995; Wang *et al.* 2001). Die aktivierten Initiatorcaspasen können in Typ I-Zellen (z.B. Lymphozyten) direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen führen, was zur Spaltung von Todessubstraten wie ICAD (engl. *Inhibitor of Caspase Activated DNase*) oder PARP (Poly-(ADP-ribose)-polymerase) und letztendlich zur Fragmentierung der DNA führt. In Typ II-Zellen (z.B. Melanozyten) wird das Signal durch die Spaltung von Bid zu tBid (engl. *truncated Bid*) an der Mitochondrienmembran amplifiziert (Li *et al.* 1998; Luo *et al.* 1998). Neben der Aktivierung der Caspasesignalkaskade können auch NF- κ B Signalwege aktiviert werden, was einen antiapoptotischen Effekt zur Folge hat (siehe Abb. 7). Hierdurch ist es der Zelle möglich, dem Zelltod zu entgehen.

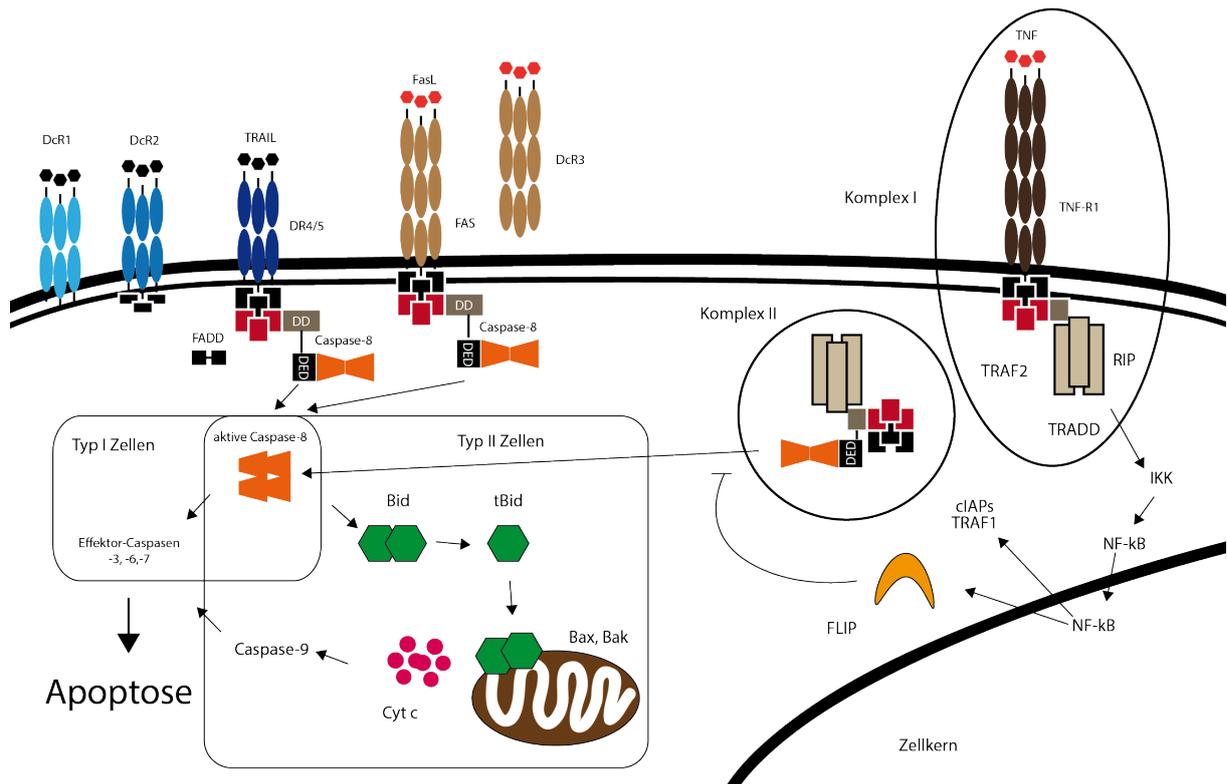


Abb. 7. Gezeigt ist der extrinsische Signalweg der Apoptose. Dargestellt ist die Assemblierung der verschiedenen Todesrezeptoren nach Bindung ihrer Liganden. Hierdurch wird innerhalb der Zelle eine Kaskade ausgelöst, welche zur Aktivierung verschiedener Caspasen (Caspase-8 und -10) führt. Am Ende der Kaskade steht die Aktivierung der Effektor-Caspasen und damit verbunden die Induktion der Apoptose. Gleichzeitig kann die Bindung der Todesliganden an ihrer Rezeptoren auch zur Aktivierung von antiapoptotischen Signalen führen (NFκB, FLIP, cIAPs). DD - death domain; DED – death effector domain; DcR - decoy receptor; FADD - Fas associated death domain; tBid - truncated Bid; Bid - BH3 interacting-domain death agonist; Cyt c - Cytochrome c; cIAP - cellular inhibitor of apoptosis; NFκB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TNF - Tumor Necrosis Factor; TRADD - TNF receptor associated death domain; TRAF - TNF receptor associated factor; FLIP - FLICE inhibitory protein; Komplex I führt zur Aktivierung von antiapoptotischen Genen; Komplex II wirkt proapoptotisch. (Abbildung modifiziert nach (Gewirtz et al. 2007))

1.1.2 Intrinsischer Signaltransduktionsweg

Neben dem oben beschriebenen extrinsischen Signalweg ist die Zelle auch in der Lage auf Veränderungen zu reagieren, welche nicht durch Liganden vermittelt werden. In diesem als intrinsisch bezeichnetem Signalweg sind die Mitochondrien von besonderer Bedeutung (siehe Abb. 8). Ausgelöst wird der intrinsische Signalweg durch eine Vielzahl von Faktoren, darunter Schädigung der DNA, oxidativer Stress, Hypoxie, erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol und Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen (Kroemer et al. 2007; Tait et al. 2010). Der Prozess beginnt mit der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (engl. *MOMP-mitochondrial outer membrane permeabilisation*) und damit zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ausgelöst durch Bak und Bax, beides Mitglieder der Bcl-2 Familie. Damit verbunden kommt es zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren (Cyt c – Cytochrom c, Diablo - direct IAP binding protein with low pI, AIF – apoptosis-inducing factor, ENDOG –

Endonuklease G, HTRA2 – Serinprotease 2) aus dem Mitochondrium in das Zytosol der Zelle (Gonzalvez *et al.* 2010). Die Freisetzung von Cytochrom c führt zur Bindung an den Apaf-1 (engl. *apoptotic protease-activating factor-1*), was wiederum zu einer Oligomerisierung beider Faktoren führt. Die Anlagerung von Caspase-9 an den Komplex führt dann schließlich zur Bildung des sogenannten Apoptosoms (siehe Abb. 8). Hierdurch wird Caspase-9 aktiviert, was wiederum zur Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase-3 führt (Li *et al.* 1997; Zou *et al.* 1997). Die Ausstoß von Cytochrom c gilt aufgrund der dafür notwendigen Porenbildung als irreversibler Schritt (Tait *et al.* 2010). Die Freisetzung von Diablo/SMAC (engl. *second mitochondrial activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI*) und AIF (engl. *apoptosis inducing factor*) spielt neben der Freisetzung von Cytochrom c eine weitere wichtige Rolle. Diablo besitzt eine proapoptotische Funktion, indem es die Aktivität von physiologischen Caspaseinhibitoren, den sogenannten cIAPs (engl. *cellular inhibitor of apoptosis proteins*) blockiert (siehe Abb. 8) (Du *et al.* 2000; Srinivasula *et al.* 2000). Neben dem Caspase abhängigen intrinsischen Signalweg existiert noch ein weiterer, als Caspase unabhängiger Signalweg bezeichneter Mechanismus. Dieser wird hauptsächlich durch die Faktoren AIF, ENDOG und HTRA2 verursacht. Hierbei translozieren AIF und ENDOG (Endonuklease G) in den Zellkern und sind dort für die Fragmentierung der DNA verantwortlich (siehe Abb. 8) (Li *et al.* 2001; Buttner *et al.* 2007).

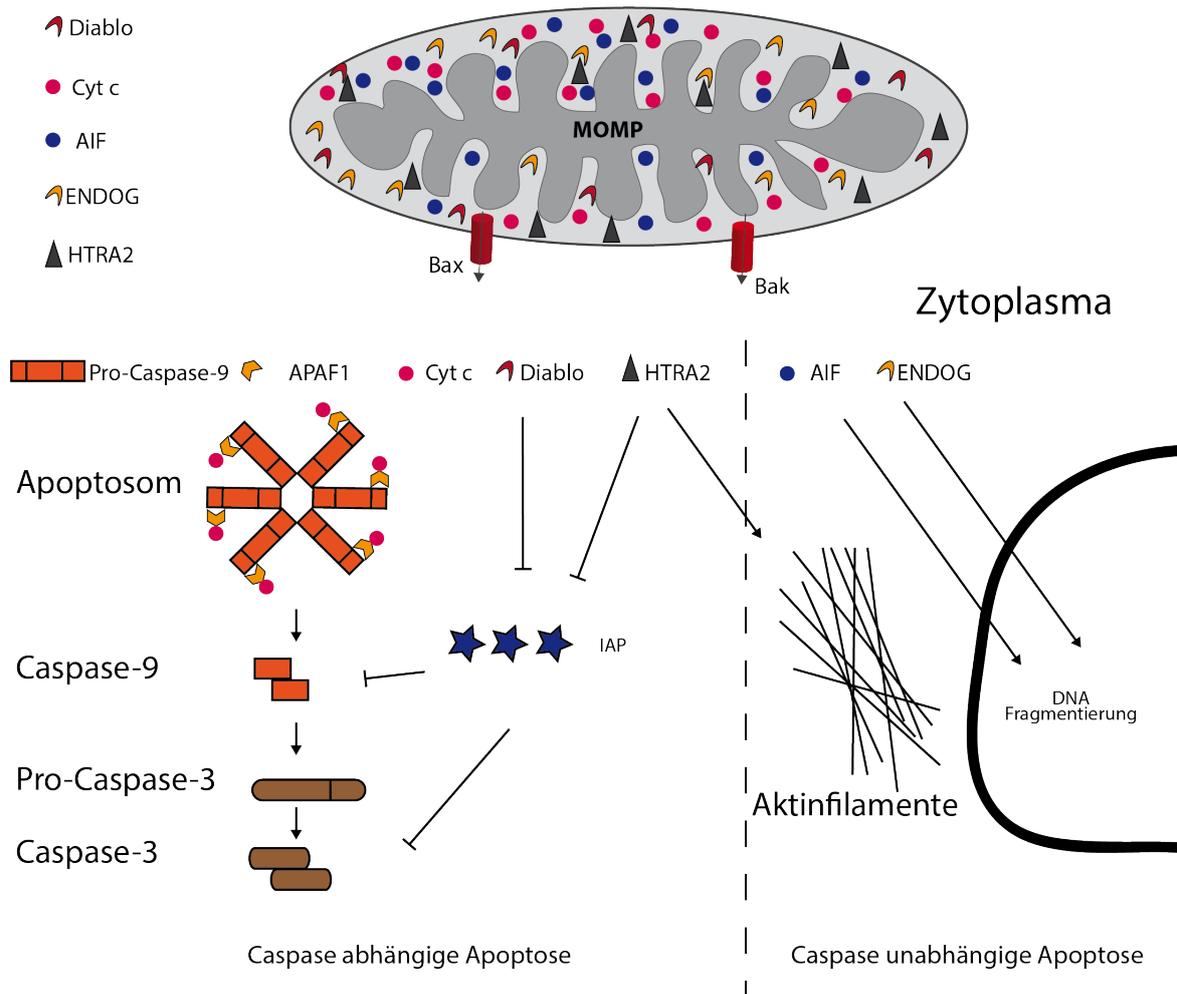


Abb. 8 Dargestellt ist der intrinsische Signalweg der Apoptose. Aufgrund der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung von Cyt c – Cytochrom c, Diablo - *direct IAP binding protein with low pI*, AIF – *apoptosis-inducing factor*, ENDOG – Endonuklease G, HTRA2 – Serinprotease 2. Dies führt auf der einen Seite durch die Bildung des Apoptosom durch Pro-Caspase-9, APAF1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) und Cytochrom c, zu einer Caspase abhängigen Apoptose indem Caspase-9 aktiviert wird, welche daraufhin Caspase-3 aktiviert. Auf der anderen Seite führt die Fragmentierung der DNA durch AIF und ENDOG zu einem Caspase unabhängigen Zelltod. Diablo besitzt eine proapoptotisch Funktion, da es die antiapoptotische Wirkung von IAP (*inhibitor of apoptosis*) inhibiert. Die Serinprotease HTRA2 wirkt sowohl auf den Caspase unabhängigen Zelltod durch Proteolyse der Aktinfilamente als auch auf den Caspase abhängigen Zelltod durch die Fragmentierung von IAP. (Abbildung modifiziert nach (Galluzzi *et al.* 2012).

SMAC/Diablo

Da die Induktion der Apoptose und die damit verbundene Aktivierung von Caspasen für die Zelle enorme Konsequenzen hat, unterliegt dieser Prozess einer strikten Kontrolle. Eine Möglichkeit, dem Zelltod zu entgehen, besteht in der Inhibierung von Caspasen. Dafür verantwortlich sind die so genannten cIAPs (engl. *cellular inhibitor of apoptosis proteins*). Allen diesen Proteinen gemein sind die BIR-Domänen (engl. *baculovirus IAP repeat*). BIR-Domänen sind kompakte Zink-bindende Strukturen, bestehend aus etwa 70 Aminosäuren, die aus vier α -

Helices und drei β -Strängen gebildet werden und konservierte Cystein- und Histidin-Reste aufweisen. BIR-Domänen sind essenziell für die antiapoptotischen Eigenschaften der cIAPs (Riedl *et al.* 2004). CIAPs wiederum werden durch Antagonisten reguliert von denen aktuell vier bekannt sind, SMAC/Diablo, HTRA2, XAF1 (engl. *XIAP-associated factor*) und NRAGE (engl. *neurotrophin-receptor-interacting melanoma antigen gene homologue*). Diablo wird mittels einer N-terminalen mitochondrialen Importsequenz nach der Synthese in die äußere Membran von Mitochondrien integriert. Nachdem Diablo in die Mitochondrien gelangt ist, wird der N-Terminus proteolytisch entfernt. Dieser Vorgang ist wichtig für die spätere Funktion und die Interaktion mit antiapoptotischen Faktoren (Du *et al.* 2000). Durch alternatives Spleißen der RNA von Diablo entsteht eine weitere Isoform, welche als Diablo-S (*Diablo-short*) bezeichnet wird. Einziger Unterschied beider Isoformen ist das Fehlen der mitochondrialen Importsequenz und vier darauffolgende Aminosäuren in Diablo-S (Srinivasula *et al.* 2000). Im Gegensatz zu Diablo zeigt Diablo-S eine geringe Affinität zu den BIR-Domänen der antiapoptotischen Faktoren (Srinivasula *et al.* 2000).

Proteolyse

Wie bereits bei den Prozessen der Apoptose oder der Maturierung von Diablo beschrieben, spielt die proteolytische Prozessierung für die Funktion von Proteinen eine entscheidende Rolle. Auch Vorgänge der Signaltransduktion wären ohne Proteolyse nicht denkbar. Unter Proteolyse versteht man zum Einem die enzymatische Hydrolyse von Proteinen durch Peptidasen und zum Anderen die autokatalytische Spaltung von Proteinen. Sie gehört zu den posttranslationalen Modifikationen von Proteinen wie auch Phosphorylierung, Glykosylierung, Ubiquitynylierung oder das Anbringen von GPI-Ankern und viele weitere mehr (Wang *et al.* 2014). Was die Proteolyse allerdings von all diesen Modifikationen unterscheidet und damit einzigartig macht, ist die Irreversibilität dieses Prozesses. Bisher sind über 500 proteolytisch aktive Enzyme bekannt (Puente *et al.* 2004; Puente *et al.* 2005). Sie werden Proteasen oder Peptidasen genannt. Die Funktionen umfassen zum Einen den vollständigen Abbau der Proteine und Peptide zu Aminosäuren (AS) (Sakamoto 2002) und zum Anderen auch die limitierte Proteolyse, z.B. im Rahmen von Gerinnung und der Aktivierung von Proteinvorstufen (Brown *et al.* 1997; Hampton 2002; Duvernay *et al.* 2013). Die limitierte Proteolyse kann Eigenschaften von Proteinen modifizieren und neue Eigenschaften generieren. Sie stellt damit eine eigene Regulationsebene des Zellstoffwechsels dar. Einige membranständige Proteasen haben auch Rezeptorfunktionen und spielen eine Rolle in der interzellulären Kommunikation, sowohl über ihre Substrate als auch über den direkten Zell-Zell-Kontakt. Ektopeptidasen haben in diesem Rahmen zentrale Bedeutung in komplexen Prozessen wie Zelldifferenzierung, Blutdruck- und Immunregulation (Schlondorff *et al.* 1999; Mullberg *et al.* 2000; Baran *et al.*

2013). Die Proteolyse von Ionenkanälen ist ein noch wenig untersuchter Prozess, welcher aber neben den bisher beschriebenen Modifikationen entscheidend zur Funktionsvielfalt der Kanäle beiträgt. Hierbei kann es sowohl zur Aktivierung als auch zur Inaktivierung von Kanälen durch proteolytische Spaltung kommen (Armstrong *et al.* 1973; Antz *et al.* 1998; Garcia-Caballero *et al.* 2008). Ein Beispiel für die Modifikation von Ionenkanälen und die Vielfältigkeit ihrer Funktion ist die Spaltung von Polycystin-1. Hierbei handelt es sich um ein Glykoprotein, das zusammen mit Polycystin-2 einen nicht selektiven Kationenkanal bildet. Die Proteolyse von Polycystin-1 setzt hierbei ein Peptid frei, welches als Transkriptionsfaktor regulatorischen Einfluss hat (Carattino *et al.* 2006; Bertuccio *et al.* 2009; Kleyman *et al.* 2009). Die Prozessierung der β -Untereinheiten ist eine weitere Möglichkeit die Funktion von Ionenkanälen zu beeinflussen. So werden z.B. KCNE1 und KCNE2, die β -Untereinheiten der K_v7 Kanäle, entweder durch α -Sekretasen und den γ -Sekretase-Komplex oder durch BACE1 und den γ -Sekretase-Komplex proteolytisch gespalten (Sachse *et al.* 2013). BACE1 ist ebenso verantwortlich für die Spaltung der $\beta 2$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals Na_v1 (Kim *et al.* 2007). Hierbei führt die Proteolyse der $\beta 2$ -Untereinheit von Na_v1 einerseits zu einer gesteigerten Expression der α -Untereinheit, andererseits jedoch zu einem verminderten Transport an die Plasmamembran und daraus resultieren zu einem verminderten Natriumstrom (Kim *et al.* 2007). Ähnlich Konsequenzen hat die Proteolyse von KCNE1. Zusammen mit $K_v7.1$ ist der Kanalkomplex verantwortlich für die Repolarisation des kardialen Aktionspotentials. Die Spaltung von KCNE1 führt hierbei zu einer verminderten Repolarisation und damit zu einer Störung der normalen Herzfunktion (Sachse *et al.* 2013).

2 Fragestellung

In Vorarbeiten der AG Schwake wurden für den spannungsabhängigen Kaliumkanal $K_v7.1$ zwei Fragmente der α -Untereinheit beschrieben. Das erste, als CTF1 (C-terminales Fragment 1) bezeichnete Fragment besitzt ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa. Das zweite, in dieser Arbeit als CTF2 bezeichnete Fragment, ist mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa kleiner als CTF1. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der, für die Entstehung der Spaltfragmente verantwortlichen Proteasen. Weiterhin sollte die genaue Position, an der die regulierte Proteolyse stattfindet, untersucht werden. Da die proteolytische Spaltung von Proteinen von großer Bedeutung für die Funktion und die Funktionsvielfalt eines Proteins ist, sollte auch die physiologische Relevanz der Prozessierung von $K_v7.1$ aufgeklärt werden. Neben diesen, meist auf zelluläre Systeme angewandten Untersuchungen, sollte die Spaltung von $K_v7.1$ auch unter verschiedenen Bedingungen in Organen der Maus untersucht werden. Hierdurch sind weitere Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung der regulierten Proteolyse des spannungsabhängigen Kaliumkanals $K_v7.1$ zu erwarten.

Die hohe Funktionsvielfalt der Ionenkanäle wird durch die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht. Für $K_v7.1$ wurden bereits diverse Interaktionspartnern identifiziert und näher charakterisiert. Viele diese Interaktionen werden über den C-Terminus des Kanals vermittelt. Neben den Untersuchungen zur regulierten Proteolyse bestand ein weiterer Teil dieser Arbeit in der Identifikation neuer Interaktionspartner. Hierdurch sollte die Funktion von $K_v7.1$ an weiteren zellulären Prozessen untersucht und aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen* durchgeführt.

3 Methoden

Molekularbiologische Methoden

3.1.1 cDNA Konstrukte

Für die Expression der K_v7.1 Konstrukte in eukaryotischen Zellen wurde der Vektor pFrog verwendet, welcher eine Abwandlung des pcDNA3 Vektors (Invitrogen, Karlsruhe) ist. Der Vektor enthält die 5'- und 3'- untranslatierten Bereiche des β -Globingens von *Xenopus leavis*, was für eine bessere Expression in Oozyten sorgt, sowie eine Ampicillin- und Neomycinresistenskassette und einen T7 Promotor (Gunther *et al.* 1998).

Neben der Expression eignet sich der Vektor auch für die Synthese von cRNA. Um die verwendeten Konstrukte später nachweisen zu können, wurden diese C-terminal mit einem Myc-oder HA-Tag fusioniert. Mutation einzelner Nukleotide sowie die Deletion von Nukleotiden wurde mittels der Polymerase Kettenreaktion erzeugt.

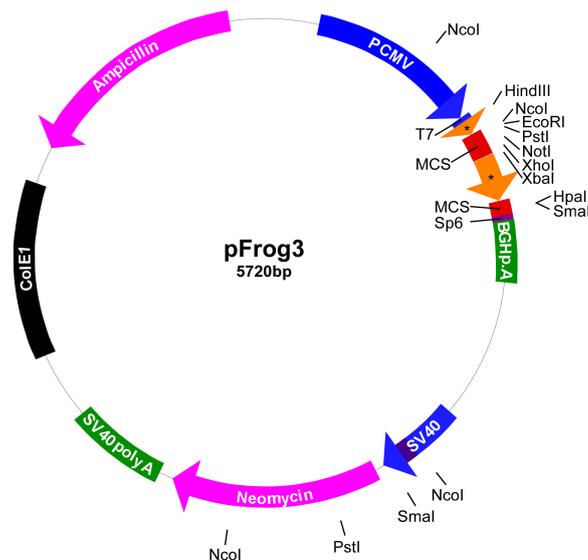


Abb. 9 Schematische Darstellung des Vektors pFrog. (Abbildung nach (Gunther *et al.* 1998).

3.1.2 Polymerase Kettenreaktion

Mutationen und Deletionen wurden standardmäßig durch Mutagenese mittels zweistufiger PCR-Strategie generiert. Die verwendete *Pfu-Polymerase* (Thermo Scientific) wurde verwendet, da diese über einen Korrekturmechanismus verfügt, was zu einer hohen Effizienz der PCR führt. Im ersten Schritt wurde mittels zweier Primer A und D sowie C und B zwei kurze sich überlappende dsDNA Fragmente hergestellt (Abb. 10), als Matrize diente dsDNA. Die beiden PCR Produkte dienten als Matrize für die nächste Reaktion in der die Primer A und B verwendet wurden.

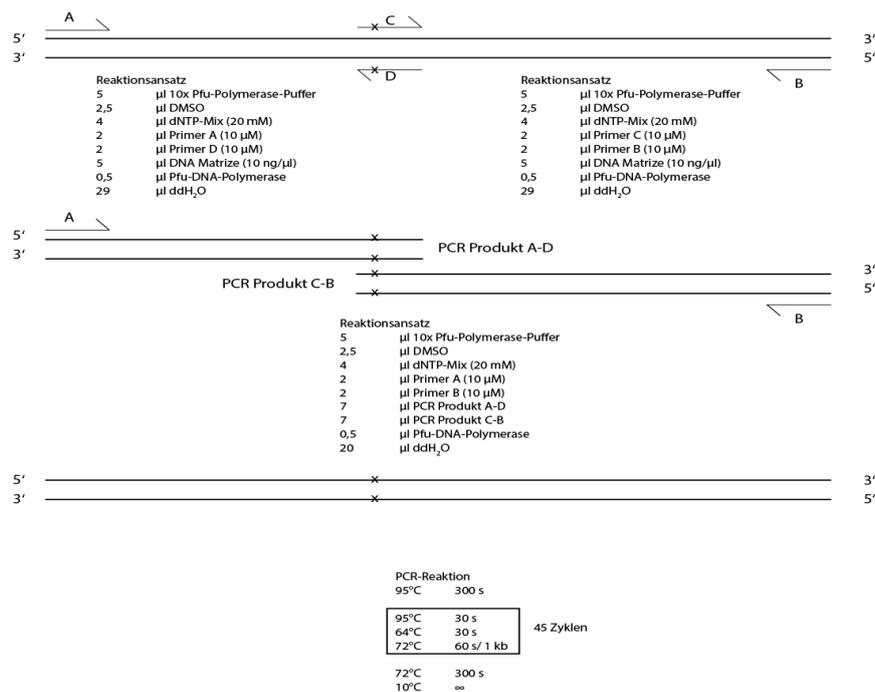


Abb. 10 Schematische Darstellung einer zweistufigen PCR: In zwei PCR-Reaktionen wurden zunächst zwei kurze DNA Fragmente amplifiziert (PCR Produkt A-D und C-B), welche sich in dem Bereich in dem die Mutation eingefügt werden soll überlappen. In der zweiten Reaktion erfolgte die Synthese eines rekombinanten PCR Produkts.

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Isolierung/Aufreinigung von PCR Produkten sowie zur optischen Kontrolle der Integrität von DNA und RNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt und auf ein 1-2 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 30 min in TAE Puffer. Die Herstellung der Agarosegele erfolgte mit TAE-Puffer und Ethidiumbromidlösung, welches sich in doppelsträngige Nukleotide einlagert und unter UV Einstrahlung sichtbar wird. Falls die Proben weiter aufgereinigt werden sollten, wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.4 Restriktionsverdau

Um die PCR Produkte oder Plasmid DNA zu verdauen oder Vektoren zu linearisieren wurden Restriktionsenzyme der Firma Thermo Scientific verwendet. Plasmid DNA (1-2 µg) wurde für 2-3 h und PCR Produkte über Nacht verdaut. Für einen Doppelverdau wurde der Puffer nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.5 Dephosphorylierung

Um zu vermeiden, dass ein geschnittener Vektor religiert, wurde der Restriktionsansatz mit alkalischer Phosphatase (FastAP™) behandelt. Für 1 µg DNA wurde 1 µl alkalische Phosphatase verwendet. Nach einem Inkubationsschritt von 15 min bei 37°C erfolgte die Aufreinigung des linearisierten Vektors durch Agarose-Gelelektrophorese.

3.1.6 Ligation

Die Ligation von einem linearisiertem Vektor und Transgen erfolgte über Nacht bei 17°C. Dazu wurden 7 µl Transgen mit 1 µl T4 Ligase (Thermo Scientific), 1 µl Ligase Puffer (Thermo Scientific) sowie 1 µl Vektor zusammen gegeben. Um die Reaktion zu beenden wurde der Ansatz für 10 min auf 65°C erhitzt. Um die Effizienz der Ligation zu überprüfen, wurde ebenfalls eine Wasserkontrolle angefertigt, in der das Transgen durch ddH₂O ersetzt wurde.

3.1.7 Transformation von elektrokompetenten Zellen

Für die Transformation von elektrokompetenten *E.coli* Zellen wurden 1 µl des Ligationsansatzes in 50 µl Bakteriensuspension gegeben. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und im Gene Pulser bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω elektroporiert. Die Bakteriensuspension wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 2 min bei 3000 *rcf* zentrifugiert, 700 µl des Überstandes wurden abgenommen und verworfen und das Pellet in verbliebenem Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten, welche bereits mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt wurden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.8 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Vermehrung von Plasmid DNA wurde der Tetracyclinresistente Bakterienstamm XL-1 Blue aus *E.coli* verwendet. 20 µl XL-1 Blue wurden auf eine LB-Agarplatte fraktioniert ausgestrichen, welche zuvor mit 50 µl Tetracyclin bestrichen wurde und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Tetracyclin versetzt, mit einem Einzelklon der Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 l vorgewärmtes LB-Medium mit der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 herangezogen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis oder in Kühlzentrifugen bei 4°C durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde 15 min bei 5000 *rpm* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Pellets mit eiskaltem ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Glycerinlösung

(10 %) aufgenommen und erneut bei 3200 *rpm* für 20 min zentrifugiert. Die soweit aufgereinigten Bakterien wurden in Glycerinlösung (10 %) aufgenommen und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.1.9 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für die Minipräparation wurden 3 ml Bakteriensuspension einer Übernachtskultur mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) aufgearbeitet. Die Midipräparation erfolgte mit dem PureYield Plasmid Midiprep System (Promega). Die Aufbereitung erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

3.1.10 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA aus Zellen sowie aus Gewebe wurde das NucleoSpin RNA Kit (Machery-Nagel) verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.1.11 Umschreiben von cDNA in cRNA

Die für die Injektion in Oozyten verwendete cRNA wurde mit dem mMACHINE[®] T7 Transcription Kit (Life Technologies) hergestellt. Die Linearisierung der Plasmid DNA erfolgte mit dem Enzym HpaI. Die weiteren Arbeitsschritte wurden dem Datenblatt des Herstellers entnommen. Die cRNA wurde mit einer Konzentration von 0,2 µg/µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.1.12 Umschreiben von RNA in cDNA

Die Reverse Transkription wurde mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit den *random hexamer* Primern gearbeitet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.1.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch mit dem Synergy HT (BioTek) bestimmt. Es wurde die charakteristische Absorption von Nukleinsäuren im Wellenlängenbereich von 250-280 nm ausgenutzt, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Die Konzentration beträgt 50 µg/ml bei einer $A_{260}=1$. Die Reinheit der Probe wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260/280 ermittelt. Bei einer Kontamination mit RNA ist der Wert Richtung 2,0 verschoben, für Verunreinigungen mit Protein liegt er unter 1,8.

Zellbiologische Methoden

3.1.14 Kultivierung von Standardzelllinien

Die verwendeten Standardzelllinien (HEK293T, Cos7 und HeLa) wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in DME-Medium (Sigma Aldrich), welches mit Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und 10% FCS (v/v) (PAA) versetzt wurde.

3.1.15 Kultivierung von HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert, als Nährmedium wurde spezielles Claycomb Medium verwendet. Die Zellen wurden erst bei einer Konfluenz von 100% passagiert und jeden Tag mit frischem Medium versorgt. Das Nährmedium wurde jede Woche wie folgt neu hergestellt. Es wurde eine 10 mM Noradrenalinlösung hergestellt, als Lösemittel wurde 30 mM Ascorbinsäure (gelöst in ddH₂O) verwendet. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das gebrauchsfertige Claycomb Medium enthält 10% FBS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Noradrenalinlösung (0,1 mM) und L-Glutamin (2 mM).

3.1.16 Beschichten von Kulturschalen

Für die Kultivierung der HL-1 Zellen war es nötig die Kulturschalen mit Gelatin/Fibronectin zu beschichten. Hierzu wurde eine 0,02 % Gelatinlösung in Wasser hergestellt und autoklaviert. Anschließend wurden 199 ml der Gelatinlösung mit 1 ml Fibronectin (1 mg/ml) vermischt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Beschichtung mit der Gelatin- Fibronectinlösung erfolgte für mindestens 4 h bei 37°C.

3.1.17 Einfrieren und auftauen von HL-1 Zellen

Für eine längere Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA von den Kulturschalen gelöst. Die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Nährmedium aufgenommen und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium (95 % FBS und 5 % DMSO) aufgenommen, aliquotiert und in einem Kryobehälter bei -80°C für eine Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.18 Herstellung von Zelllysaten

Vor dem Ernten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, das Ablösen der Zellen erfolgte mittels sterilem Zellschaber in PBS/*Complete*. Die Zellen wurden bei 2000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in PBS/*Complete* +1 % Triton X-100 aufgenommen und die Zellen danach mittels Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend

folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8000 *rcf* für 10 min und 4°C. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung verwendet, welche mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die Proben wurden in 5 fach Laemmli mit 500 mM DTT für 30 min bei 37°C erhitzt.

3.1.19 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Die verwendeten Organe wurden direkt nach Entnahme aus der Maus in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei – 80°C aufbewahrt. Für die Lysate wurden ca. 150 mg des Organs zerkleinert und mit 10-20 Volumenanteilen Lysispuffer versetzt. Um die Zellen zu homogenisieren wurden Precellys Beads verwendet. Dazu wurden die Zellen 2x für 20 Sekunden bei 5000 rpm mit einer Pause von 15 Sekunden homogenisiert (Precellys 24, Peqlab), danach für 30 min auf Eis inkubiert und mittels Ultraschallbehandlung die Zellen aufgeschlossen. Danach wurde wie unter 3.1.18 verfahren.

3.1.20 Herstellung von Proteinlysaten aus Oozyten

Die Oozyten wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und je Oozyte mit 10 µl PBS/Complete versetzt. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert und anschließend bei 4°C für 2 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde das Volumen mit PBS so eingestellt, dass je Oozyte 10 µl Proteinlösung im Reaktionsgefäß waren. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und bei 55°C für 30 min erhitzt.

3.1.21 Isolierung von NRVCN - neonatal rat ventricular cardiomyocytes

Für die Isolierung der Zellen wurden Herzen von 1-2 Tage alten Wistar-Ratten verwendet. Die Herzen wurden entnommen und in ADS Puffer gegeben. Das Bindegewebe, die Gefäße und die Vorhöfe wurden entfernt und die verbleibenden Ventrikel in kleine Stücke zerlegt. Um die Zellen zu separieren wurden sie in Enzymlösung bei 37°C inkubiert. Die Enzymlösung wurde nach 20 Minuten erneuert und die bereits gelösten Zellen gesammelt. Um die Kardiomyozyten von Fibroblasten zu trennen wurden sie mittels eines Percollgradienten durch Zentrifugation getrennt. Die so aufgereinigten Zellen wurden in Nährmedium unter Standardbedingungen kultiviert

3.1.22 Transfektion

Die transiente Transfektion wurde mit Turbofect (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ebenfalls Polyethylenimin für die Transfektion verwendet, hierzu wurde dasselbe Protokoll wie auch für die Transfektion mit Turbofect verwendet.

3.1.23 Stabile Transfektion

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren enthalten ein Antibiotikaresistenzgen welches für die stabile Transfektion verwendet wurde. Die Zellen wurden zunächst transient transfiziert und im weiteren Verlauf mit einem Antibiotikum behandelt um einen Selektionsdruck zu bewirken. Das Antibiotikum wurde dafür dem Resistenzgen des Vektors angepasst. Die Konzentration des Antibiotikums wurde schrittweise täglich erhöht bis keine Zellen auf der Kontrollplatte mehr überlebt hatten.

3.1.24 Proteinsynthese in *Xenopus laevis* oozyten

Die hier verwendeten Oozyten wurden von Ecocyte Bioscience bezogen. Für die Injektion wurde die cRNA wie unter 3.1.11 beschrieben hergestellt. Die Injektion von 10 ng cRNA pro Oozyte erfolgte mittels einer feinen Glaskapillare. Anschließend wurden die Oozyten bei 17°C für 2-3 Tage in ND-96 kultiviert.

3.1.25 Knockdown Experimente mittels siRNA

Um die Translation der verschiedenen Caspasen in Zellen zu unterbinden, wurden siRNAs (*small interfering* RNA, FlexiTube GeneSolution siRNA) gegen die prä-mRNA des Proteins bei der Firma Qiagen bestellt und für entsprechende Versuche in Zellen transfiziert.

hCaspase-3 #1	5'-CTGAGATGGGTTTATGTATAA-3'	hCaspase-6 #1	5'-AACTGTTAGCCACGCAGATGC-3'
hCaspase-3 #2	5'-ATGCTGCAGAGGGTACTTTAA-3'	hCaspase-6 #2	5'-CAGGAATTAATCATCCCTTA-3'
hCaspase-3 #3	5'-CTGGTTATTATTCTTGCGAA-3'	hCaspase-6 #3	5'-CTCAGGAAATTAGATAAATAA-3'
hCaspase-3 #4	5'-TTGAATTAATTAGGAATAAA-3'	hCaspase-6 #4	5'-AAATCGAAATTCAGACATTA-3'
hCaspase-8 #1	5'-AAGAGTCTGTGCCCAAATCAA-3'	hCaspase-9 #1	5'-CTGGACTTTCCTGCAACTCAA-3'
hCaspase-8 #2	5'-AAGTTCCTGAGCCTGGACTAC-3'	hCaspase-9 #2	5'-CAGTGACATCTTTGTGTCCTA-3'
hCaspase-8 #3	5'-GACAAAGTTTACCAAATGAAA-3'	hCaspase-9 #3	5'-AAGAGTGGCTCCTGGTACGTT-3'
hCaspase-8 #4	5'-AAGGAAGCAAGAACCCATCAA-3'	hCaspase-9 #4	5'-CAGCAAAGTTGTGCAAGCCAA-3'

Es wurden 100 µl DMEM mit 300 ng siRNA und 12 µl Lipofectamin® 2000 (Life Technologies) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde nun tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig durch Schwenken verteilt, wodurch eine siRNA Konzentration von 50 nM gegeben war. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach 48 h und einem Mediumwechsel ein

zweites Mal bevor die Zellen am vierten Tag für Zellysate genutzt wurden. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Menge an Kontroll-siRNA (Qiagen) verwendet.

Biochemische Methoden

3.1.26 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Separation der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und unabhängig von ihrer Ladung erfolgte mittels einer diskontinuierlichen eindimensionalen SDS-PAGE. Die Proben wurden dazu für 30 min auf 55°C in denaturierenden Probenpuffer erhitzt und danach in die Taschen eines 4,5 %igen Sammelgels überführt. Abhängig vom Protein wurden zwischen 20 µg und 60 µg Protein geladen. Je nach gewünschtem Auftrennungsbereich wurden die Proteine durch ein 7,5-12,5 %iges Trenngel laufen gelassen. Falls eine Trennung von sehr großen und sehr kleinen Proteinen nötig war, wurde ein 4-12 %iges Gradientengel (NuPAGE, Life Technologies) verwendet.

3.1.27 Western Blot und Immundetektion

Zur Vorbereitung der Immundetektion wurden die Proteine nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, hierfür wurde ausschließlich die Tank Blot Methode verwendet. Die Übertragung erfolgte entweder für 2 h bei 800 mA und 4°C oder über Nacht bei 20 V und 4°C, hier wurde vor dem Beenden des Transfers die Spannung für 30 min auf 70 V erhöht. Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer für mindestens 20 min in 2 %igem Magermilchpulver in TBS/T inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper für 1-3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der mit HRP gekoppelte Sekundärantikörper wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in 2 %igem Magermilchpulver angesetzt. Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran für mindestens 30 min in TBS/T gewaschen. Durch Zugabe von TMA-6 (Baden BioTec) konnte durch die im Image Quant LAS-4000 gemessene Chemilumineszenz Rückschluss auf die Peroxidaseaktivität gezogen werden und damit indirekt die Menge an Protein bestimmt werden. Falls erforderlich wurden die Daten mit der Software ImageJ ausgewertet und quantifiziert.

3.1.28 Strippen von Membranen

Um verschiedene Proteine auf einer Nitrozellulosemembran nachweisen zu können war es erforderlich die zuvor verwendeten Antikörper von der Membran zu entfernen. Hierzu wurde die Membran für 30 min bei 70°C mit *Stripping* Puffer inkubiert. Anschließend wurde die

Membran mehrfach in TBS/T gewaschen und anschließend in 2 %igem Milchpulver inkubiert, danach konnte die Membran erneut mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert werden.

3.1.29 Durchflusszytometrie

Um den Einfluss von Kv7.1 auf Apoptose zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mittels eines Durchflusszytometers untersucht. Hierfür wurden die Zellen zuvor transient mit der jeweiligen Kv7.1 Plasmid DNA transfiziert. Zur Detektion der transfizierten Zellen wurden diese mit GFP fusionierten Konstrukten transfiziert. Der Nachweis der Apoptose erfolgte mit dem Annexin V Apoptosis Detection Kit APC (eBioscience). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Messung der Signale erfolgte an einem FACS Canto. Zur Auswertung wurde die Software FlowJo verwendet.

3.1.30 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Lokalisation verschiedener Proteine wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und falls erforderlich bei einer Konfluenz von 40-50 % transfiziert und für 1-2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min in 4 % PFA in PBS (w/v) fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, nach diesem Arbeitsschritt konnten die Zellen bei 4°C für mehrere Tage in PBS bei 4°C gelagert werden. Für die Immunfärbung wurden die fixierten Zellen mit 0,2 % Saponin in PBS für 5 min permeabilisiert und danach für 10 min in 0,12 % Glycin/PBS (+0,2 % Saponin) inkubiert. Um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren erfolgte eine Inkubation mit 10 % FCS in PBS (+0,2 % Saponin) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, gelöst in 10 % FCS/PBS (0,2 % Saponin), erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Durch anschließendes mehrfaches Waschen wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Das Entfernen von nicht gebundenem Sekundärantikörper erfolgte durch mehrfaches waschen in 0,2 % Saponin in PBS und ddH₂O. Um die Präparate haltbar zu machen wurden sie in einer Lösung aus Mowiol und Dabco eingebettet. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mittels Dapi. Die Präparate wurden bei 4°C gelagert.

3.1.31 Immunpräzipitation

Um die Protein-Protein Interaktion in Zellen zu untersuchen, wurde sich der Immunpräzipitation bedient. Die Zellen wurden lysiert und die Proteinkonzentration

bestimmt. Für die Lysatkontrolle wurden ca. 20-40 µg Protein mit Probenpuffer versetzt und bei 55°C für 30 min erhitzt. Die verbleibenden Proben wurden mit Lysispuffer auf ein Volumen von 500 µl gebracht und zusammen mit 1,5 µl Antikörper für mindestens 4 h bei 4°C inkubiert. Zeitgleich wurden die Dynabeads (Thermo Scientific) mit 3 % BSA in PBS inkubiert und danach mit Lysispuffer equilibriert. Je Probe wurden 50 µl Beads verwendet. Nach der Inkubation wurden die Proteinlysate auf die Beads gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte bevor die Proben in 50 µl Probenpuffer aufgenommen wurden. Um die Proteine von den Beads zu lösen wurden diese für 30 min auf 55°C im Probenpuffer erhitzt. Anschließend konnten die Proben für die SDS-PAGE verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Mit dieser Methode konnten ebenfalls Proteine nachgewiesen werden welche mit dem Protein interagieren gegen das der verwendete Antikörper gerichtet war.

3.1.32 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die unter 3.1.24 präparierten Oozyten wurden nach 2-3 Tagen elektrophysiologisch untersucht. Dazu wurden die Zellen in ein Bad mit ND-96 überführt welches über Agarbrücken mit Referenzelektroden verbunden war. Die Agarbrücken wurden mit 1 M KCl Lösung gefüllt. Die Oozyte wurde anschließend mit zwei Glaspipetten vorsichtig punktiert in denen sich die Elektroden befanden. Die Pipetten waren mit 3 M KCl Lösung gefüllt. Es wurde darauf geachtet, dass der Widerstand der Kapillaren zwischen 0,5 und 2 MΩ lag. Anschließend wurde über die Stromelektrode das Membranpotential induziert. Beginnend bei einem Haltepotential von -80 mV wurde das Potential in Schritten von 20 mV auf +40 mV geändert, wobei die Spannung für 2,5 s gehalten wurde. Es folgte ein 250 ms Schritt bei -30mV, welcher als Tail bezeichnet wird. Über die Spannungselektrode wurden die Stromstärke bei den jeweils induzierten Spannungen bestimmt. Die so ermittelten Daten wurden mit dem Programmen clampfit 9.2 (Axon Instruments) und Origin 8.0 (OriginLab) ausgewertet und eine Strom-Spannungskurve erstellt. Für die Aufnahme der Daten wurde ein Turbo TEC-05X amplifier (npi electronic) und die Software pClamp8 (Axon Instruments) verwendet.

Hefe Interaktionsstudie – *Yeast two hybrid screen*

Um die Interaktion von K_v7.1 mit anderen Proteinen zu untersuchen, wurde eine Interaktionsstudie in der Hefe durchgeführt.

3.1.33 Erzeugung kompetenter *S. cerevisiae* (NMY51)- Zellen

Es wurden 25 µl einer NMY51-Zellsuspension auf YPD-Platten mit sterilen Glasperlen ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml YPD-Medium mit den gewachsenen Hefeklonen inokuliert und bei 200 rpm und 30 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml einer Zellsuspension mit der optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 in YPD-Medium erzeugt und für 5-6 h bis zu einer OD von 0,6-0,8 bei 200 rpm und 30 °C herangezogen. Die NMY51-Zellen wurden durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 900 g isoliert. Anschließend wurde das Zellpellet durch aufeinanderfolgendes Resuspendieren und Zentrifugieren (2 min bei 4 °C und 900 g) in zunächst kaltem ddH₂O und darauf folgend LiSorb gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen 300 µl LiSorb resuspendiert und mit 30 µl zuvor für 5-10 min auf 95 °C erhitzte Lachsspermien DNA versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die nun chemisch kompetenten NMY51-Zellen sofort auf Eis gestellt und als 50 µl Aliquots auf Trockeneis und dann in -80 °C weggefroren. Um die Kompetenz erneut herzustellen wurde bei bereits transformierten Hefezellen das gleiche Protokoll verwandt, mit der Abwandlung, dass an Stelle des YPD-Mediums ein dem transformierten Konstrukt angepasstes Selektionsmedium verwandt wurde.

3.1.34 Transformation von kompetenten NMY51-Zellen

Es wurden 25 µl kompetente NMY51-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Vektor (Bait-Vektor: pTMBV4; Prey-Vektor: pPR3-N, pPR3-C; Positivkontrolle: pAI-Alg5; Negativkontrolle: pDL2-Alg5) und 300 µl LiPEG versetzt, gevortext und zuerst für 20 min bei RT und anschließend 15 min im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach einem einminütigem Zentrifugationsschritt bei 900 g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 75 µl ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss auf dem Vektor/en entsprechenden SC-Platten ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C selektioniert.

3.1.35 Interaktionstest des hK_v7.1-Bait-Konstrukts

Es wurden NMY51-Zellen mit hK_v7.1 im pTMBV4 Bait-Vektor transformiert und auf SC-Leu-Platten selektioniert. Nach erneutem Erzeugen chemischer Kompetenz und Transformieren mit dem Prey-Vektor, der Positivkontrolle (pAI-Alg5) oder der Negativkontrolle (pDL2-Alg5) wurden die Zellen auf SC-Leu/-Trp-Platten ausgestrichen und selektioniert. Mit den für beide Konstrukte positiven Zellen wurden 2ml SC-Leu/-Trp-Medium inokuliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Zur OD₆₀₀ Messung wurden 20 µl der Zellsuspension 1:50 mit ddH₂O

verdünnt. Anschließend wurde eine Verdünnung mit der optischen Dichte eins (1) sowie drei weitere Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000) erzeugt, von denen je 4 µl auf eine SC-Leu/-Trp- und eine SC-Leu/-Trp/-His-Platte ausgestrichen und für ein bis drei Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

3.1.36 Large-Scale Transformation

Es wurden 10 ml SC-Leu-Medium mit den Bait-Vektor transformierten NMY51-Zellen inokuliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 ml SC-Leu-Medium mit Hilfe dieser Vorkultur auf eine OD von 0,2 eingestellt und für 4-5 h bis zu einer OD von 0,5 bei 200 rpm und 30 °C herangezogen. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 900 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in zweimal in 50 ml ddH₂O gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet in 3 ml Lithiumacetat-Lösung (100 mM) resuspendiert und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 900 g, 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in 5,4 ml Transformations-Mix resuspendiert. Als Negativkontrolle der Transformation wurden 50 µl der Suspension keine DNA zugesetzt. Für einen Test Large-Scale Screen zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurden 15 µg Kontroll-Vektor (pDSL-Nx), für den Large-Scale Screen 15 µg cDNA-Bibliothek-DNA (Mouse adult heart cDNA library (NubG-x und x-NubG), (MoBiTec) in pPR3-N, dem Ansatz hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen folgte zuerst eine Inkubation für 20 min bei RT und anschließend für 15 min im Wasserbad bei 42 °C. Nach Zentrifugieren (5 min, 900 g) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml ddH₂O resuspendiert. Für einen Test Large-Scale Screen wurden 50 µl der unverdünnten Suspension, einer 1:10, einer 1:100 Verdünnung sowie die Negativkontrolle (s.o.) auf 10cm SC-Leu/-Trp-Platten ausgestrichen. Über das Wachstum der Hefekolonien konnten im Folgenden Rückschlüsse auf die Transformationseffizienz geschlossen

werden. Hierfür wurde die theoretische Anzahl der Hefeklone, nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, durch die eingesetzte DNA-Menge (µg) errechnet. Für den Large-Scale Screen wurde der restliche Transformationsansatz zu je 100 µl auf zwanzig 15 cm SC-Leu/-Trp/-His-Platten ausgestrichen und diese für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Es wurde ein Abstrich der einzelnen Hefeklone gemacht, wobei jeder Klon auf ein Sechstel einer SC-Leu/-Trp/-His-Platte ausgestrichen und erneut für 1-3 Tage bei 30 °C inkubiert wurde.

3.1.37 Isolierung von Plasmiden aus Hefeklonen

Mit Hefezellen wurden 500 µl von Puffer 1 inokuliert, für 1 h bei 37 °C inkubiert und dabei alle 20 min leicht geschüttelt. Nach Zentrifugieren (5 min, 900 g) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl Puffer 2 vorsichtig resuspendiert. Es wurden 50 µl 10%iges SDS hinzugegeben und für weitere 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl einer 3 M Kaliumacetat-Lösung wurde der Ansatz gemischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert.

Danach wurde für 5 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auf die Zugabe von 700 µl Isopropanol und einmaliges Invertieren folgte eine fünfminütige Inkubation bei RT und das Zentrifugieren bei 16000 g für 10 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl 70%igem Ethanol aufgenommen, 10 min bei RT inkubiert und erneut für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min bei 37 °C bei offenem Reaktionsgefäß getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 20 µl ddH₂O resuspendiert. Die DNA wurde anschließend in E. coli XL1-Blue transformiert, Isoliert, über einen Restriktionsverdau validiert und anschließend Sequenziert.

3.1.38 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit wurde mittels der Software *GraphPad Prism 6* durchgeführt. Angegeben ist der SEM (*Standard Error of Mean*). Je nach Experiment wurde entweder eine Varianzanalyse mittels ANOVA (*analysis of variance*) oder durch einen t-Test durchgeführt. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte durch einen Post-hoc-Test. Für die Signifikanzen wurden folgende Parameter zugrunde gelegt: $p < 0,05$ signifikant (*); $p < 0,01$ sehr signifikant (**); $p < 0,001$ hoch signifikant (***)

4 Ergebnisse

Untersuchung der proteolytischen Spaltung von $K_v7.1$

Die Proteolyse von Ionenkanälen ist ein bislang wenig untersuchter Prozess. In Vorarbeiten wurden für den spannungsabhängigen Kaliumkanal $K_v7.1$ Untersuchungen durchgeführt, welche auf eine proteolytische Prozessierung hindeuteten. Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Identifizierung der putativen Schnittstellen und der verantwortlichen Proteasen.

4.1.1 Überexpression von humanem und murinem $K_v7.1$

Zu Beginn der Arbeit wurde die Größe der putativen Spaltfragmente mittels Western Blot Analyse untersucht. Hierzu wurden die humane und murine cDNA von $K_v7.1$ in HeLa Zellen überexprimiert und das Lysat mittels Western Blot analysiert. Die Abb. 11 zeigt eine repräsentative Aufnahme eines Experiments. Die Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 72 kDa entsprechen der unprozessierten Form von $K_v7.1$. Neben dieser sind zwei weitere Banden bei ca. 42 kDa und ca. 28 kDa zu erkennen. Diese wurden im weiteren als C-terminales Fragment 1 und 2 bezeichnet (CTF1 und CTF2). Zwischen der unprozessierten Form und dem CTF1 befindet sich eine weitere Bande, bei der es sich um ein Dimer des CTF2 handeln könnte. Neben der Expression in HeLa Zellen wurden auch Cos7 und HEK293T Zellen transfiziert und auf die Proteolyse hin untersucht, wobei in Cos7 Zellen ein vergleichbares Bandenmuster beobachtet wurde.

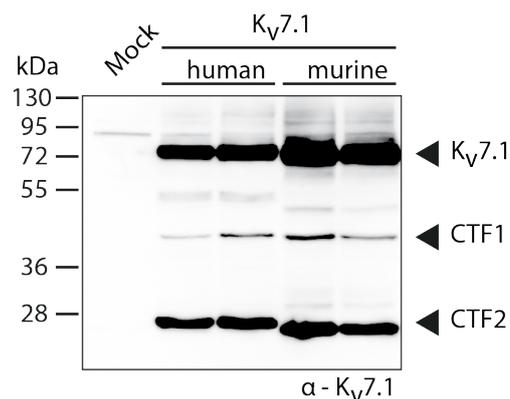


Abb. 11 Analyse der Proteinsynthese von $K_v7.1$. HeLa Zellen wurden transient transfiziert und die Zelllysate mittels Western Blot analysiert. Der verwendete Antikörper (ab65092) ist gegen den distalen Bereich des C-Terminus gerichtet.

4.1.2 Endogene Expression von K_v7.1 in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem beobachteten Bandenmuster nicht um ein Artefakt der Überexpression handelte, wurden Zellen untersucht, die eine endogene Expression von K_v7.1 aufweisen. Da der spannungsabhängige Kaliumkanal K_v7.1 zusammen mit der β -Untereinheit KCNE1 im Herzen verantwortlich für die Repolarisation des Aktionspotentials ist, wurden Kardiomyozyten aus Rattenherzen isoliert und auf ihre Proteinsynthese von K_v7.1 untersucht. Die Analyse mittels Western Blot zeigte ein vergleichbares Bandenmuster wie bereits bei der Überexpression beobachtet wurde. Das Signal für den nicht prozessierten Kanal befindet sich etwas unter der 72 kDa Bande (Abb. 12). Nach längerer Entwicklung konnten auch die C-terminalen Fragmente im Blot nachgewiesen werden. Das Signal für CTF1 befindet sich bei ca. 42 kDa und hat damit dieselbe Größe wie in der Überexpression. Die Bande für das CTF2 befindet sich etwas oberhalb der 28 kDa Bande und ist damit etwas größer als in den Überexpressionsexperimenten. Die Proteolyse von K_v7.1 konnte somit sowohl in Überexpression als auch endogen beobachtet werden. Weiterhin wurde eine Proteolyse des humanen, murinen und des K_v7.1 in der Ratte festgestellt werden.

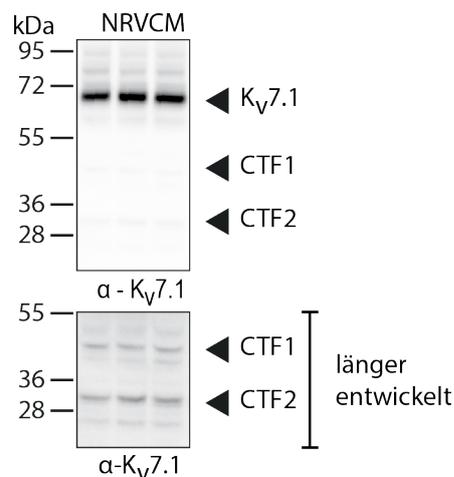


Abb. 12 Nachweis der Proteinsynthese von endogenem K_v7.1. Neonatale Ratten Kardiomyozyten (NRVCM) wurden auf die Proteinsynthese von K_v7.1 untersucht. Der verwendete Antikörper ist gegen ein Epitop im distalen Bereich des Proteins gerichtet. Der untere Teil des Blots wurde länger entwickelt um die C-terminalen Banden besser erkennen zu können.

4.1.3 K_v7.1 in verschiedenen Organen der Maus

K_v7.1 spielt nicht nur eine Rolle bei der Repolarisation des Aktionspotentials im Herzen, sondern ist auch an anderen Prozessen in verschiedenen Organen beteiligt. Um zu überprüfen, ob die Prozessierung von K_v7.1 auch in anderen Organen stattfindet, wurden verschiedene Organe auf die Proteinsynthese von K_v7.1 hin untersucht (Abb. 13). Wie erwartet konnte in den Proben der Herzlysate ein deutliches Signal für das unprozessierte Protein bei ca. 72 kDa

identifiziert werden. Weiterhin konnte im Pankreas sowie in der Niere ein Signal bei ca. 72 kDa beobachtet werden, welches dem Monomer von $K_v7.1$ entspricht. Die Signale für das CTF2 sind deutlich in den Proben des Herzens, der Niere und des Pankreas zu erkennen, jedoch am stärksten in der Niere sowie im Herzen. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Herzlysate aus $K_v7.1^{-/-}$ Mäusen überprüft. Zwar war auch in den Herzlysaten der $K_v7.1^{-/-}$ Mäuse ein schwaches Signal zu sehen, diese scheint aber unspezifisch zu sein, da es nicht in allen Experimenten zu finden war und auch etwas über dem Signal für CTF2 (ca. 25 kDa) lag. In den Proben des Pankreas konnte ein Signal detektiert werden, welches von der Größe dem des CTF1 entspricht. Die Spezifität dieses Signals wurde allerdings nicht mittels entsprechender Kontrollen verifiziert.

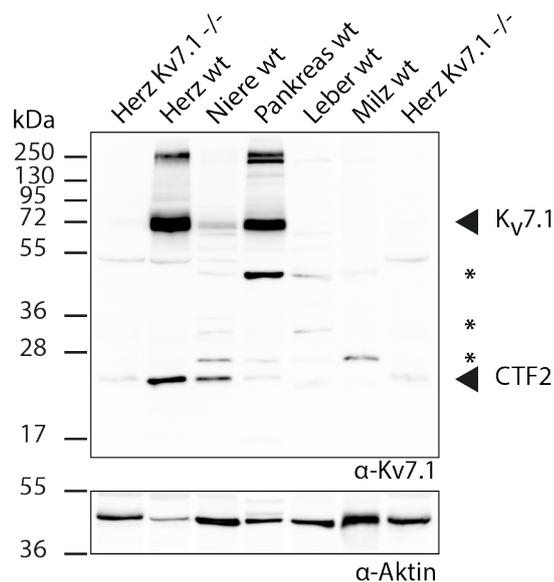


Abb. 13 Untersuchung der Proteinsynthese von $K_v7.1$ in verschiedenen Organen der Maus. Schilddrüse, Niere, Pankreas, Milz, Leber und Herz wurden lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Es wurden 80 μg Protein für die Analyse verwendet. Als Kontrolle wurde $K_v7.1^{-/-}$ Herzlysate eingesetzt. Der verwendete Antikörper ist gegen das distale Ende des C-Terminus gerichtet. Das Signal bei ca. 72 kDa entspricht dem unprozessierten Protein. Des Weiteren ist ein Signal bei ca. 28 kDa zu erkennen, welches dem CTF2 entspricht. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale konnten, aufgrund fehlender Kontrollen nicht zugeordnet werden.

4.1.4 Identifizierung der Schnittstelle mittels Trunktionsmutanten von $K_v7.1$

Um die putativen Schnittstellen näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Trunktionsmutanten von $K_v7.1$ hergestellt und in HeLa Zellen exprimiert. Anhand des Molekulargewichtes der Proteine im Western Blot, konnten Rückschlüsse auf die Region der putativen Schnittstellen gezogen werden. Die verwendeten Konstrukte sind in Abb. 14 schematisch dargestellt.

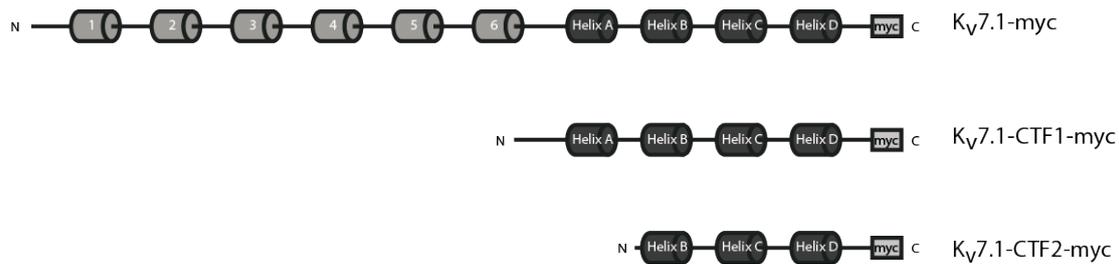


Abb. 14 Topologie verschiedener Kv7.1 Trunktionsmutanten. Schematische Darstellung der Topologie der α -Untereinheit von Kv7.1 und zweier truncierter Mutanten. Die Transmembrandomänen sind mit 1-6 gekennzeichnet. Helix A-D bezeichnet die vier helikalen Strukturen im C-Terminus von Kv7.1. Alle Konstrukte sind C-terminal mit einem myc-Tag fusioniert.

Die Expression der in Abb. 14 dargestellten Konstrukte ergab im Western Blot (Abb. 15) für die α -Untereinheit (Kv7.1-myc) ein Signal bei ca. 72 kDa was dem unprozessierten Protein entspricht. Weiterhin sind die Signale für die putativen Spaltfragmente CTF1 (ca. 42 kDa) und CTF2 (ca. 28 kDa) zu erkennen. Über der CTF1 Bande befindet sich ein weiteres Signal, welches ein Dimer von CTF2 sein könnte. Es wurden außerdem die C-terminalen Konstrukte Kv7.1-CTF1-myc und Kv7.1-CTF2-myc transfiziert. Für das Konstrukt welches aus allen 4 Helices des C-Terminus besteht (Kv7.1-CTF1-myc) sind Signale bei ca. 42 kDa und bei ca. 28 kDa zu erkennen. Das kürzere Konstrukt bestehend aus Helix B-D (Kv7.1-CTF2-myc) zeigte ein Signal bei ca. 25 kDa und hat damit ein kleineres Molekulargewicht als das putative zweite Spaltfragment (CTF2).

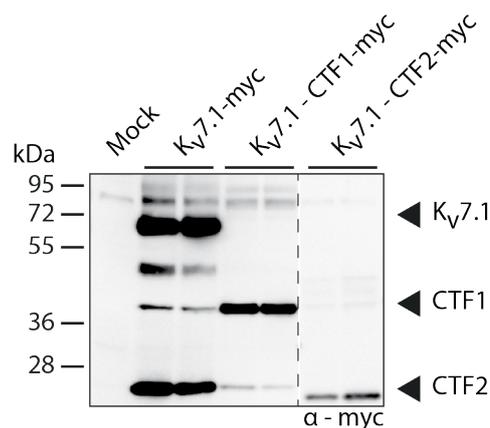


Abb. 15 Expression der Trunktionsmutanten. Es wurden HeLa Zellen transient transfiziert und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert. In der Aufnahme des Western Blots sind Signale bei ca. 72 kDa, bei 42 kDa (CTF1) und bei ca. 28 kDa (CTF2) zu erkennen, weiterhin sind zwei Banden bei ca. 50 kDa zu sehen. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen aufgetragen.

Anhand des Molekulargewichts der Proteine und der sich daraus ergebenden Signale im Western Blot (Abb. 15) konnten erste Rückschlüsse auf die Region gezogen werden, in der die Prozessierung stattfindet. Die Proteolyse erfolgt demnach im proximalen C-Terminus, sowie zwischen Helix A und Helix B. Es wurden daraufhin Deletionsmutanten hergestellt, in denen verschieden lange Bereiche zwischen Helix A und B deletiert wurden (Abb. 16), um die exakte Position der Schnittstelle zu identifizieren.

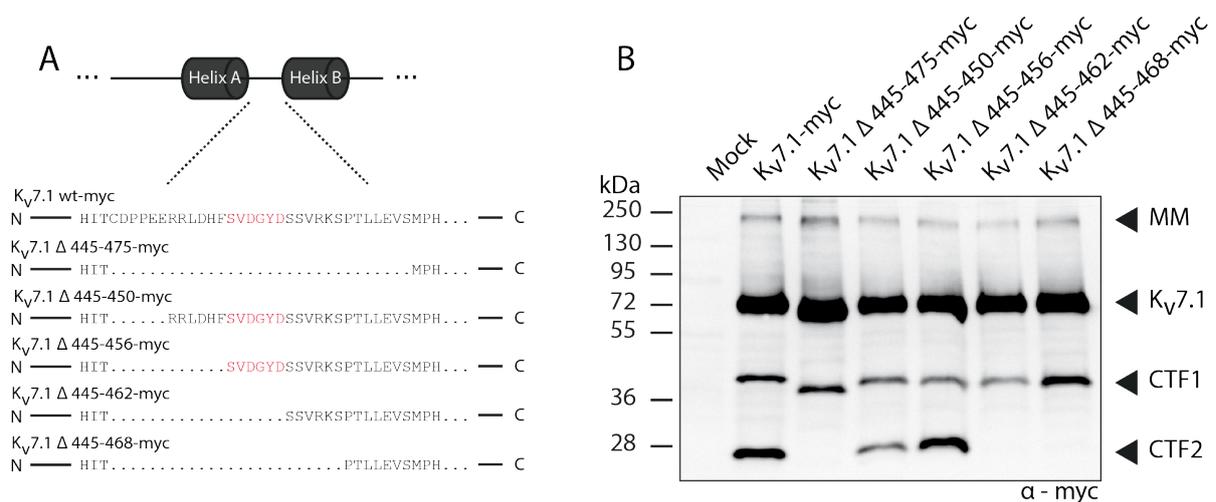


Abb. 16 Schematische Darstellung der Deletionsmutanten zwischen Helix A und Helix B. A: Dargestellt ist die Position der deletierten Aminosäuren zwischen Helix A und B. Im unteren Teil ist die Aminosäuresequenz der betreffenden Region gezeigt. Die Punkte stehen für die deletierte Aminosäuren. B: HeLa Zellen wurden transient mit verschiedenen Deletionsmutanten von K_v7.1 transfiziert und die Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Als Kontrolle wurden untransfizierte HeLa Zellen verwendet. Die Banden bei ca. 250 kDa entsprechen dem Multimer der α-Untereinheiten (MM), die Signale bei ca. 72 kDa wurden der unprozessierten Form von K_v7.1 zugeordnet. Weiterhin sind die putativen Spaltfragmente CTF1 bei ca. 42 kDa und CTF2 bei ca. 28 kDa zu erkennen.

Die Proteinsynthese der in Abb. 16 A dargestellten Mutanten von K_v7.1 wurde mittels Western Blot untersucht (Abb. 16 B). Für alle Mutanten konnte eine Bande bei ca. 72 kDa und eine Bande bei ca. 250 kDa (MM) im Western Blot beobachtet werden. Diese Banden wurden der unprozessierten Form von K_v7.1 sowie einem Multimer der α-Untereinheiten (MM) zugeordnet. Weiterhin zeigten alle Mutanten eine Bande bei ca. 42 kDa, welche dem ersten putativen Spaltfragment (CTF1) zugeordnet wurde. Für drei der exprimierten Konstrukte wurde ein Signal bei ca. 28 kDa identifiziert, welches dem zweiten putativen Spaltfragment (CTF2) entspricht. Dieses Signal ist bei den Mutanten K_v7.1Δ445-475-myc, K_v7.1Δ445-462-myc und K_v7.1Δ445-468-myc nicht vorhanden. Durch die Deletion von ca. 30 Aminosäuren zeigte die Mutante K_v7.1Δ445-475-myc ein CTF1 mit einem kleineren Molekulargewicht. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Aminosäuren SVDGYD (Abb. 16 rot dargestellt) von besonderer Bedeutung für die mögliche proteolytische Prozessierung des Proteins und die Generierung des CTF2 sind.

4.1.5 Identifizierung der Schnittstelle durch die Verwendung eines *Alaninscans*

Durch die oben gezeigten Versuche konnte die Schnittstelle auf die Peptidsequenz 456-SVDGYD-463 eingegrenzt werden. Um die genau Position der Proteolyse innerhalb der Aminosäuresequenz zu identifizieren, wurden nun systematisch einzelne Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht und die Mutanten anschließend in HeLa Zellen exprimiert (Abb. 17 A).

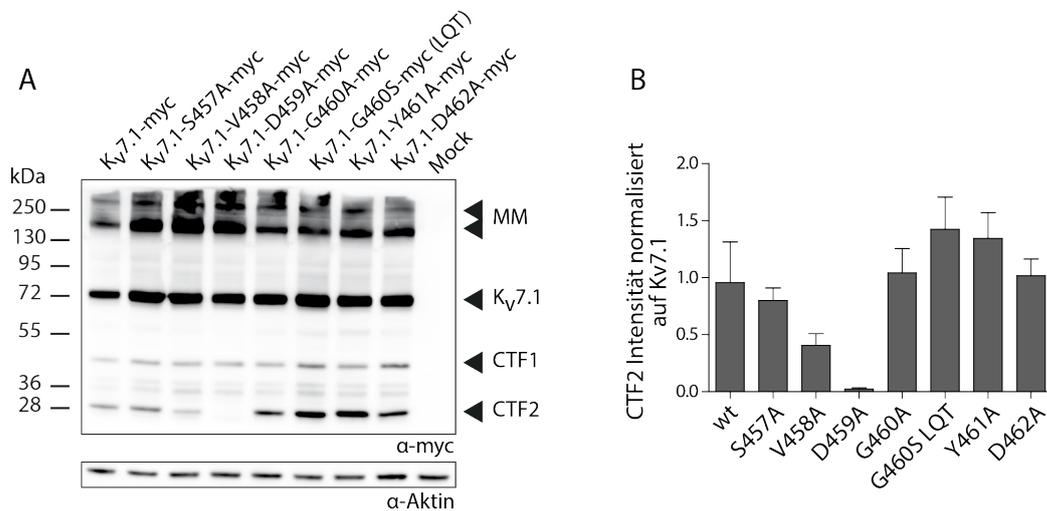


Abb. 17 Alanin scan zur Identifizierung der zweiten Schnittstelle von Kv7.1. A: Die Konstrukte aus dem *Alanin scan* wurden transient in HeLa Zellen transfiziert und die Proteinsynthese mittels Western Blot analysiert. Als negativ Kontrolle wurden untransfizierte HeLa Zellen verwendet. Für alle Mutanten sind im Western Blot Banden im hochmolekularen Bereich zu erkennen welche dem Multimer (MM) der α -Untereinheit zugeordnet wurde. Die Signale bei 72 kDa wurden dem unprozessierten Protein zugeordnet. Weiterhin sind Signale bei ca. 42 kDa und 28 kDa zu erkennen. Diese entsprechen dem CTF1 und CTF2. Die Mutante G460S (LQT) ist mit dem *Long QT-Syndrom* assoziiert und wurde ebenfalls untersucht. B: Densitometrische Auswertung der Alaninmutanten. Die Auswertung erfolgte anhand drei unabhängiger Experimente. Dargestellt ist die Intensität des CTF2 Fragments normalisiert auf die α -Untereinheit von Kv7.1.

Die Auswertung des *Alaninscans* zeigt für fünf der sechs Alaninmutanten das typische Bandenmuster für Kv7.1 im Western Blot. Es sind Banden im hochmolekularen Bereich zu erkennen, welche den Multimeren der α -Untereinheit zugeordnet wurden (MM). Man erkennt ebenfalls für jede der Mutanten ein Signal bei ca. 72 kDa, welches dem unprozessierten und monomeren Protein entspricht, sowie die Bande für das erste putative Spaltfragment (CTF1). Die Bande für das zweite putative Spaltfragment (CTF2) ist außer bei der Mutante Kv7.1-D459A-myc ebenfalls deutlich zu erkennen. Die Mutation G460S wurde von Kapplinger *et al.* (Kapplinger *et al.* 2009) als Long-QT Mutante identifiziert und wurde aufgrund ihrer Position innerhalb der putativen Schnittstelle untersucht. Die densitometrische Auswertung mehrere unabhängiger Experimente (Abb. 17 B) zeigte einen deutlichen Einfluss der Mutation D459A auf die Generierung des zweiten putativen Spaltfragments (CTF2). Der Austausch von Valin gegen Alanin an Position 458 führt ebenfalls zu einer Reduzierung der CTF2 Bildung. Im Gegensatz dazu zeigt die LQT Mutante G460S eine deutliche Steigerung in der CTF2 Generierung.

Wie bereits in Abb. 11 gezeigt wurde, treten putative Spaltfragmente sowohl im humanen als auch im murinen $K_v7.1$ auf. Um zu überprüfen, ob die Mutation D459A auch im murinen $K_v7.1$ zu einem Verlust des zweiten putativen Spaltfragments führt, wurde ein Sequenzvergleich der beiden Spezies durchgeführt (Abb. 18). Die für die Generierung des zweiten putativen Spaltfragments verantwortliche Aminosäuresequenz ist hoch konserviert zwischen Mensch und Maus. Das Aspartat 459 in der humanen Aminosäuresequenz entspricht dem Aspartat 458 in der murinen Sequenz.

↓

Mensch	APRSHTLLSPSPKPKKS	VVVKKKKFKLDK	NGVTPG	EKMLTVP	HITCDP	PEERRLDHF	SVDGYD	SSVRKSP	TLL	EVSM	PH
Maus	PARSHTLLSPSPKPKKS	VVMVKKKKFKLDK	NGMSPG	EKMFNV	PHITYD	PPEDRRPDHFS	IDGYD	SSVRKSP	TLL	EV	STPH

Abb. 18 $K_v7.1$ Sequenzvergleich von $K_v7.1$ in Mensch und Maus. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz zwischen Helix A und Helix B von $K_v7.1$ im Mensch und Maus. Die rot dargestellten Aminosäuren wurden systematisch gegen Alanin ausgetauscht. Der Pfeil markiert die putative Schnittstelle im humanen Protein.

Um den Einfluss der Aminosäure D458 in murinem $K_v7.1$ zu analysieren, wurde diese gegen ein Alanin ausgetauscht. Die Überexpression von murinem $K_v7.1$ wt und $K_v7.1$ -D458A in Cos7 Zellen sowie die Analyse der Proteinsynthese mittels Western Blot zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Generierung des zweiten Spaltfragments (Abb. 19).

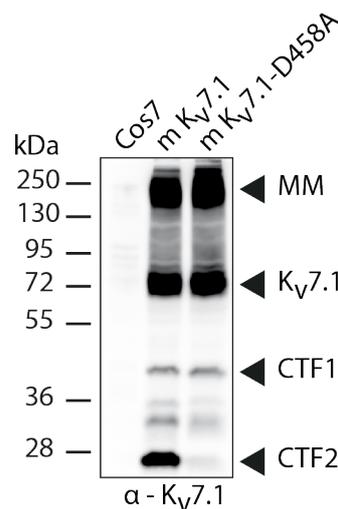


Abb. 19 Fragmentierung von murinem $K_v7.1$. Murines $K_v7.1$ (wt) sowie die Mutante D458A wurden in Cos7 Zellen transient transfiziert. Die Proteinsynthese wurde mittels eines Antikörpers gegen den C-Terminus von $K_v7.1$ analysiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Lysate aufgetragen. Wt und Mutante zeigen ein Signal für die α -Untereinheit von $K_v7.1$ bei ca. 72 kDa, weiterhin sind in beiden Proben die Multimere von $K_v7.1$ zu erkennen. Das Signal bei ca. 42 kDa entspricht dem CTF1. Die Mutante zeigt kaum Signal für CTF2 (ca. 28 kDa).

Um die verantwortliche Protease zu identifizieren, wurde ein Abgleich der Schnittstelle in K_v7.1 mit allen Proteasen, welche in der Merops Datenbank gelistet sind, durchgeführt. Um die Anzahl der möglichen Proteasen zu minimieren, wurden nur solche näher betrachtet, die ein Aspartat innerhalb der Schnittstelle für die Proteolyse der Substrate benötigen. Hierbei zeigte sich, dass Caspasen als putative Proteasen für die Generierung des zweiten Spaltfragments verantwortlich sein könnten. Die Analyse der Spezifität der einzelnen Caspasen ergab für Caspase-3 eine hohe Übereinstimmung mit der putativen Schnittstelle in K_v7.1. Abb. 20 zeigt die Substrat-Spezifität für Caspase-3 und die putative Schnittstelle von K_v7.1 als Vergleich. Die proteolytische Spaltung der Substrate erfolgt dabei zwischen Position 4 und 5 (P1 und P1'). Bisher sind 649 Substrate mit einem Aspartat an Position P1, sowie 164 Substrate mit einem Valin in P2 und 205 Substrate mit einem Glycin an P1' Position in der Merops Datenbank gelistet.

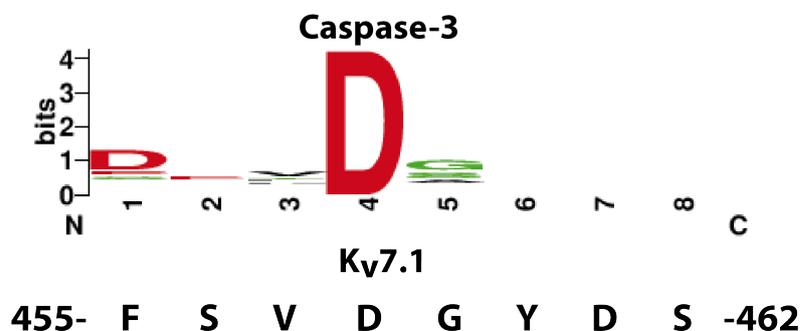


Abb. 20 Caspase-3 Schnittstelle. Dargestellt ist die bevorzugte Aminosäuresequenz von Caspase-3. Die Höhe der Buchstaben gibt an in wievielen Substraten an dieser Stelle die entsprechende Aminosäure vertreten ist. Im unteren Teil ist die Sequenz von K_v7.1 als Vergleich dargestellt. Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren an. (Quelle: Merops Datenbank)

4.1.6 LQT-Mutationen im C-Terminus von K_v7.1

In unmittelbarer Nähe der Schnittstelle von K_v7.1 an Position 459 befinden sich neben der G460S, drei weitere Mutationen, welche mit dem LQT1 Syndrom assoziiert wurden (Abb. 21 A). Um den Einfluss dieser Mutationen auf die Spaltung von K_v7.1 zu untersuchen, wurden diese Mutanten in Cos7 Zellen exprimiert und die Spaltung von K_v7.1 analysiert. Die Analyse des Western Blots ergab keine Unterschiede in der Fragmentierung von K_v7.1. Alle Mutanten zeigten die für K_v7.1 beschriebenen Banden bei 72 kDa, 40 kDa und 28 kDa sowie die Multimere bei 250 kDa. Das Molekulargewicht des CTF1 und CTF2 der G460S Mutante war etwas erhöht im Vergleich zu den anderen exprimierten Mutanten (Abb. 21 B). Die Austausch von Glycin zu Serin an Position 460 scheint einen Einfluss auf die Fragmentierung von K_v7.1 zu haben.

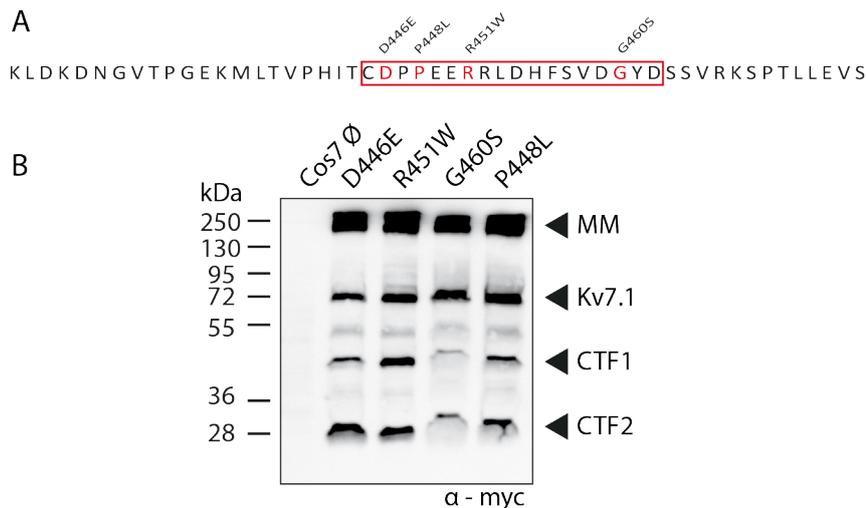


Abb. 21 Einfluss der LQT-Mutation auf die Spaltung von $K_v7.1$. A: Aminosäuresequenz von $K_v7.1$ im Bereich der putativen Schnittstelle. Die in rot markierten Aminosäuren entsprechen der wt Sequenz. B: Western Blot Analyse der LQT1 Mutanten. Die Konstrukte wurden transient in Cos7 Zellen transfiziert. Der Nachweis von $K_v7.1$ erfolgte mittels myc Antikörpers gegen ein myc Epitop am C-terminalen Ende von $K_v7.1$. Die Signale bei 250 kDa entsprechen den Multimeren von $K_v7.1$. Die Signale bei 72 kDa entsprechen dem unprozessierten Protein. Bei 40 kDa und 28 kDa sind die Signale für die beiden Spaltfragmente zu erkennen (CTF1 und CTF2).

4.1.7 Spaltung von $K_v7.1$ in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation

Ein weiterer Punkt der Untersuchungen war die Aufklärung in welchem Zellkompartiment die Proteolyse stattfindet. Dazu wurde eine Mutante ($K_v7.1$ -ER) erzeugt, welche im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird, indem an den C-Terminus von $K_v7.1$ fünf Arginine angefügt wurden, welche eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum bewirken (Nasu-Nishimura *et al.* 2006; Marcello *et al.* 2010). Die transiente Transfektion des wt Proteins sowie der Retentionsmutante zeigte in beiden Fällen eine Fragmentierung von $K_v7.1$ (Abb. 22 A). In der Fluoreszenzaufnahme ist eine teilweise Kolokalisation der Retentionsmutante mit dem Marker für das endoplasmatische Retikulum KDEL sichtbar (Abb. 22 B und C). Die nur teilweise vorhandene Kolokalisation zeigte, dass nicht alle $K_v7.1$ Proteine im ER zurückgehalten wurden. Sowohl für $K_v7.1$ als auch für $K_v7.1$ -ER konnte keine Lokalisation der Proteine an der Plasmamembran beobachtet werden. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Proteolyse von $K_v7.1$ bereits im endoplasmatischen Retikulum stattfindet.

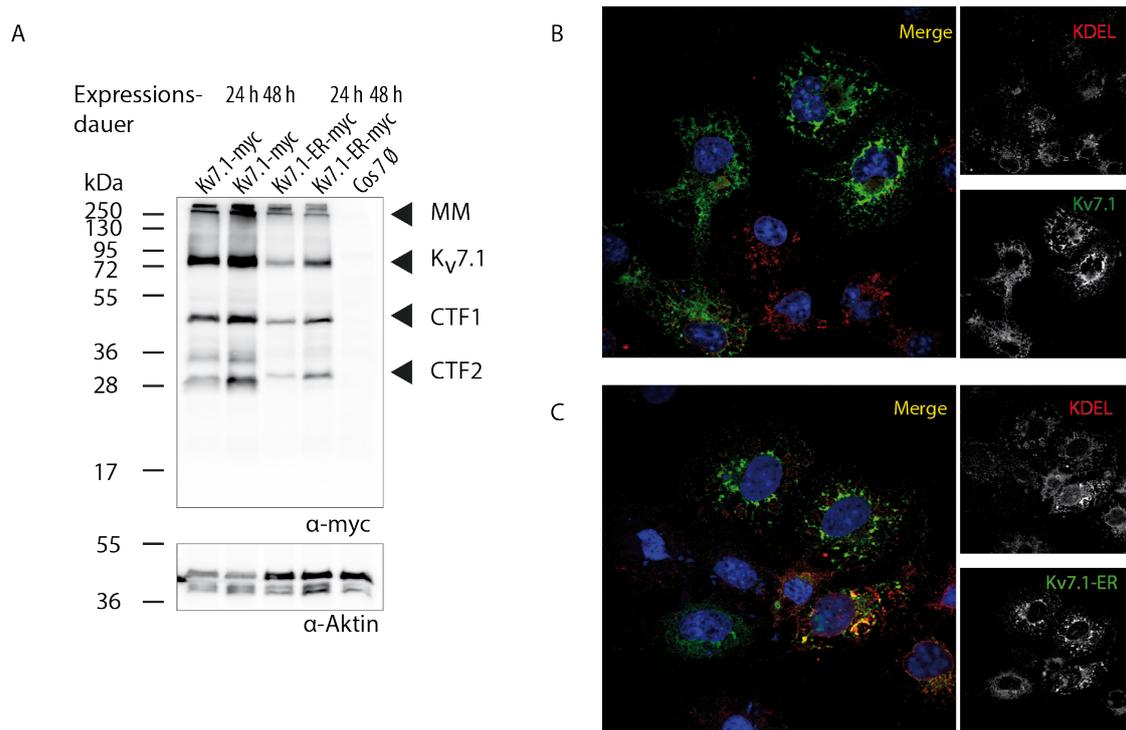


Abb. 22 Spaltung in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation. A: Western Blot Analyse der K_v7.1-ER Mutante sowie K_v7.1. Die Konstrukte wurden für 24 h und 48 h in Cos7 Zellen exprimiert. Der Nachweis erfolgte mittels myc Antikörpers. Die Signale bei 250 kDa entsprechen den Multimeren von K_v7.1 (MM). Die Signale bei 72 kDa entsprechen dem unprozessierten Protein. Bei 40 kDa und 28 kDa sind die Signale für die beiden Spaltfragmente zu erkennen (CTF1 und CTF2). Als Ladekontrolle wurde ein Aktin Antikörper verwendet. B-C: Immunfluoreszenz von transient transfizierten Cos7 Zellen mit B: K_v7.1 und C: K_v7.1-ER. Als ER-Marker wurde KDEL verwendet. Der Nachweis von K_v7.1 erfolgte mittels myc Antikörpers.

4.1.8 Elektrophysiologische Untersuchungen der K_v7.1-D459A Mutante

Die oben beschriebene Mutante (D459A) von humanem K_v7.1 zeigte einen starken Einfluss auf die Bildung des CTF2. Um zu untersuchen, ob sich dieser Effekt auch auf die Funktion von K_v7.1 als Ionenkanal auswirkt, wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten durch Messung von makroskopischen Strömen in *Xenopus laevis* Oozyten mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC). Im Normalfall war 3-4 Tage nach der Injektion mit cRNA genügend Protein synthetisiert, um eine Messung durchführen zu können. Hierbei zeigte die D459A Mutante einen doppelt so hohen Stromfluss im Vergleich zum nicht veränderten K_v7.1 (wt) Protein (Abb. 23 C). Die Koinjektion von K_v7.1 und der β -Untereinheit KCNE1, führte zu einer Erhöhung des Stromflusses um den Faktor drei bei der D459A Mutante im Vergleich zum wt Protein (Abb. 23 D). Als Kontrolle wurden die Mutante S457A sowie G460A verwendet. Hierbei zeigten sich keine größeren Änderungen im Stromfluss im Vergleich von Mutante zu wt. Die Koinjektion der Mutante S457A zusammen mit der β -Untereinheit KCNE1 führte zu einem, um den Faktor 1,5 verminderten Stromfluss im

Vergleich zum wt Protein (Abb. 23 D). Allgemein wurde der Stromfluss durch die Injektion von KCNE1 in allen Messungen deutlich erhöht (Abb. 23 A und B).

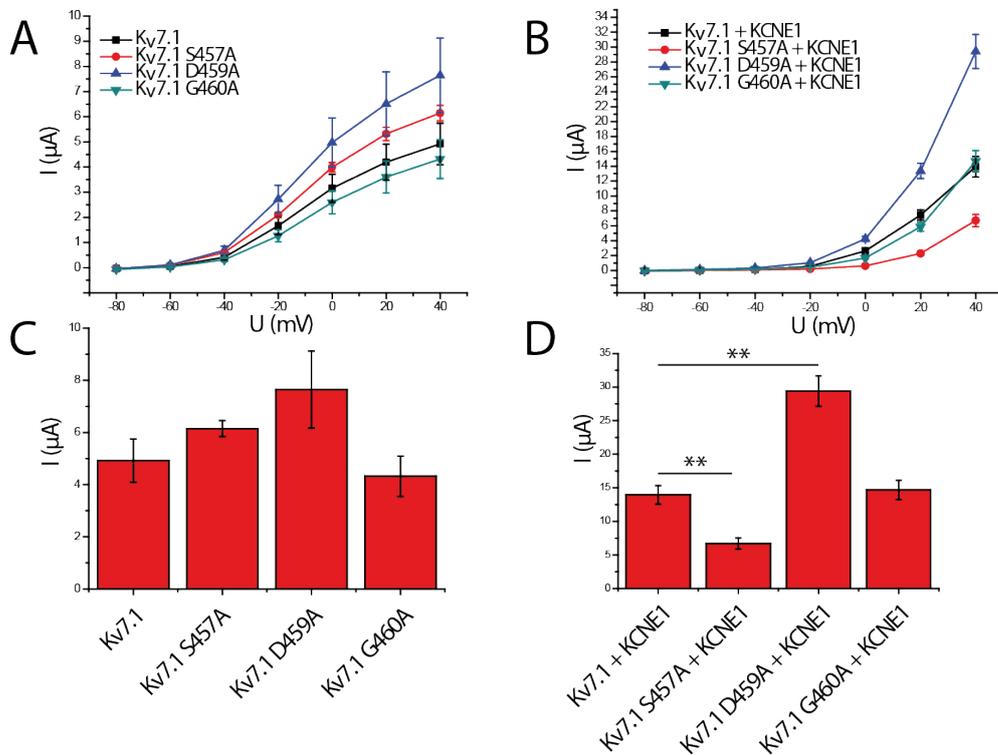


Abb. 23 Elektrophysiologische Untersuchung von Kv7.1. A-B: Stromkurven der verschiedenen Kv7.1 Mutanten. A: Dargestellt ist der Stromfluss der Kv7.1 Mutanten als Antwort auf die Spannungsklemme von -80 mV bis +40 mV. B: Dargestellt ist der Stromfluss als Antwort auf die Spannungsklemme von -80 mV bis +40 mV der der Koinjektion von KCNE1 und den verschiedenen Kv7.1 Mutanten. C-D: I/I_{+40 mV} Dargestellt sind die auf +40 mV normierten Ströme der in A und B gezeigten Mutanten von Kv7.1.

4.1.9 Validierung der Caspase vermittelten Proteolyse von Kv7.1

Um den Einfluss von Caspasen auf die Prozessierung von Kv7.1 zu untersuchen, wurde zuerst der Inhibitor z-VAD-FMK verwendet. Dieser membrangängige Inhibitor hemmt irreversibel alle Caspasen. Zellen (Cos7) wurden mit Kv7.1 transient transfiziert und für 12 Stunden mit 100 μ M z-VAD-FMK inkubiert und anschließend die Prozessierung von Kv7.1 untersucht. Abb. 24 A zeigt deutlich den Einfluss des Inhibitors auf die Generierung des zweiten Spaltfragmentes. Die densitometrische Auswertung mehrere unabhängiger Experimente (Abb. 24 B) zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion des zweiten Spaltfragmentes. Die Bildung von CTF1 wurde durch den Inhibitor nicht beeinflusst.

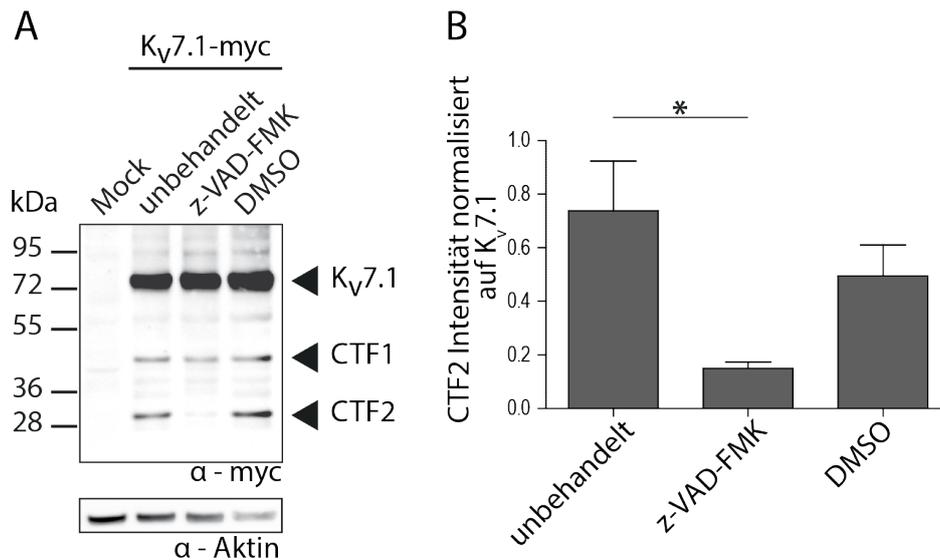


Abb. 24 Einfluss von z-VAD-FMK auf die CTF2 Generierung. A: Transient transfizierte Cos7 Zellen wurden für 12 h mit z-VAD-FMK sowie DMSO behandelt. Die Proteinsynthese von K_v7.1 zeigt im Western Blot Signale bei ca. 72 kDa, ca. 40 kDa (CTF1) und ca. 28 kDa (CTF2). B: Die Auswertung erfolgte anhand drei unabhängiger Experimente. Dargestellt ist die Intensität des CTF2 Signals normalisiert auf die α-Untereinheit von K_v7.1.

Um den Befund der Caspase-abhängigen Proteolyse zu verstärken, wurde im nächsten Schritt mit einem weiteren Breitspektrum-Caspase Inhibitor (Q-VD-OPh) gearbeitet. Dieser ebenfalls membrangängige Inhibitor hemmt Caspase-1, Caspase-3 sowie Caspase-8 und Caspase-9. Um den Einfluss des Inhibitors zu testen, wurden Zellen (Cos7) transient mit K_v7.1 transient transfiziert und anschließend für 12 h mit 450 nM Q-VD-OPh inkubiert. Die Auswertung mittels Western Blots zeigte eine deutliche Reduktion des zweiten Spaltfragments-CTF2 (Abb. 25 A), sowie ein stärkeres Signal für das erste Spaltfragment-CTF1. Die densitometrische Auswertung mehrere unabhängiger Experimente (Abb. 25 B) zeigte eine signifikante Reduktion des CTF2 unter Einfluss von Q-VD-OPh. Gleichzeitig konnte eine leichte Zunahme des Signals für CTF1 beobachtet werden. Durch die Verwendung der beiden Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Bildung des CTF2 durch eine Caspase vermittelt wird. Eine nähere Bestimmung um welche Caspase es sich handelt ist hierdurch allerdings nicht möglich.

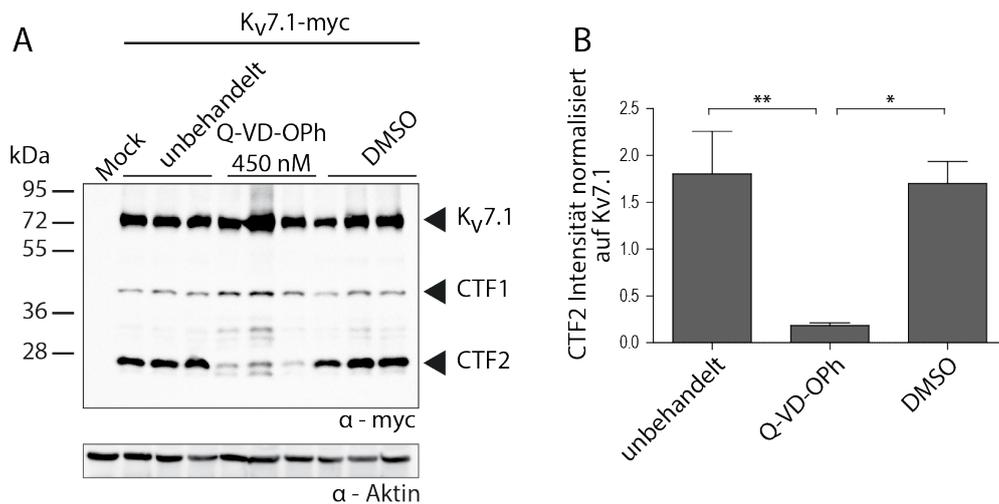


Abb. 25 Einfluss von Q-VD-Oph auf die Prozessierung von Kv7.1 in Cos7 Zellen. A: Transient transfizierte Zellen wurden für 12 h mit 450 nM Q-VD-Oph inkubiert. Die Proteinsynthese wurde mittels Antikörpers gegen das C-terminale myc Epitop kontrolliert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen aufgetragen. Die Proteinsynthese von Kv7.1 zeigt im Western Blot Signale bei ca. 72 kDa, ca. 40 kDa (CTF1) und ca. 28 kDa (CTF2). B: Die Auswertung erfolgte anhand drei unabhängiger Experimente. Dargestellt ist die Intensität des CTF2 normalisiert auf die α -Untereinheit.

4.1.10 Induktion der Proteolyse von Kv7.1 mittels Staurosporin

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Caspasen für die Generierung des zweiten Spaltfragmentes verantwortlich sind, wurde im nächsten Schritt versucht die Spaltung von Kv7.1 durch die Aktivierung von Caspasen zu induzieren. Staurosporin, ein Alkaloid synthetisiert von *Streptomyces staurosporeus*, wirkt pro-apoptotisch durch Aktivierung von Caspase-3 (Chae *et al.* 2000). Um die Wirkung von Staurosporin auf die Proteolyse von Kv7.1 zu testen, wurden Zellen transient mit Kv7.1 transfiziert und mit 1 μ M Staurosporin für verschiedene Zeiträume inkubiert. Die Behandlung mit Staurosporin führt bereits nach 4 h zu einem stärkeren Signal des CTF2 im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen. Nach 8 h war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt (Abb. 26 A). Die densitometrische Auswertung mehrerer unabhängiger Experimente, zeigte ebenfalls einen deutlichen Effekt von Staurosporin nach 8 h auf die Generierung des CTF2 (Abb. 26 B). Hieraus konnte geschlossen werden, dass eine Aktivierung von Caspase-3 mittels Staurosporin zu einer gesteigerten Generierung des CTF2 führt, jedoch keinen Effekt auf CTF1 hatte.

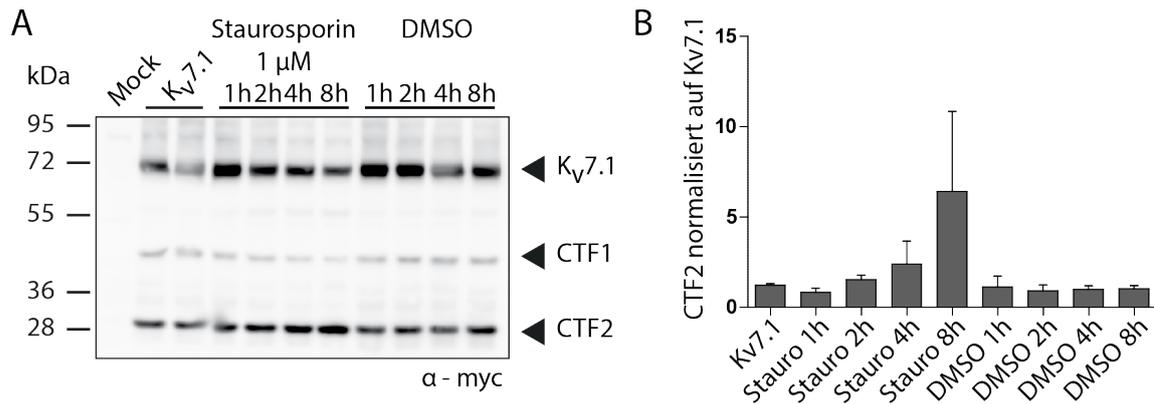


Abb. 26 Einfluss von Staurosporin auf die Generierung des CTF2. A: HeLa Zellen wurden transient mit Kv7.1 transfiziert und anschließend für unterschiedliche Zeiträume mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Die Auswertung des Western Blots zeigt Signale bei ca. 72 kDa welche der α -Untereinheit entsprechen sowie Signale bei 40 kDa (CTF1) und 28 kDa (CTF2). Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO behandelt sowie untransfizierte Zellen aufgetragen. B: Dargestellt ist die Intensität des CTF2 Signals normalisiert auf die α -Untereinheit. Die Auswertung erfolgte anhand zwei unabhängiger Experimente.

4.1.11 Prozessierung des C-Terminus von Kv7.1

Um zu überprüfen, ob die Spaltung von Kv7.1 von seiner Funktion als Kanal abhängig ist, wurde eine Mutante erstellt, welche nur den cytosolischen C-Terminus von Kv7.1 exprimiert und keinen funktionellen Kanal bilden kann (Kv7.1-CTF1). Um die Spaltung des C-Terminus zu untersuchen, wurden Zellen transient mit dem Konstrukt Kv7.1-CTF1 transfiziert und anschließend mit 1 μ M Staurosporin über Nacht inkubiert. Die anschließende Auswertung mittels Western Blots zeigte, dass unter Staurosporin Behandlung eine deutliche Prozessierung des CTF1 in das CTF2 zu erkennen ist (Abb. 27 A). Die densitometrische Auswertung mehrerer Experimente zeigte einen signifikanten Anstieg des CTF2 Signals unter Staurosporin Behandlung (Abb. 27 B). Die unbehandelten und die zur Kontrolle mit DMSO behandelten Zellen zeigten nur schwache Signale für CTF2. Aus diesem Experiment konnte abgeleitet werden, dass für die Generierung des CTF2 der C-Terminus von Kv7.1 als Substrat für die Protease ausreichend ist und die Funktion als Kanal und der damit verbundene Ionenfluss abdingbar ist.

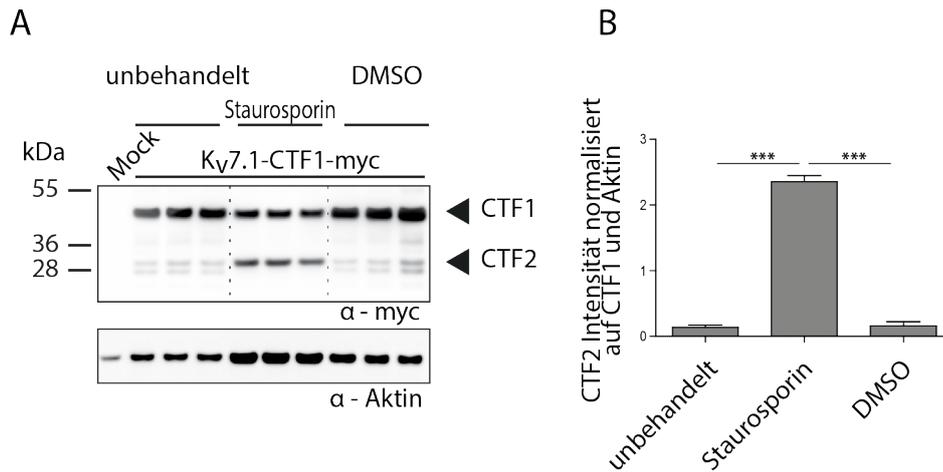


Abb. 27 Proteolyse des C-Terminus von Kv7.1. A: HeLa Zellen wurden transient mit dem C-Terminus von Kv7.1 transfiziert und anschließend 8 h mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Die Proteinsynthese wurde mittels myc Antikörpers kontrolliert. Im Western Blot sind Signale bei ca. 40 kDa (C-Terminus) und ca. 28 kDa (CTF2) zu erkennen. Als Kontrolle wurden nicht behandelte sowie DMSO behandelte Zellen verwendet. Die Antikörperkontrolle erfolgte mittels untransfizierter Zellen. B: Dargestellt ist die Signalstärke des CTF2 welche auf die α -Untereinheit sowie auf Aktin normalisiert wurde.

4.1.12 Caspase-8 Inhibitor verringert die Proteolyse von Kv7.1

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss eines Caspase-8 Inhibitors auf die Generierung des CTF2 untersucht. Caspase-8 ist verantwortlich für die Aktivierung von Caspase-3, welche als Effektorcaspase entscheidend für die Proteolyse einer Vielzahl von Substraten ist. HEK293T Zellen wurden stabil mit Kv7.1-myc transfiziert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen des Caspase-8 Inhibitors inkubiert. Die Induktion der Apoptose erfolgte anschließend mittels Staurosporin. Die nur mit Staurosporin behandelten Zellen zeigten ein starkes Signal im Western Blot bei ca. 28 kDa (Abb. 28 A). Die Behandlung der Zellen mit Staurosporin und Caspase-8 Inhibitor führte zu einer verminderten CTF2 Generierung (Abb. 28 A). Dieser Effekt ist bei 50 μ M Caspase-8 Inhibitor am stärksten ausgeprägt (Abb. 28 B). Die Wirkung des Inhibitors wurde indirekt über die Spaltung von Caspase-3 überprüft. Die Behandlung der Zellen mit Staurosporin führte zu einer Aktivierung von Caspase-3, deutlich zu erkennen an dem Signal bei ca. 17 kDa, welches der aktiven Form von Caspase-3 entspricht (Abb. 28 C). Die gleichzeitige Inkubation mit Staurosporin und Caspase-8 Inhibitor hatte hingegen keinen Effekt auf Caspase-3 (Abb. 28 C). Die Behandlung mit Staurosporin führte zu einer gesteigerten Generierung des CTF2. Dieser Effekt konnte durch die Verwendung eines Caspase-8 Inhibitors deutlich vermindert werden.

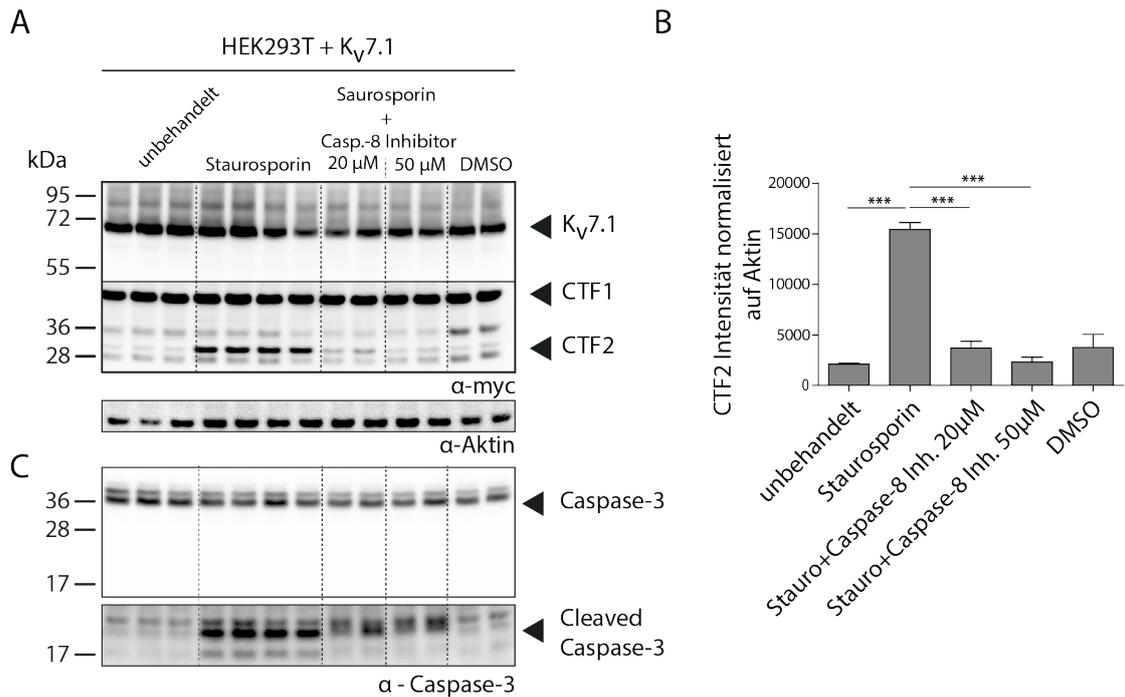


Abb. 28 Inhibition der Proteolyse von K_v7.1 durch Caspase-8 Inhibitor. A: Mit K_v7.1 stabil transfizierte HEK293T Zellen wurden mit 20 μM und 50 μM Caspase-8 Inhibitor für 1 h inkubiert und anschließend mit 1 μM Staurosporin für weitere 8 h behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte sowie mit DMSO behandelte Zellen verwendet. Die Analyse des Western Blots zeigt deutliche Signal bei 72 kDa, 40 kDa und 28 kDa. Um die Signale im unteren Bereich besser sichtbar zu machen, wurde der Blot dort länger entwickelt. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. B: Dargestellt ist die Signalstärke des CTF2, welche auf Aktin normalisiert wurde. C: Caspase-8 Inhibitor Kontrolle. Der Blot wurde anschließend mit Caspase-3 Antikörper behandelt. Zu erkennen ist die Pro-Form bei 34 kDa sowie die aktive Form bei 17 kDa.

4.1.13 siRNA Behandlung von stabil transfizierten Zellen

Da Inhibitoren gegen Caspasen zwar eine Präferenz für bestimmte Caspasen besitzen, aber auch andere Caspasen inhibiert werden, wurde gezielt siRNA eingesetzt um die Translation von Caspase-3, -6, -8 und -9 zu minimieren und somit, die für die Spaltung von K_v7.1 verantwortliche Caspase zu identifizieren. Mit K_v7.1 stabil transfizierte HEK293T Zellen wurden mit der entsprechenden siRNA inkubiert und anschließend die Apoptose mittels Staurosporin induziert. In der Probe welche mit Caspase-3 siRNA behandelt wurde, konnte im Blot am wenigsten CTF2 detektiert werden, wohingegen die nicht mit siRNA behandelte Probe nach Apoptose Induktion ein deutliches Signal für CTF2 im Western Blot zeigt (Abb. 29 A). Die densitometrische Auswertung der CTF2 Intensität ist in Abb. 29 D dargestellt. Der *knock down* der verschiedenen Caspasen wurde für Caspase-3 und Caspase-8 mittels Antikörpers kontrolliert (Abb. 29 B und C). Im Western Blot ist eine deutliche Reduktion der prozessierten Form von Caspase-3 (p17), sowie eine mäßige Reduktion der Pro-Form (p34) zu erkennen. Der *knock down* von Caspase-3 wurde durch die densitometrisch Auswertung des p17 Fragments bestimmt (Abb. 29 E).

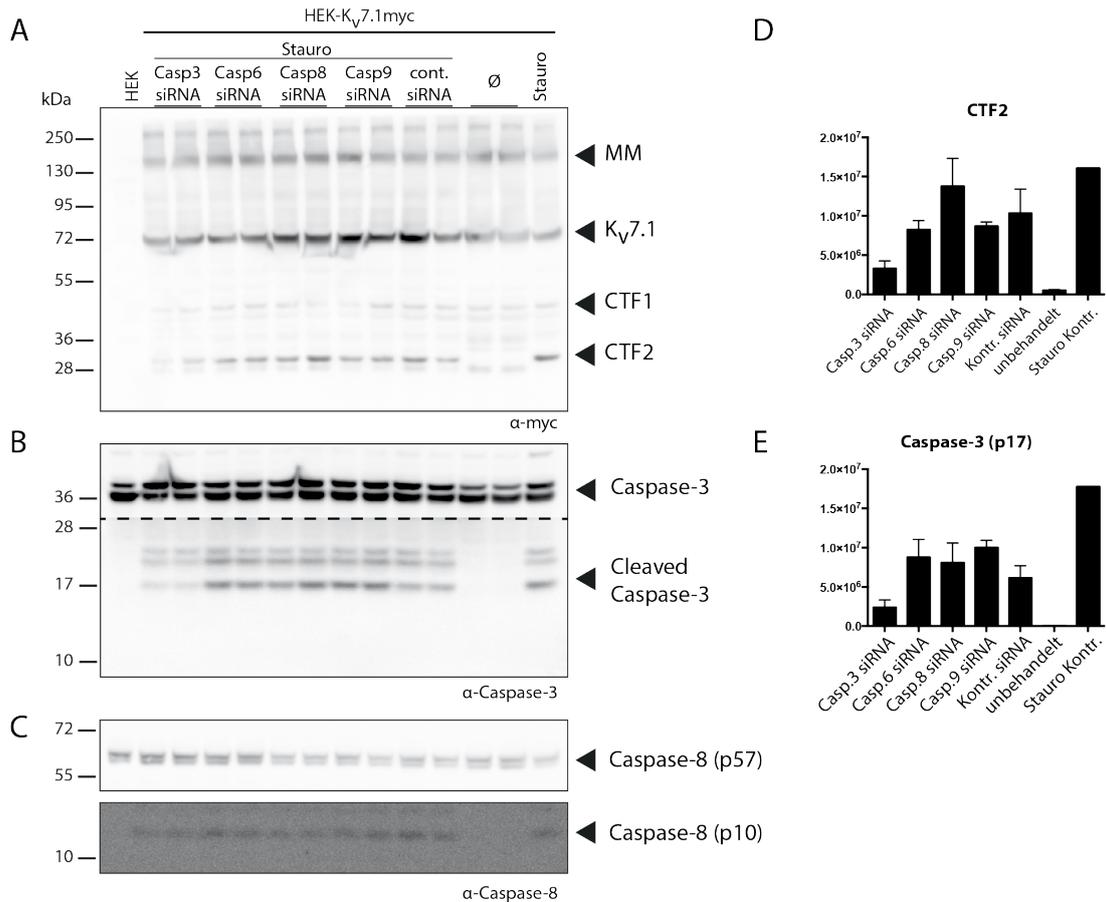


Abb. 29 siRNA gegen Caspase-3, -6, -8 und -9. A: Stabil mit K_v7.1 transfizierte Zellen wurden mit siRNA gegen verschiedene Caspasen behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte, untransfizierte und mit DMSO behandelte Zellen verwendet. Die Aktivierung der Caspasen erfolgte mit 1 μM Staurosporin für 8 h. B: Der Blot wurde anschließend mit Caspase-3 Antikörper behandelt. Zu erkennen ist die Pro-Form von Caspase-3 bei 34 kDa sowie die prozessierte Form bei 17 kDa. C: Kontrolle des Caspase-8 *knock down* mittels Antikörper gegen Caspase-8. D-E: Densitometrische Auswertung der CTF2 und Caspase-3 (p17) Intensität.

Die Auswertung der Experimente zeigte einen deutlichen Einfluss zwischen Caspase-3 Prozessierung und der Generierung des CTF2. Der Zusammenhang zwischen CTF2 Generierung und den anderen getesteten Caspasen, konnte aufgrund fehlender Antikörper oder ineffizienten *knock downs* nicht genauer geklärt werden.

4.1.14 Überexpression von Caspase-3

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit die Überexpression von Caspase-3 zu einer verstärkten Generierung des CTF2 führt. Hierzu wurden HeLa Zellen transient mit K_v7.1-myc und GFP oder K_v7.1-myc und Caspase-3 transfiziert. Die Induktion der Apoptose erfolgte mittels Staurosporin. Die Zellen welche mit K_v7.1 und Caspase-3 kotransfiziert wurden, zeigten ein starkes Signal im Western Blot für das zweite C-terminale Fragment (CTF2) bereits ohne Behandlung mit Staurosporin. Die Induktion der Apoptose steigerte die Generierung des CTF2

noch einmal (Abb. 30 A). Die Zellen, welche mit K_v7.1-myc und GFP kotransfiziert wurden, zeigten hingegen kein Signal für CTF2 im Western Blot. Als Marker für die Induktion der Apoptose wurde ein Caspase-3 Antikörper verwendet. Die Spaltung von Caspase-3 von der Pro-Form (p34) in die aktive Form (p17) ist in Abb. 30 B dargestellt. Eine Prozessierung von Caspase-3 konnte nur in den mit Caspase-3 transfizierten Zellen beobachtet werden. Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Caspase-3 zusammen mit K_v7.1 zu einer vermehrten Prozessierung von K_v7.1 führt.

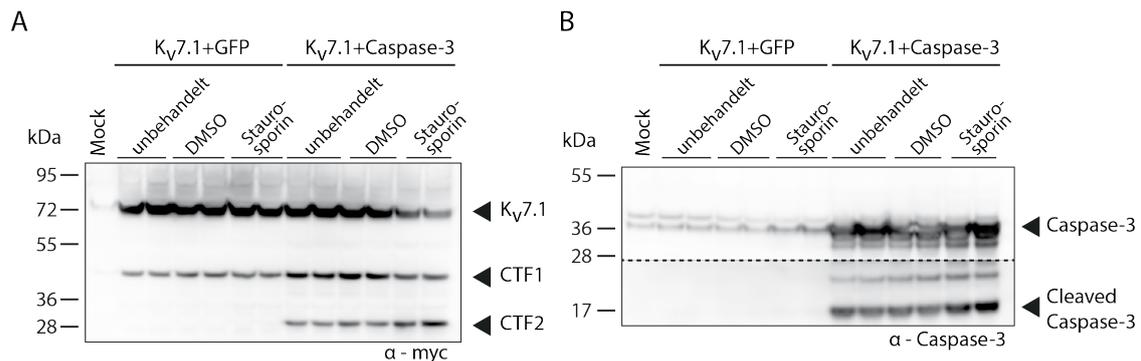


Abb. 30 Western Bot Analyse der Koexpression von K_v7.1 mit GFP und Caspase-3. A: HeLa Zellen wurden transient mit K_v7.1 und GFP oder K_v7.1 und Caspase-3 transfiziert. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit 1 μM Staurosporin für 4 h. Als Kontrolle wurden untransfizierte, unbehandelte sowie mit DMSO behandelte Zellen verwendet. Die Signale bei 72 kDa entsprechen der α-Untereinheit, bei 40 kDa (CTF1) dem ersten Spaltfragment und bei 28 kDa (CTF2) dem zweiten Spaltfragment. B: Der Western Blot wurde anschließend mit Caspase-3 Antikörper behandelt. Zu erkennen sind deutlich die Pro-Form bei 34 kDa sowie die aktive Form bei 17 kDa.

4.1.15 Einfluss von inaktiver Caspase-3 auf die Generierung des CTF2

Um den Einfluss von Caspase-3 auf die Prozessierung von K_v7.1 noch genauer zu untersuchen, wurde eine inaktive Mutante der Caspase-3 erzeugt. Dafür wurden, die für die proteolytische Spaltung von Caspase-3 wichtigen Aspartate (D28 und D175) (Roy *et al.* 2001) gegen Alanin ersetzt. Anschließend wurden K_v7.1 zusammen mit der aktiven Caspase-3 (wt) und der inaktiven Caspase-3 (D28A-D175A) in HeLa Zellen exprimiert. Die Koexpression von K_v7.1 mit der Wildtyp Caspase-3 führte zu einer vermehrten Generierung des CTF2 im Vergleich zu der Koexpression mit der inaktiven Form der Caspase-3. Die Spaltung von Caspase-3 wurde mittels Western Blot und eines Caspase-3 spezifischen Antikörpers kontrolliert. Die inaktive Form (D28A-D157A) führte lediglich zur Synthese der Pro-Form von Caspase-3, die aktive Form zeigte dagegen die Pro-Form sowie die proteolytisch aktiven Fragmente (p17) (Abb. 31).

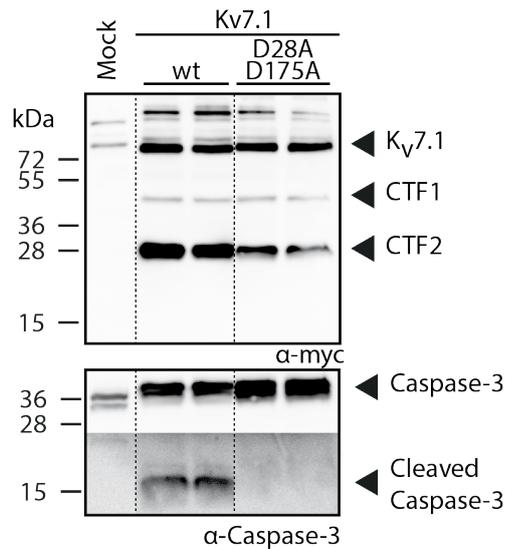


Abb. 31 Einfluss von inaktiver Caspase-3 auf die Spaltung von Kv7.1. Inaktive Caspase-3 (D28A-D175A) und aktive Caspase-3 (wt) wurden zusammen mit Kv7.1 in HeLa Zellen exprimiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Der verwendete myc Antikörper zeigt Banden bei 72 kDa, 40 kDa (CTF1) und 28 kDa (CTF2). Die Analyse des Western Blots mit einem Caspase-3 Antikörper zeigt die Pro-Form von Caspase-3 (pro) sowie die prozessierten aktiven Formen (p12 und p17).

Die Überexpression von Caspase-3 führte zu einer gesteigerten Generierung des CTF2. Die Prozessierung von Caspase-3 konnte ebenfalls beobachtet werden. Die inaktive Form von Caspase-3 zeigte dagegen keine Prozessierung und eine verminderte Bildung des CTF2.

4.1.16 Arginin und Tryptophan Mutationen innerhalb der Caspase-3 Schnittstelle

Die bevorzugte Aminosäuresequenz für die Spaltung durch Caspase-3 ist DxxD - Gxxx, Arginin und Tryptophan werden dagegen selten innerhalb der Schnittstelle gefunden (Stennicke *et al.* 2000). Durch den Einbau von Arginin und Tryptophan innerhalb der Schnittstelle sollte untersucht werden, inwieweit die Spaltung durch Caspase-3 inhibiert werden kann. Die Auswertung der Western Blots ergab, dass insbesondere der Austausch gegen Tryptophan direkt vor der Schnittstelle die Spaltung durch Caspase-3 zu inhibieren scheint. Hingegen zeigte der Austausch gegen Tryptophan direkt nach der Schnittstelle keinen Einfluss auf die Generierung des CTF2 zu haben (Abb. 32). Der Austausch der Aminosäuren gegen Arginin und Tryptophan führte zu einem veränderten Molekulargewicht des CTF1 (G460W) und CTF2.

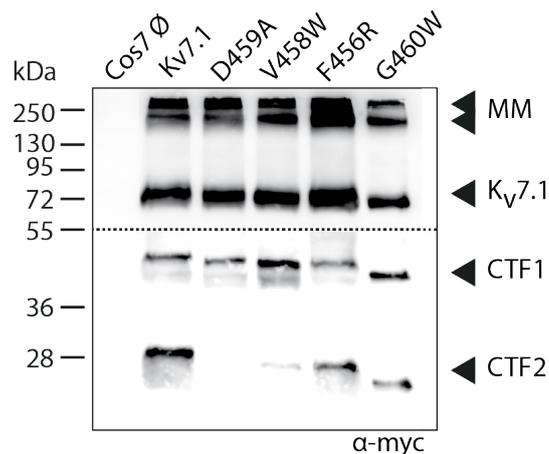


Abb. 32 Arginin und Tryptophan Mutationen innerhalb der Caspase-3 Schnittstelle. Cos7 Zellen wurden mit den Mutanten und einer wt Kontrolle transient transfiziert. Der Nachweis von K_v7.1 erfolgte mittels myc Antikörpers gegen ein myc Epitop am C-terminalen Ende von K_v7.1. Die Signale bei 250 kDa entsprechen den Multimeren von K_v7.1. Die Signale bei 72 kDa entsprechen dem unprozessierten Protein. Bei 40 kDa und 28 kDa sind die Signale für die beiden Spaltfragmente zu erkennen (CTF1 und CTF2).

4.1.17 Induktion der K_v7.1 Proteolyse durch MG 132

Wie oben bereits beschrieben, ist es möglich die Apoptose mittels Staurosporin oder TNF- α zu induzieren. Eine weitere Möglichkeit der Induktion von Apoptose erfolgt über die Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen durch den Proteasominhibitor MG132 und die daraus resultierende Aktivierung von Caspase-3 (Zanotto-Filho *et al.* 2012). Die Inkubation von stabil transfizierten Zellen zeigte eine vermehrte Generierung des CTF2 unter Behandlung mit MG132 von 1 μ M (Abb. 33 A) und eine gleichzeitige Aktivierung von Caspase-3 (Abb. 33 B). DMSO zeigte keinen Einfluss auf die CTF2 Generierung sowie auf die Caspase-3 Aktivierung (Abb. 33 A und B). Anhand dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass die induzierte Spaltung von Caspase-3 mittels MG132 zu einer vermehrten Generierung des CTF2 von K_v7.1 führt. Die Bildung des CTF1 wurde durch die Behandlung mit MG132 nicht beeinflusst.

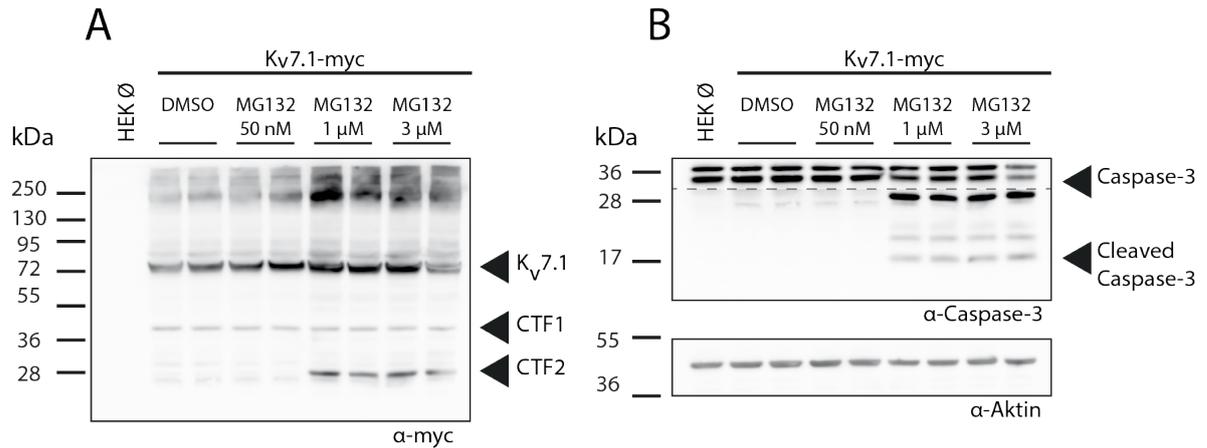


Abb. 33 Caspase-3 Aktivierung mittels MG 132. K_v7.1 stabil transfizierte HEK293T Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen MG 132 für 16 h inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt, die Antikörperkontrolle erfolgte mittels nicht transfizierter HEK 293T Zellen. A: Western Blot Analyse der K_v7.1 Fragmentierung mittels myc Antikörpers. Die Signale bei 250 kDa entsprechen den Multimeren von K_v7.1. Die Signale bei 72 kDa entsprechen dem unprozessierten Protein. Bei 40 kDa und 28 kDa sind die Signale für die beiden Spaltfragmente zu erkennen (CTF1 und CTF2). B: Analyse der Caspase-3 Aktivierung. Die Signale bei 34 kDa entsprechen der Pro-Form von Caspase-3. Die Signale bei 17 kDa entsprechen dem prozessierten Protein.

4.1.18 Induktion der Proteolyse von K_v7.1 in HL-1 Zellen

Um mögliche Effekte einer Überexpression von K_v7.1 auf die Fragmentierung dieses Proteins auszuschließen und zu zeigen, dass auch endogenes K_v7.1 Caspase-3 abhängig gespalten wird, wurde versucht K_v7.1 endogen in Zellen zu detektieren und mittels Staurosporin eine Fragmentierung zu induzieren. Die verwendete Zelllinie HL-1 ist eine murine Herzmuskelzelllinie, welche vor allem in Kultur fähig ist zu kontrahieren (Claycomb *et al.* 1998). Die Behandlung der Zellen für 6,5 h mit 0,5 μ M Staurosporin zeigte bereits einen deutlichen Einfluss auf die Entstehung des CTF2. Dieser Effekt konnte mit steigender Staurosporin Konzentration noch verstärkt werden (Abb. 34 A). Gleichzeitig wurde die Aktivität von Caspase-3 untersucht (Abb. 34 B). Es zeigte sich, dass mit zunehmender Staurosporin Konzentration vermehrt Caspase-3 von der Pro-Form in die aktive Form überführt wurde. Anhand dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Staurosporin auch auf endogenes K_v7.1 zu einer vermehrten Generierung des CTF2 führt. Gleichzeitig konnte auch hier eine Aktivierung von Caspase-3 beobachtet werden.

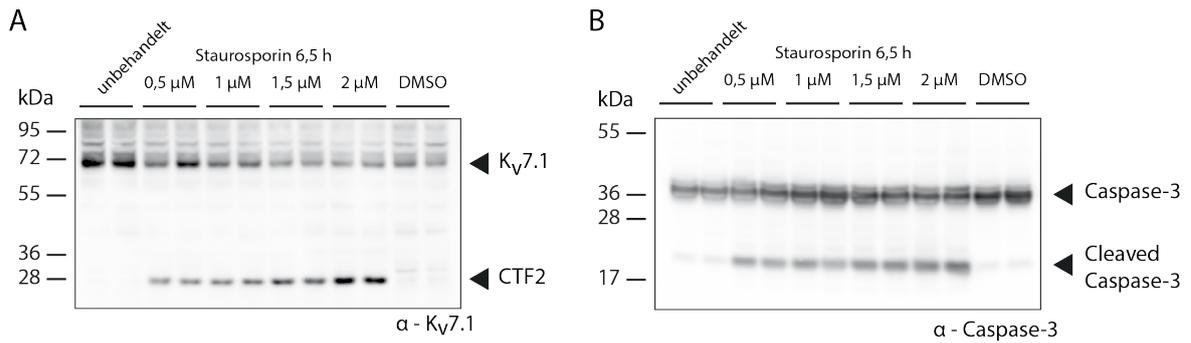


Abb. 34 Apoptose Induktion in HL-1 Zellen. A: HL-1 Zellen wurden für 6,5 h mit verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin inkubiert. Die Analyse des Western Blots erfolgte mit einem Antikörper der gegen den distalen Bereich des K_v7.1 C-Terminus generiert wurde. Als Kontrolle wurden DMSO behandelte sowie unbehandelte Zellen verwendet. Der Antikörper zeigt Signale bei 72 kDa sowie bei 28 kDa (CTF2). B: Die Analyse des Western Blots erfolgte mit einem Antikörper gegen Caspase-3. Der Antikörper zeigt Signale bei 34 kDa (Pro-Form) und ca. 17 kDa (aktive Form).

4.1.19 Einfluss von K_v7.1 auf die Apoptose

Um eine Aussage über die Abhängigkeit von K_v7.1 auf Apoptose machen zu können, wurden HeLa Zellen transient mit verschiedenen K_v7.1 Mutanten allein und die Mutanten zusammen mit Caspase-3 exprimiert und anschließend mittels eines Durchflusszytometers analysiert. Die Zellen wurden hierfür mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt. Annexin V diente hierbei als Marker für apoptotische Zellen (Schutte *et al.* 1998; van Engeland *et al.* 1998). Im Unterschied dazu wurde Propidiumiodid genutzt um Zellen ohne intakte Membran zu markieren. Für die Durchflusszytometrie wurden die K_v7.1 Konstrukte C-terminal mit einem GFP-Tag fusioniert um sie von nicht transfizierten Zellen unterscheiden zu können. Anhand der verwendeten Marker war es somit möglich, die Zellen in verschiedene Phasen einzuteilen: frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose und lebende Zellen. Die Auswertung ergab eine signifikant erhöhte Menge an Zellen in der späten Apoptose bei Zellen, die mit K_v7.1 oder K_v7.1-D459A zusammen mit Caspase-3 transfiziert wurden (Abb. 35 späte Apoptose). Gleichzeitig wurde eine Reduktion der lebenden Zellen in den mit K_v7.1 und K_v7.1-D459A transfizierten Zellen sowohl mit als auch ohne Caspase-3 beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die oben genannten Effekte unabhängig von der Spaltung von K_v7.1 sind, da sie sowohl mit dem K_v7.1 wt als auch mit der D459A Mutante auftraten.

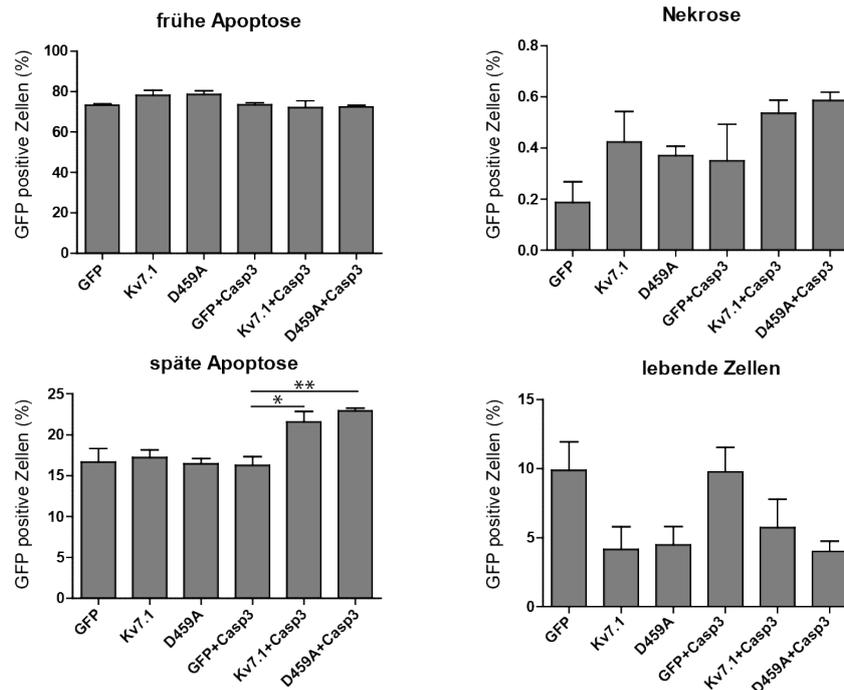


Abb. 35 Einfluss von Kv7.1 auf Apoptose. HeLa Zellen wurden transient mit GFP-getaggtten Kv7.1 Konstrukten allein und zusammen mit Caspase-3 transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit GFP und GFP zusammen mit Caspase-3 transfiziert. Die Einteilung in frühe Apoptose, späte Apoptose, Nekrose und lebende Zellen erfolgte durch Einteilung der Zellen in Annexin V positiv und negativ sowie PI positiv und negative Zellen. (Frühe Apoptose: Annexin V +, PI -; späte Apoptose: Annexin V +, PI +; Nekrose: Annexin V -, PI +; lebende Zellen: Annexin V -, PI-).

4.1.20 Einfluss von $K_v7.1$ auf die Spaltung/Aktivierung von Caspase-3

Der Zusammenhang von Apoptose und Ionenkanälen wurde bis jetzt nur wenig untersucht. Allgemein wird die Apoptose durch den vermehrten Fluss von Ionen und der damit verbundenen morphologischen Veränderung der Zelle beschrieben (Maeno *et al.* 2000). Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit $K_v7.1$ direkt für die Prozessierung von Caspase-3 verantwortlich ist und damit einen direkten Einfluss auf die Apoptose hat. Hierfür wurden Zellen transient mit Caspase-3 und $K_v7.1$ sowie mit Caspase-3 und GFP transfiziert. Anschließend wurde mittels Western Blot die Caspase-3 Prozessierung analysiert. Die Koexpression von Caspase-3 und $K_v7.1$ führte auch ohne Behandlung mit Staurosporin zu einer Induktion der Caspase-3 Spaltung und damit zu einer Aktivierung dieser (Abb. 36).

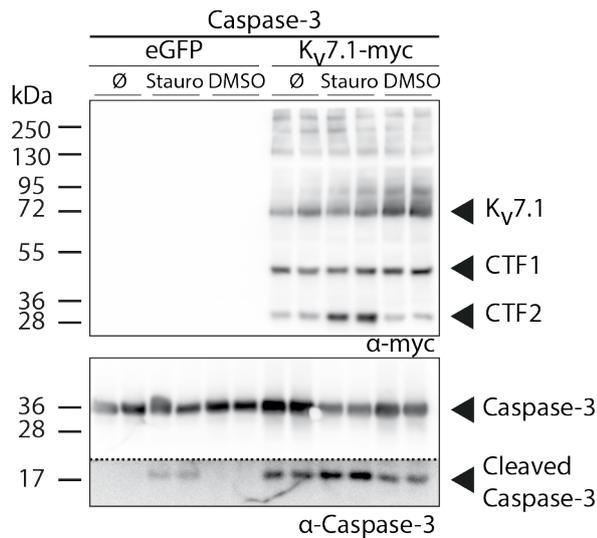


Abb. 36 Einfluss von K_v7.1 auf die Prozessierung von Caspase-3. HEK293T Zellen wurden transient mit Caspase-3/GFP; Caspase-3/K_v7.1. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 7 h mit 2 μM Staurosporin inkubiert, um die Prozessierung von Caspase-3 zu induzieren. Die Negativkontrolle erfolgte mittels DMSO. Der mit myc Antikörper behandelte Blot zeigte die Multimere von K_v7.1 (250 kDa), die α-Untereinheit (72 kDa) sowie die beiden Spaltfragmente (CTF1 und CTF2). Der mit Caspase-3 Antikörper behandelte Western Blot zeigte Signale für die Pro-Form (34 kDa) sowie die prozessierte Form (17 kDa).

4.1.21 Spaltung von K_v7.1 und Aktivierung von Caspase-3 in Abhängigkeit von der Kanalaktivität

Die bisherigen Experimente zeigten eine vermehrte Spaltung von K_v7.1 in Zusammenhang mit der Aktivierung von Caspase-3. Um zu untersuchen inwieweit die Aktivität des Ionenkanals für die Prozessierung eine Rolle spielt wurde eine dominant negative Mutante von K_v7.1 (K_v7.1-D317A) verwendet. Eine Punktmutation innerhalb des Selektivitätsfilters führt zu einer inaktiven Form des Ionenkanals. Um eine Aussage über die Spaltung von K_v7.1 zu machen, wurden neben der dominant negativen auch der Wildtyp (K_v7.1) sowie die D459A und die G460S Mutante untersucht. Bei der G460S Mutante handelt es sich um eine, in LQT1 Patienten vorkommende, natürlich Mutation direkt hinter der potentiellen Schnittstelle durch Caspase-3. Die Auswertung der transienten Transfektion ergab eine vermehrte Spaltung der dominant negativen Mutante im Vergleich zum wt und zu der LQT1 Mutation (Abb. 37). In allen Proben konnte die Bildung von CTF1 beobachtet werden. Die Generierung von CTF2 wurde nur in der dominant negativen Mutante (D319A) festgestellt. Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass eine Spaltung unabhängig von der Funktion als Ionenkanal stattfindet.

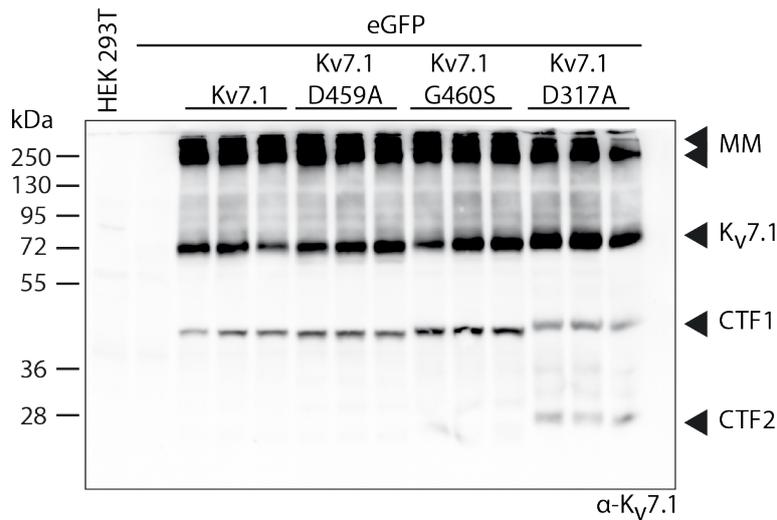


Abb. 37 Einfluss der Kanalaktivität auf die Spaltung von K_v7.1. HEK293T Zellen wurden transient mit den verschiedenen K_v7.1 Konstrukten und GFP kotransfiziert. Die Mutante D317A war im Gegensatz zu den anderen Mutanten HA-getagt, weshalb mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von K_v7.1 detektiert wurde. Der Antikörper zeigt Banden im hochmolekularen Bereich wobei es sich um Multimere von K_v7.1 handelt (MM). Die Signale bei 72 kDa entsprechen dem unprozessierten Protein, die Signale bei 40 kDa dem ersten Spaltfragment (CTF1) sowie das zweite Spaltfragment bei 28 kDa (CTF2).

Wie von Maeno *et al.* (Maeno *et al.* 2000) beschrieben, besteht ein Zusammenhang von Ionenfluss und Apoptose. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von Caspase-3 durch K_v7.1 abhängig von der Kanalaktivität ist, wurde eine dominant negative Mutante (K_v7.1-D317A) verwendet. Um eine vergleichende Aussage über die Caspase-3 Aktivierung machen zu können, wurden neben dem wt auch die D459A sowie die LQT1 Mutante G460S verwendet. Die Koexpression der Mutanten zusammen mit Caspase-3 zeigt eine vermehrte Generierung des CTF2 in der dominant negativen Mutante (Abb. 38 A). Die Analyse der Caspase-3 Aktivierung zeigt in allen mit K_v7.1 transfizierten Proben eine Spaltung von Caspase-3. Die Koexpression mit GFP zeigte keinen Einfluss auf die Spaltung von Caspase-3 (Abb. 38 B). Dieses Experiment zeigte die Spaltung von Caspase-3, unabhängig von einem durch K_v7.1 verursachten Ionenfluss, sowie eine vermehrte Generierung des CTF2 durch Caspase-3 Überexpression. Weiterhin war zu beobachten, dass die Mutante D317A-HA im Gegensatz zu den *myc-getaggten* Proteinen im Western Blot ein anderes Molekulargewicht für das CTF2 aufwies.

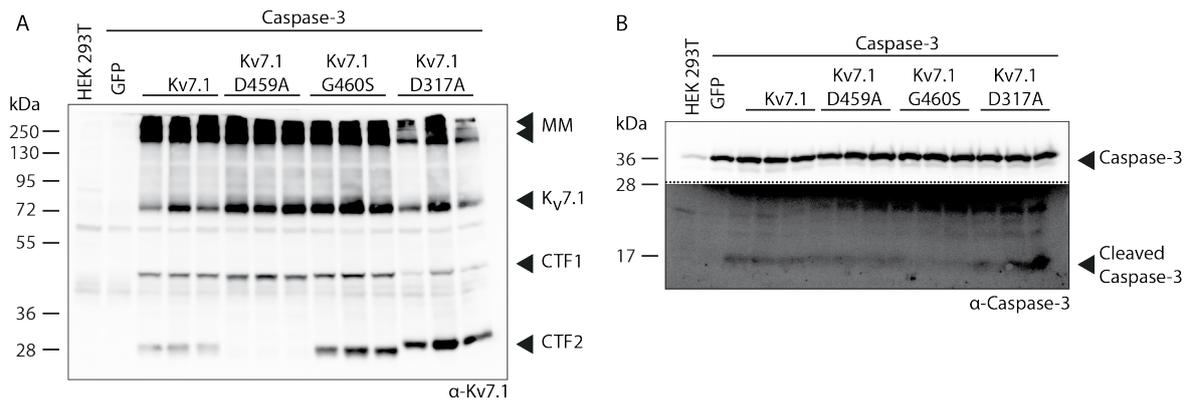


Abb. 38 Einfluss von Caspase-3 auf die Spaltung von K_v7.1. A: HEK293T Zellen wurden transient mit den verschiedenen K_v7.1 Konstrukten und Caspase-3 kotransfiziert. Als negativ Kontrolle wurden untransfizierte sowie GFP transfizierte Zellen verwendet. Die Mutante D317A war im Gegensatz zu den anderen Mutanten HA-getagt, weshalb mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von K_v7.1 detektiert wurde. Der Antikörper zeigt Banden im hochmolekularen Bereich wobei es sich um Multimere von K_v7.1 handelt (MM). Die Signale bei 72 kDa entsprechen dem unprozessierten Protein, die Signale bei 40 kDa dem ersten Spaltfragment (CTF1) sowie das zweite Spaltfragment bei 28 kDa (CTF2). B: Die Spaltung von Caspase-3 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers kontrolliert. Die Signale bei 34 kDa entsprechen der Pro-Form, die bei 17 kDa der prozessierten Form von Caspase-3.

4.1.22 Künstliche Aortenstenose an Mäusen

Neben der Alterung lässt sich Apoptose im Herzen auch durch operative Eingriffe induzieren. Eine weit verbreitete Methode ist die künstliche Verengung der Aorta (engl. *Transverse Aortic Constriction* – TAC). Hierbei wird die Aorta auf einen definierten Durchmesser verengt was im Folgenden zu einer Erhöhung des Herzinnendrucks und später zu einer Vergrößerung des Herzens führt. Eine Folge dieser künstlichen Aortenstenose ist eine gesteigerte Apoptoserate (Teiger *et al.* 1996; Zhao *et al.* 2004). Um den Einfluss einer künstlichen Aortenstenose auf die Spaltung von K_v7.1 zu untersuchen, wurde an 6 Mäusen die Aorta künstlich verengt und die Herzen nach 4 Wochen entnommen. Die Herzen wurden lysiert und mittels Western Blot auf K_v7.1 und Marker für Apoptose (Caspase-3, Bax, Bcl-2) hin untersucht. In den TAC Proben wurde eine leichte Steigerung der CTF2 Generierung beobachtet (Abb. 39 A und Abb. 40 A). Ebenfalls wurde im Western Blot mehr Caspase-3 (Abb. 39 E und Abb. 40 C), sowie erhöhte Werte von Bax (Abb. 39 C und Abb. 40 B) und BCL-2 (Abb. 39 D und Abb. 40 D) detektiert. Die Prozessierte Form von Caspase-3 (p17) konnte in keiner der Proben detektiert werden. Die Auswertung der Daten zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Generierung des CTF2 und einer vermehrten Caspase-3 Synthese in den TAC-Mäusen.

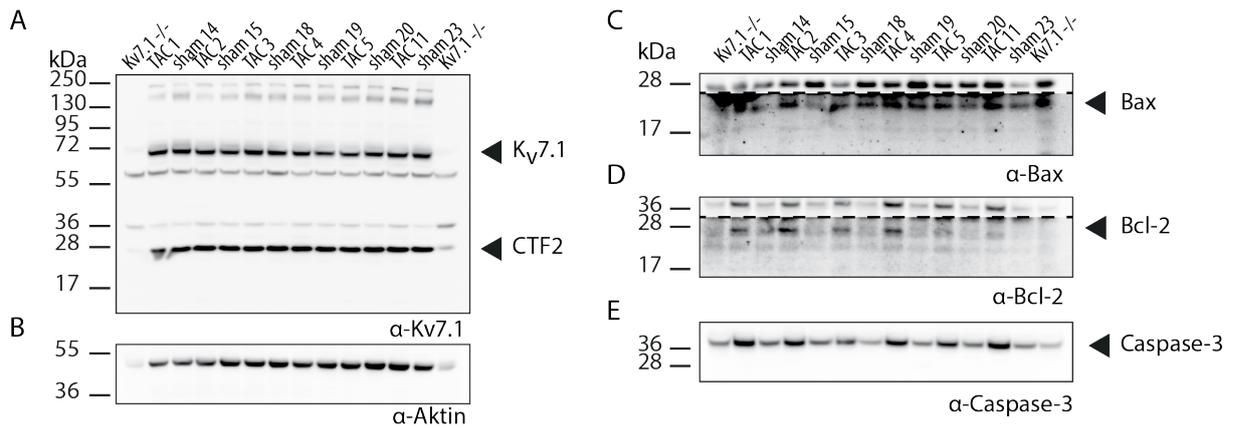


Abb. 39 Aortenstenose an Mäuseherzen. Western Blot Analyse von TAC (*Transverse Aortic Constriction*) Herzlysaten und Kontrolllysate von nicht behandelten Tieren (*sham*). A: Der mit α-Kv7.1 behandelte Blot zeigt spezifische Banden bei 250 kDa (Multimer), 72 kDa (K_v7.1) und 28 kDa (CTF2). Die Signale bei 60 kDa und 36 kDa wurden unspezifisch vom Antikörper erkannt. B: Der mit α-Aktin behandelte Blot zeigte eine vergleichbare Proteinmenge in allen Lysaten. C: Der mit α-Bax Antikörper behandelte Blot zeigte Signale bei ca. 22 kDa (Bax) sowie Banden bei 28 kDa. D: Der mit α-Bcl-2 Antikörper behandelte Blot ergab Banden bei 36 kDa und 28 kDa. Die 28 kDa Bande wurde Bcl-2 zugeordnet. E: Der mit α-Caspase-3 Antikörper behandelte Blot zeigt Signale für die Pro-Form von Caspase-3 bei ca. 36 kDa (Caspase-3).

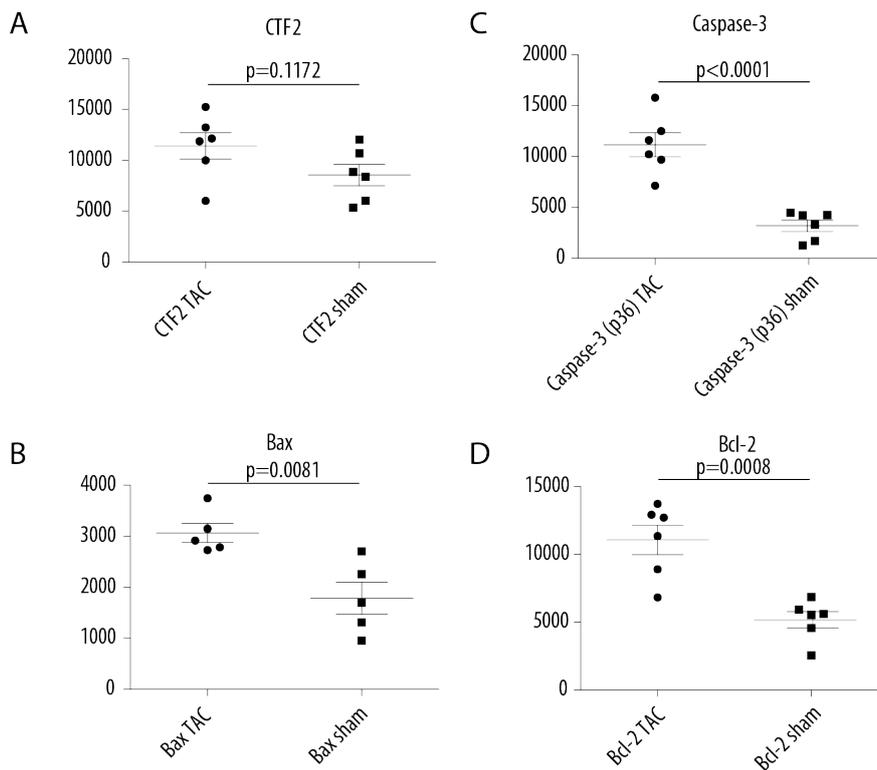


Abb. 40 Densitometrische Auswertung der künstlichen Aortenstenose. Die Western Blots aus Abb. 39 wurden densitometrisch analysiert. Dargestellt ist die Signalstärke der Proteine im Western Blot von CTF2, Caspase-3, Bax und Bcl-2 in den TAC sowie den sham Proben.

Charakterisierung der C-terminalen Fragmente von K_v7.1

4.1.23 Lokalisation der C-terminalen Fragmente innerhalb der Zelle

Um die Lokalisation der Spaltfragmente näher zu untersuchen, wurde der C-Terminus von K_v7.1 (K_v7.1-CT) am C-terminalen Ende mit einem EGFP Tag fusioniert und dessen Lokalisation mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Die Auswertung ergab ein diffuses Signal innerhalb der gesamten Zelle (Abb. 41 A). Gomez-Ospina *et al.* beschreiben in ihrer Publikation die Spaltung und nukleäre Lokalisation des Calciumkanals Cav1.2 (Gomez-Ospina *et al.* 2006). Die Analyse der Aminosäuresequenz von K_v7.1 ergab ein LxxLL Motiv, welches für die Regulation und Bindung von Transkriptionsfaktoren beschrieben ist (Plevin *et al.* 2005). Da die Lokalisation des C-Terminus von K_v7.1 keine nukleäre Verteilung zeigte, wurden die Zellen zusätzlich mit Leptomycin B behandelt. Leptomycin B führt zu einer Akkumulation von nukleären Protein, indem es den Export von Proteinen aus dem Zellkern blockiert (Kudo *et al.* 1998). Die Behandlung mit Leptomycin B und die anschließende Auswertung mittels Immunfluoreszenz ergab eine deutliche Akkumulation des C-terminalen Konstrukts innerhalb des Zellkerns (Abb. 41 B).

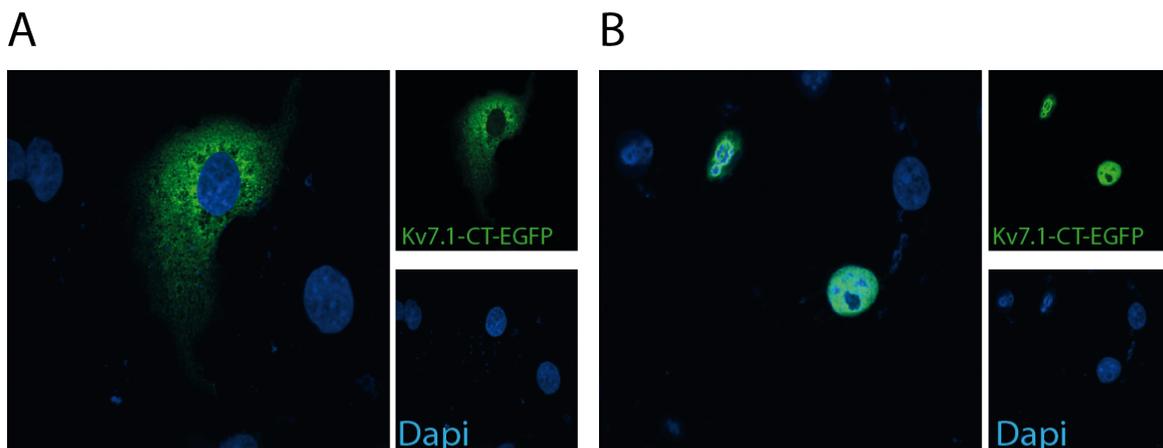


Abb. 41 Lokalisation des CTF1 innerhalb der Zelle. A: Cos7 Zellen wurden transient mit dem C-Terminus von K_v7.1 transfiziert. Die Detektion erfolgte über ein EGFP-Tag am C-terminalen Ende des Proteins. B: Cos7 Zellen wurden transient mit dem C-Terminus von K_v7.1 transfiziert und danach mit 20 nM Leptomycin B für 12 h inkubiert. Die Detektion erfolgte über ein EGFP-Tag am C-terminalen Ende des Proteins.

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass unter Leptomycin B Behandlung eine Akkumulation des CTF2 in der Kernfraktion stattfindet.

4.1.24 Fragmentierung und Abbau des C-terminalen Fragments

Die bisherigen Experimente deuteten auf eine teilweise nukleäre Lokalisation des C-terminalen Fragments von K_v7.1 hin. Um eine Aussage machen zu können, ob der gesamte C-terminus (CTF1) oder nur das kleinere Spaltfragment (CTF2) im Kern lokalisiert ist, wurden

Zellen transient mit dem N-terminal HA-getaggten und C-terminal myc-getaggten K_v7.1 C-Terminus (CTF1) transfiziert und die Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet (Abb. 42). Im Fluoreszenzmikroskop konnte eine Lokalisation des myc getaggten C-Terminus im Kern beobachtet werden. Zellen mit einer positiven Färbung für den HA-getaggten N-Terminus wurden nicht beobachtet. Dies deutete daraufhin, dass der N-terminale Teil des C-Terminus nach der Proteolyse degradiert wird und das entstehende CTF2 in den Zellkern transloziert.

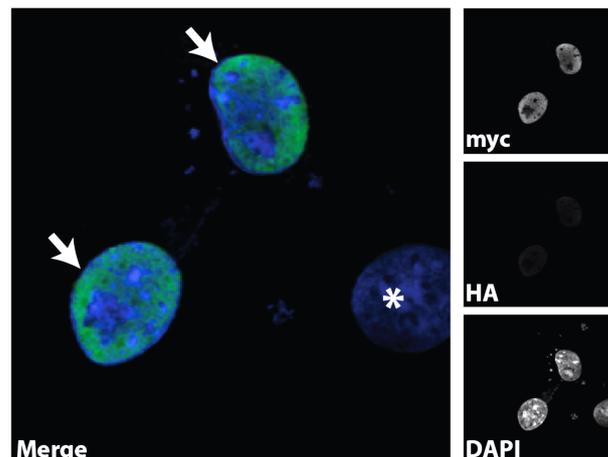


Abb. 42 Lokalisation des K_v7.1 C-Terminus. Cos7 Zellen wurden transient mit dem HA-K_v7.1-CT-myc Konstrukt transfiziert. Die Detektion erfolgte mittels α -HA sowie α -myc Antikörpers. Dapi wurde für die Färbung der DNA verwendet.

Die Fragmentierung des C-Terminus wurde auch mittels Western Blot untersucht. Hierfür wurden HeLa Zellen transient mit dem N-terminal HA-getaggten und C-terminal myc-getaggten K_v7.1 C-Terminus transfiziert. Die Spaltung wurde mittels Staurosporin induziert. Die Analyse der Western Blots zeigte eine Induktion der Spaltung des K_v7.1 C-Terminus in das kleinere C-terminale Fragment (CTF2). Gleichzeitig war in den Staurosporin behandelten Proben kein Signal für das HA getaggte Protein mehr nachweisbar (Abb. 43). Die Behandlung mit Staurosporin führte zu einer Spaltung des C-Terminus von K_v7.1 und zu einem Abbau, des bei der Proteolyse entstehenden N-terminalen Teil des Proteins.

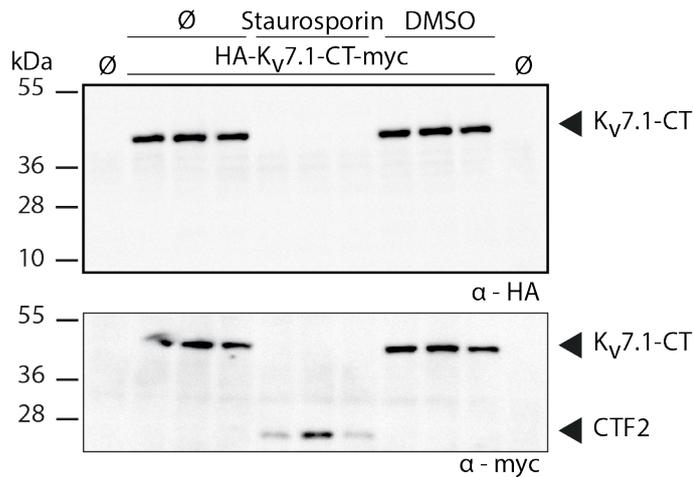


Abb. 43 Fragmentierung des K_v7.1-C-Terminus. HeLa Zellen wurden transient mit dem HA-K_v7.1-CT-myc Konstrukt transfiziert. Die Induktion der Apoptose erfolgte mittels Staurosporin 1 μ M für 8 h. Als Kontrolle wurden DMSO behandelte, unbehandelte sowie untransfizierte Zellen verwendet. Der Nachweis des Proteins erfolgte über das N-terminale HA-Tag sowie das C-terminale myc-Tag mit den entsprechenden Antikörpern.

4.1.25 Nukleäre Lokalisation des C-terminalen Fragments (CTF2) und dessen Funktion als Transkriptionsfaktor

Da die Expression des C-Terminus und die Behandlung mit Leptomycin B zu einer Akkumulation eines C-terminalen Fragments im Zellkern führte, wurde im nächsten Schritt die subzelluläre Lokalisation des CTF2 untersucht. Hierfür wurden Cos7 Zellen transient mit dem CTF2 Konstrukt transfiziert und anschließend mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation analysiert. Die Auswertung ergab eine ausgeprägte nukleäre Akkumulation des CTF2 im Zellkern. Eine cytosolische Lokalisation konnte kaum beobachtet werden. Anhand dieser Experimente wurde gezeigt, dass CTF2 bereits ohne die Behandlung mit Leptomycin im Zellkern akkumuliert. Dies könnte auf eine Funktion des CTF2 im Zellkern als Transkriptionsfaktor hindeuten. Für das CTF1 konnte dies nur nach Leptomycin B Gebrauch gezeigt werden.

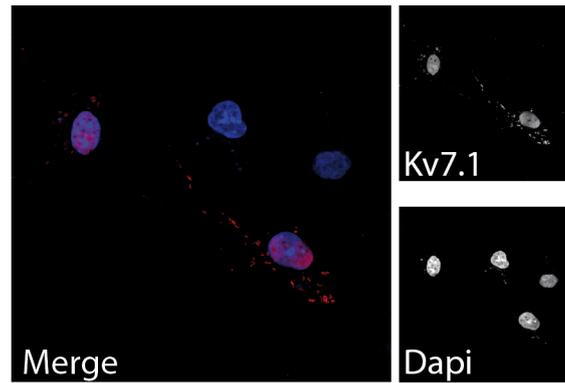


Abb. 44 Lokalisation des CTF2 innerhalb der Zelle. Cos7 Zellen wurden transient mit dem CTF2 Konstrukt transfiziert. Die Detektion erfolgte über das am C-Terminus fusionierte *myc-Tag*. Dapi wurde für die Färbung der DNA verwendet.

4.1.26 Genexpressionsanalyse

Um eine mögliche Funktion des CTF2 als Transkriptionsfaktor zu überprüfen, wurde ein RNA-*Microarray* durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine differenzielle Analyse der Genexpression. Hierfür wurden HEK293T Zellen stabil mit Kv7.1-CTF2 cDNA transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, welche mit dem N-terminalen Bereich von Kv7.1 stabil transfiziert wurden. Anschließend wurde die RNA aus beiden Ansätzen isoliert und für die Expressionsanalyse verwendet. Die Auswertung der Genexpressionsanalyse ist in (Abb. 45) dargestellt. Um einen Überblick über die Funktion der Gene zu erhalten, wurden diese bioinformatisch analysiert und dabei in Gruppen zusammengefasst.

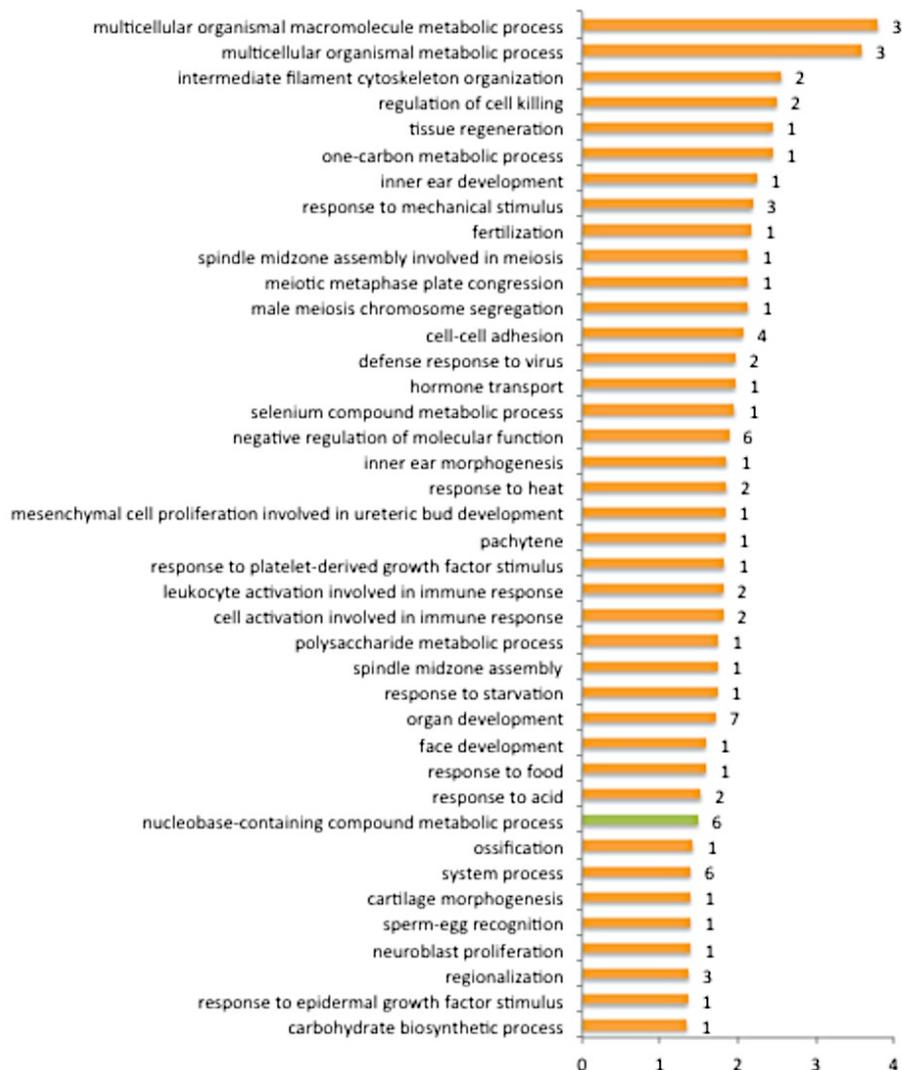


Abb. 45 Auswertung der Genexpressionsanalyse. Die in der Studie gefunden Gene wurden nach Abgleich mit einer Datenbank verschiedenen Funktionen zugeordnet. In orange sind die biologischen Funktionen dargestellt, bei denen Gene heraufreguliert waren. In grün sind die biologischen Funktionen dargestellt, in denen Gene herunterreguliert waren. Die Zahl hinter den Balken gibt die Anzahl der Gene wieder, in denen eine Veränderung in der Expression beobachtet wurde.

Hierbei zeigt sich, dass das C-terminale Fragment (CTF2) die Transkription einer Vielzahl von Genen beeinflusst. Die Auswertung zeigte außerdem, dass ein sehr breites Spektrum an biologischen Prozessen durch die Überexpression des CTF2 beeinflusst wurde. Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass das CTF2 innerhalb des Zellkerns lokalisiert ist und dort an der Regulation von Genen beteiligt ist. Ob das CTF2 dabei selbst als Transkriptionsfaktor agiert oder durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflusst konnte nicht geklärt werden. Eine ausführliche Liste mit allen untersuchten Genen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 12 und Tabelle 13).

Identifizierung neuer Interaktionspartner

Neben der Aufklärung der Proteolyse von K_v7.1 und der Identifikation der verantwortlichen Protease, war die Identifizierung neuer Interaktionspartner ein weitere Teil dieser Arbeit. Hierdurch sollte die Funktion von K_v7.1 und das Zusammenspiel mit anderen Proteinen in der Zelle näher untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Interaktionsscreens durchgeführt, welcher auf der Interaktion von Proteinen innerhalb von Hefezellen *Yeast Two-Hybrid System* beruht.

4.1.27 Yeast-Two Hybrid Screen

Für die Identifizierung neuer Interaktionspartner, wurden zwei verschiedene cDNA Bibliotheken verwendet. Da K_v7.1 unter anderem eine wichtige Funktion im Herzen besitzt, wurde mit einer N-terminal und C-terminal getaggten cDNA Bibliothek aus dem adulten Herzen der Maus gearbeitet. Es wurden 75 putativ positive Interaktionen mit der C-terminal getaggten Bibliothek gefunden, sowie 150 putativ positive für die N-terminal getaggte. Diese 225 putativ positiven Interaktionen wurden daraufhin auf falsch positive sowie doppelte Interaktionen getestet. Nach abgeschlossener Validierung der Treffer verblieben insgesamt 43 putative Interaktionspartner. Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde mit weiteren Untersuchungen der Interaktion von K_v7.1 und SMAC/Diablo begonnen. Hierbei wurde Diablo aufgrund seiner Funktion innerhalb der Apoptose ausgewählt.

4.1.27.1 Zelluläre Lokalisation von Diablo und K_v7.1

Um die in der Hefe identifizierte Interaktion von Diablo und K_v7.1 zu validieren, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde K_v7.1 zusammen mit Diablo in Cos7 Zellen transfiziert und die Lokalisation analysiert. Hierbei zeigte K_v7.1 eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zelle. Zellen mit einer Koexpression von Diablo und K_v7.1 zeigen nur eine geringe Kolokalisation beider Proteine (Abb. 46 A).

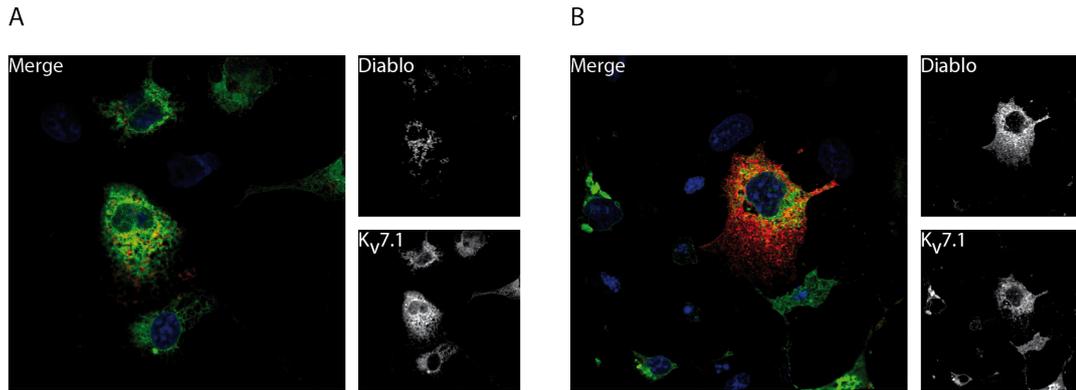


Abb. 46 Zelluläre Lokalisation von Diablo und Kv7.1. A: Cos7 Zellen wurden transient mit Diablo-HA und Kv7.1-myc transfiziert. Die Detektion erfolgte mittels α -HA sowie α -myc Antikörpers. DAPI wurde für die Färbung der DNA verwendet. B: Cos7 Zellen wurden transient mit Diablo-HA und Kv7.1-myc transfiziert und für 2,5 h mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Die Detektion erfolgte mittels α -HA sowie α -myc Antikörpers. DAPI wurde für die Färbung der DNA verwendet.

Die Staurosporin Behandlung und die damit einhergehende Induktion der Apoptose führte zu einem deutlichem Anstieg des Fluoreszenzsignals in den mit Diablo und Kv7.1 transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Beide Proteine waren gleichmäßig in der Zelle verteilt (Abb. 46 B). Eine Kolo-kalisation konnte auch hier nur in geringem Ausmaß beobachtet werden.

4.1.27.2 Verifizierung der Interaktionsstellen

Für den Transport in die mitochondriale Membran besitzt Diablo ein Signalpeptid am N-Terminus des Proteins. Nach erfolgreicher Integration in die Membran wird dieses Signalpeptid abgespalten und somit die mature Form des Proteins generiert (Du *et al.* 2000; Roberts *et al.* 2001). Für weitere Interaktionsstudien wurde eine Mutante von Diablo erzeugt, welche der maturen Form von Diablo entspricht (Diablo Δ NT). Die Koexpression von Diablo und Diablo Δ NT zusammen mit Kv7.1 und die anschließende Koimmunopräzipitation zeigte eine starke Interaktion von Diablo mit Kv7.1. Eine Interaktion der maturen Form ohne den N-Terminus konnte nicht gezeigt werden (Abb. 47). Dies deutete darauf hin, dass eine Interaktion von Kv7.1 und Diablo über den N-Terminus von Diablo vermittelt wird.

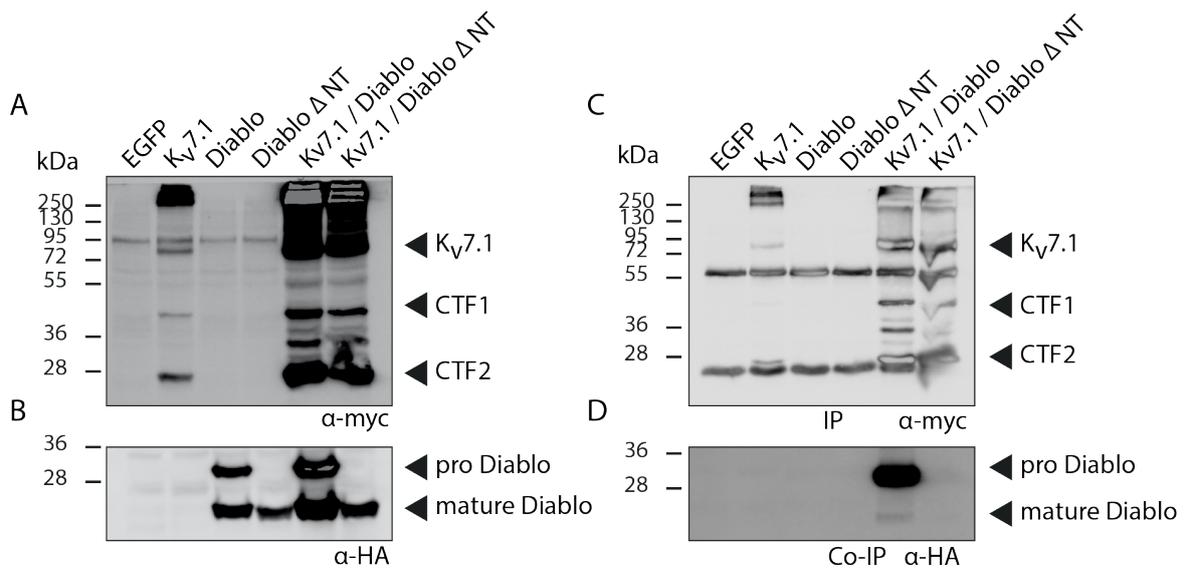


Abb. 47 Interaktion von Diablo und DiabloΔNT mit Kv7.1. Cos7 Zellen wurden transient mit den oben beschriebenen Konstrukten transfiziert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. A-B: Lysatkontrolle, C: myc Präzipitat (IP) und D: Kopräzipitat (Co-IP). Die Detektion erfolgte mittels myc- und HA-Antikörpers.

Die vorangegangenen Experimente zeigten eine Interaktion von Kv7.1 mit der pro-Form von Diablo. Abschließend sollte geklärt werden, welcher Bereich von Kv7.1 für die Interaktion verantwortlich ist. Dazu wurden verschiedene Trunktionsmutanten des Proteins zusammen mit Diablo transfiziert und anschließend mittels Koimmunopräzipitation analysiert wo eine Interaktion stattfand. Die Auswertung der Western Blots zeigte eine Interaktion der Proform von Diablo mit der unprozessierten Form von Kv7.1, dem C-Terminus von Kv7.1 sowie dem kleineren C-terminalen Fragment CTF2 (Abb. 48). Die Interaktionsstudien belegten, dass der N-Terminus von Diablo sowie der distale C-Terminus von Kv7.1 für die Interaktion beider Proteine verantwortlich sind. Eine mögliche Funktion dieser Interaktion könnte der Einfluss des CTF2 auf die Maturierung von Diablo sein.

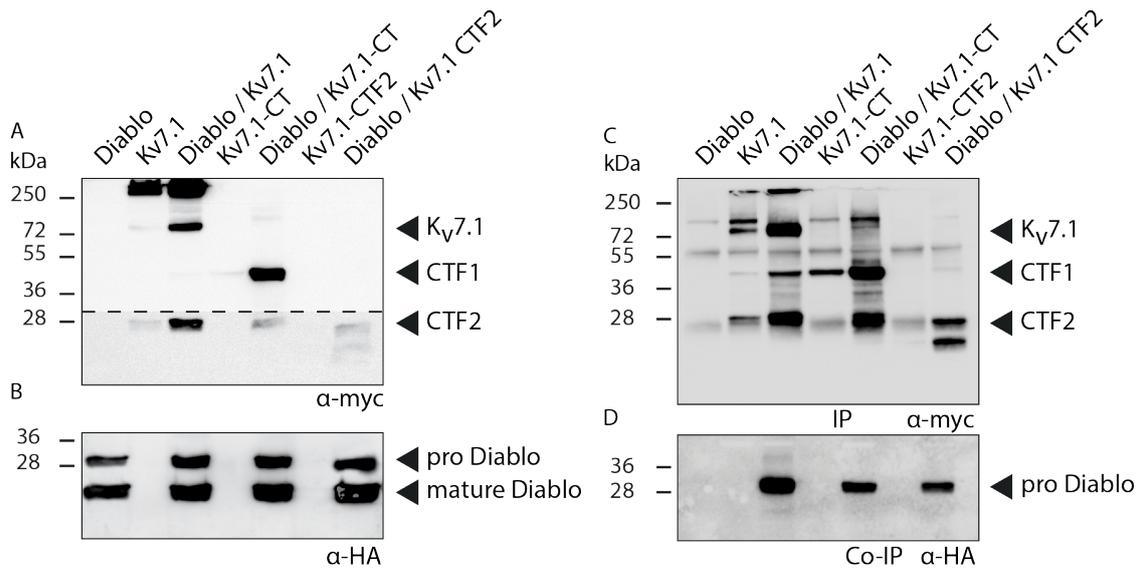


Abb. 48 Interaktion der Kv7.1 Trunktionsmutanten mit Diablo. Cos7 Zellen wurden transient mit den oben beschriebenen Konstrukten transfiziert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. A-B: Lysatkontrolle, C: myc Präzipitat (IP) und D: Kopräzipitat (Co-IP). Die Detektion erfolgte mittels myc- und HA-Antikörpers.

4.1.27.3 Einfluss von Kv7.1 auf die Maturierung von Diablo

Für die Analyse der Maturierung von Diablo wurde Kv7.1 sowie Kv7.1-D459A in ansteigender Konzentration zusammen mit Diablo transfiziert und anschließend im Western Blot das Verhältnis der Proform zur murenen Form von Diablo ausgewertet (Abb. 49 und Abb. 50). Hierbei führte die gleichzeitige Transfektion von Kv7.1 mit Diablo zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Proform zur murenen Form hin zur Proform. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich auch bei der Transfektion mit Kv7.1-D459A allerdings erst bei einer höheren Konzentration.

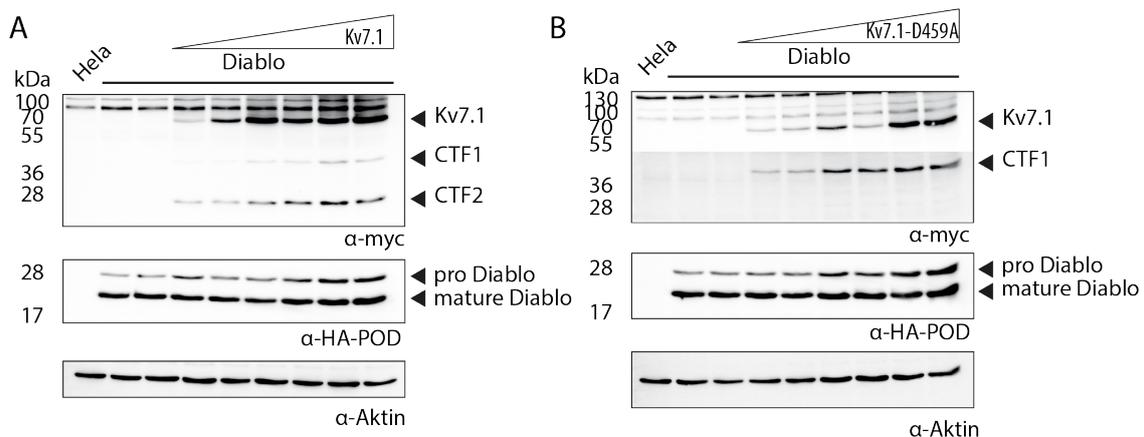


Abb. 49 Maturierung von Diablo. HeLa Zellen wurden transient mit den oben beschriebenen Konstrukten transfiziert A: (Kv7.1 2 µg - 6 µg) B: (Kv7.1-D459A 2 µg - 6 µg) und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blots analysiert. Die Detektion erfolgte mittels myc Antikörpers (Kv7.1) sowie HA-Antikörpers (Diablo). Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Die Antikörperkontrolle erfolgte durch untransfizierte Zellen.

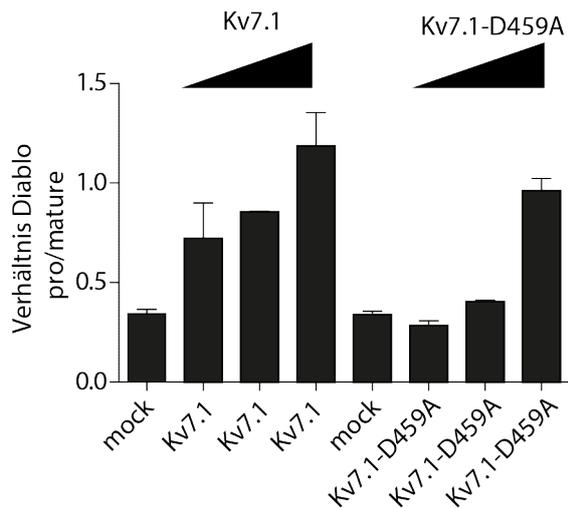


Abb. 50 Densitometrische Auswertung der Diablo Maturierung. Die Intensität der Signale des Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet und das Verhältnis von Proform / maturaer Form dargestellt.

Die Interaktion von Diablo konnte sowohl in der Hefe als auch in Cos7 Zellen gezeigt werden. Weiterhin war es möglich, den Bereich der Interaktion auf den distalen C-Terminus innerhalb von $K_v7.1$ und den N-terminalen Bereich innerhalb von Diablo einzugrenzen. Die Überexpression beider Proteine zeigte des weiteren einen Einfluss auf die Maturierung von Diablo. Bei einer Transfektion von $K_v7.1$ und Diablo im Verhältnis $2 \mu\text{g} (K_v7.1) : 2 \mu\text{g} (\text{Diablo})$ war dieser Effekt bereits sichtbar (Abb. 50) und am stärksten ausgeprägt bei einem cDNA Verhältnis von $6 \mu\text{g} (K_v7.1) : 2 \mu\text{g} (\text{Diablo})$. Bei der Transfektion von $K_v7.1\text{-D459A}$ zusammen mit Diablo zeigte sich ein vergleichbarer Effekt erst ab einem Verhältnis beider Konstrukte von $6 \mu\text{g} (K_v7.1\text{-D459A}) : 2 \mu\text{g} (\text{Diablo})$.

5 Diskussion

Ionenkanäle spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Zellhomöostase und Entstehung und Aufrechterhaltung des Membranpotentials, wobei ihre Funktion wesentlich durch akzessorische Proteine beeinflusst wird. Hierbei spielt auch die Proteolyse dieser akzessorischen Proteine eine große Rolle, da sie die Interaktion dieser Proteine reguliert. Seit geraumer Zeit wird auch die proteolytische Spaltung von Ionenkanälen selbst erforscht und als weiterer, regulatorischer Prozess von Ionenkanälen untersucht.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der regulierten Proteolyse von $K_v7.1$ und die Erforschung der physiologischen Funktion dieses Prozesses.

Charakterisierung der Proteolyse von $K_v7.1$

Um die Proteolyse von $K_v7.1$ zu untersuchen, wurde mit der Charakterisierung der einzelnen Fragmente in der Überexpression begonnen. Dabei zeigte sich, dass die Fragmentierung sowohl in Fibroblasten (Cos7) als auch in Epithelzellen (HeLa, HEK293T) erfolgt. Aufgrund der Größe der Fragmente und der Verwendung eines Antikörpers gegen ein C-terminal fusioniertes *Tag*, wurde angenommen, dass die Peptide aus dem C-Terminus von $K_v7.1$ generiert wurden.

Im Herzen sind Ionenkanäle verantwortlich für das kardiale Aktionspotential (Tamargo *et al.* 2004). Die Depolarisation wird durch einen Natriumauswärtsstrom induziert. Nach einer teilweisen Repolarisation folgt die Terminierung des Aktionspotentials, hier spielt vor allem der Kanalkomplex aus $K_v7.1$ und KCNE1 eine entscheidende Rolle. Die Terminierung des kardialen Aktionspotentials erfolgt dabei durch den langsam auswärts-gleichrichtenden Kaliumstrom (I_{KS}), welcher durch $K_v7.1$ und der β -Untereinheit (KCNE1) gebildet wird (Sanguinetti *et al.* 1990; Barhanin *et al.* 1996). Die Analyse von neonatalen Ratten Kardiomyozyten (NRVCM) zeigte ein mit den Überexpressionsexperimenten vergleichbares Bandenmuster für $K_v7.1$. Begründet durch die unterschiedliche Gewebeexpression von $K_v7.1$ wurden verschiedene Organe der Maus auf eine Fragmentierung dieses Proteins hin untersucht. Neben dem Herzen wird der Kanal auch in der Niere, dem Innenohr, dem Pankreas und dem sekretorischen Epithelgewebe des Gastrointestinaltrakts exprimiert (Chouabe *et al.* 1997; Schroeder *et al.* 2000). In der Schilddrüse ist eine Fehlfunktion des Kanalkomplexes $K_v7.1$ /KCNE2 verantwortlich für eine Form der Hypothyreose (Purtell *et al.* 2012). Die Analyse von $K_v7.1$ in den Organlysaten ergab im Herzen und in der Niere neben der 72 kDa Bande auch ein kleineres Fragment von ca. 28 kDa (CTF2). In den Lysaten aus der Leber und dem Pankreas wurde neben der 72 kDa Bande, die dem unprozessierten $K_v7.1$ Protein entspricht, auch eine Bande im Western Blot bei ca. 45 kDa detektiert.

Neben den oben beschriebenen Zelllinien wurde auch mit einer murinen Kardiomyozyten Zelllinie (HL-1) gearbeitet. HL-1 Zellen eigneten sich für die weiteren Experimente, da sie in Kultur gehalten werden konnten und alle Charakteristika von adulten Kardiomyozyten aufwiesen (Claycomb *et al.* 1998). In den analysierten HL-1 Zellen zeigte sich, dass diese Zellen ebenfalls K_v7.1 endogen exprimieren und eine Fragmentierung von K_v7.1 nach der Behandlung mit Staurosporin, vergleichbar mit den Untersuchungen der murinen Herzen, zu beobachten war. Dies lässt auf eine Fragmentierung von K_v7.1 auch unter endogenen Bedingungen und in verschiedenen Spezies schließen. Die Expression von anderen K_v7 Kanälen (K_v7.2, K_v7.5) zeigte keine entsprechende Fragmentierung des Proteins (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auf eine Sonderstellung des K_v7.1 C-Terminus unter den K_v7 Kanälen schließen, was unter anderem auch dadurch deutlich wird, dass K_v7.1 nicht mit anderen K_v7 Untereinheiten assemblieren kann (Bal *et al.* 2008).

Eingrenzung der Schnittstelle im C-Terminus von K_v7.1

Aufgrund des Molekulargewichtes der beiden Fragmente von K_v7.1 im SDS-Gel wurden verschiedene Trunktationsmutanten von K_v7.1 erstellt. Der Vergleich, der durch Proteolyse generierten Fragmente mit den Trunktationsmutanten, führte zu dem Schluss, dass die erste Schnittstelle in der Nähe des proximalen C-Terminus von K_v7.1 oder auch am Ende der sechsten Transmembrandomäne liegen müsste.

Die zweite, für die Generierung des kleineren CTF's (CTF2 - C-terminales Fragment 2), verantwortliche Schnittstelle konnte auf einen Bereich zwischen Helix A und Helix B eingegrenzt werden. Um die genaue Position, an welcher die Proteolyse stattfindet zu analysieren, wurden weitere Trunktationen der Aminosäuresequenz zwischen Helix A und Helix B vorgenommen. Dank dieser Experimente, konnte die Schnittstelle auf eine Sequenz von sechs Aminosäuren eingegrenzt werden. Diese sechs Aminosäuren (SVDGYD) wurden daraufhin jeweils einzeln gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Diese, als *Alaninscan* bezeichnete, Methode wird oft verwendet, um funktionell wichtige Aminosäuren in einem Peptid zu identifizieren (Morrison *et al.* 2001). Der Austausch durch Alanin hat den Vorteil, dass hier eine kleine ungeladene Aminosäure mit einer relativ inerten Methylseitenkette eingefügt wird. Eine Substitution durch die kleinste Aminosäure Glycin wäre ebenfalls möglich, allerdings könnte dies zu einem Verlust der Sekundärstruktur führen, da die Peptidbindung zu Glycin, aufgrund seiner Konformation, sehr flexibel ist. Der Austausch gegen geladene Aminosäuren oder solche mit großen Seitenketten hat ebenfalls oft den Verlust der Sekundärstruktur von Proteinen zur Folge (Richards *et al.* 1988).

Der durchgeführte *Alaninscan* zeigte die besondere Bedeutung der Asparaginsäure an Position 459 für die Generierung des CTF2. Die Substitution dieser Aminosäure gegen Alanin führte zum Verlust des kleineren C-terminalen Fragmentes. Anhand dieser Experimente konnte

gezeigt werden, dass der proteolytische Schnitt innerhalb der SVDGYD Sequenz stattfindet und dass die Asparaginsäure 459 hierfür entscheidend ist.

Die Schnittstelle, welche für die Entstehung des CTF1 verantwortlich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher charakterisiert. Die Mutationen innerhalb der zweiten Schnittstelle hatten keine Auswirkung auf die Entstehung des ersten C-terminalen Fragmentes, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die Generierung der beiden Fragmente unabhängig voneinander erfolgt. Des Weiteren wurde das CTF1 fast ausschließlich in der Überexpression beobachtet. Eine Erklärung hierfür könnte die fehlende physiologische Bedeutung dieses Fragments (CTF1) sein oder auch eine hohe Instabilität und ein daraus resultierender schneller Abbau *in vivo*.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Fragmentierung von K_v7.1 nicht aufgrund seiner Überexpression stattfindet sondern auch unter physiologischen Bedingungen, wurde mit der Identifizierung der für die Proteolyse von K_v7.1 verantwortlichen Proteasen begonnen.

Eine Cysteinprotease ist verantwortlich für die Spaltung von K_v7.1

Proteasen werden nach ihrer Aktivität und der funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum in verschiedene Klassen unterteilt: Aspartat-, Serin-, Cystein- und Metallo-, Threonin- und Glutaminsäure Proteasen (Studholme *et al.* 2003; Rawlings *et al.* 2014). Eine Möglichkeit, die für die Spaltung der Sequenz SVDGYD verantwortliche Protease zu identifizieren, war ein Abgleich mit bereits bekannten Schnittstellen von Proteasen. Dazu wurde die MEROPS Datenbank genutzt. Hier konnte gezielt nach proteolytisch aktiven Enzymen gesucht werden, welche ein Aspartat innerhalb der Schnittstelle benötigen oder bevorzugen. Die besondere Bedeutung der Asparaginsäure an Position 459 in der Aminosäuresequenz von K_v7.1 wurde durch den durchgeführten *Alaninscan* deutlich. Die Suche nach Proteasen, welche immer ein Aspartat innerhalb der Schnittstelle benötigen, grenzte die Anzahl auf einen bestimmten Kreis von Proteasen ein. Hierzu zählten, die zur Gruppe der Cysteinproteasen gehörenden Caspasen. Ihre englische Bezeichnung, *cysteinyI-aspartate specific protease*, beruht auf ihrem Hydrolysemechanismus und der bevorzugten Aminosäure innerhalb der Schnittstelle ihrer Substrate (Alnemri *et al.* 1996). Im aktiven Zentrum dieser Enzyme befinden sich ein Cystein und ein Histidin, welche für die Hydrolyse der Peptidbindung von besonderer Bedeutung sind (Wilson *et al.* 1994).

Neben der Verwendung von Datenbanken ist der Einsatz von Inhibitoren eine weitere Möglichkeit bestimmte Proteasen zu identifizieren. Es existieren eine Vielzahl solcher Inhibitoren, welche entweder gezielt einzelne oder gleich eine ganze Gruppe von Proteasen hemmen. Abgesehen davon existieren noch weitere Mechanismen der Inhibition z.B. kann die Umsetzung eines Substrats auch durch die Bindung eines Inhibitors an das Substrat verhindert werden.

Um die Spaltung von $K_v7.1$ durch die Gruppe der Caspasen zu verifizieren, war der Einsatz solcher Inhibitoren die Methode der Wahl. Der Inhibitor Z-VAD-FMK ist zellpermeabel und in der Lage, die Aktivität des gesamten Spektrums an Caspasen zu hemmen (Caserta *et al.* 2003). Ein weiteres Breitspektrum Caspase Inhibitor ist Q-VD-Oph (Caserta *et al.* 2003). Die Struktur beider Inhibitoren ist in Abb. 51 dargestellt. In beiden Fällen handelt es sich um Peptidinhibitoren, die aufgrund ihrer Struktur in das aktive Zentrum der Caspasen binden, jedoch von diesen nicht umgesetzt werden können und damit zu einer Inaktivierung führen. Genau wie Z-VAD-FMK führt Q-VD-Oph zu einer irreversiblen Hemmung der Caspasen, jedoch bereits bei viel geringeren Konzentrationen.

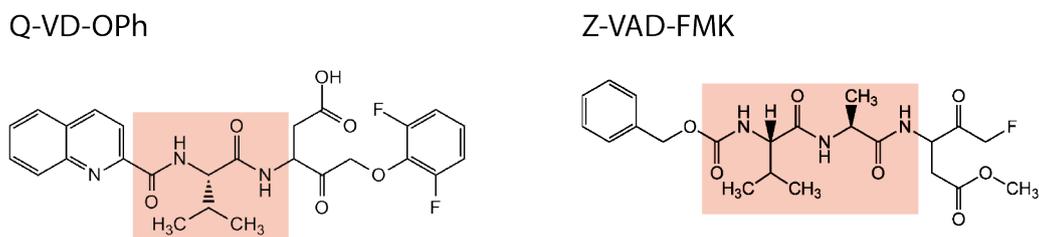


Abb. 51 Struktur der Breitspektrum Caspase Inhibitoren Q-VD-Oph und Z-VAD-FMK. Beide Inhibitoren zählen zu den Peptidogenen. Rot unterlegt sind die Aminosäuren an denen die Caspasen ihr Substrat erkennen.

Durch den Einsatz möglichst geringer Konzentrationen wird gewährleistet, dass neben den zu untersuchenden keine weiteren Proteasen inhibiert werden. Solche als *off-target* bezeichnete Effekte treten auf, wenn Inhibitoren in zu hohen Konzentrationen eingesetzt werden und somit z.B. unspezifisch innerhalb aktiver Zentren anderer Proteasen binden und diese inhibieren (Turk 2006). Da der Einsatz beider Inhibitoren zu einer verringerten Generierung bzw. vollständigem Verlust des CTF2 führte, unterstreicht dies die Beteiligung der Caspasen an der Proteolyse von $K_v7.1$.

Caspase vermittelte Spaltung von $K_v7.1$

In der MEROPS Datenbank sind aktuell 13 humane Caspasen gelistet. Die Verwendung der oben beschriebenen Inhibitoren lässt keine Rückschlüsse auf eine bestimmte Caspase zu. In dieser Arbeit wurden deswegen verschiedene Ansätze unternommen, um die für die Spaltung von $K_v7.1$ verantwortliche Protease genauer zu identifizieren.

Eine Möglichkeit bestand darin, gezielt einzelne Caspasen mittels siRNA (engl. *small interfering RNA*) an ihrer Expression zu hindern. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch Abschaltung des gewünschten Gens Rückschlüsse auf die Funktion des codierenden Proteins gezogen werden können, ohne dabei andere Proteine zu beeinflussen.

Ein anderer Ansatz war die gezielte Überexpression bestimmter Caspasen. Hierdurch war es möglich den Effekt einer Caspase-3 Überexpression auf die Spaltung von Kv7.1 direkt zu untersuchen. Beide Ansätze, sowohl *knock down* der Gene als auch Überexpression von Caspase-3, zeigten einen deutlichen Einfluss von Caspase-3 auf die Generierung des CTF2 von Kv7.1. Neben dem Einsatz von Inhibitoren konnten auch durch gezielte Aktivierung der Apoptose Rückschlüsse auf die Caspase vermittelte Proteolyse von Kv7.1 gezogen werden. Apoptose kann durch verschiedene Stimuli induziert werden. Ein weit verbreiteter Aktivator der Apoptose ist Staurosporin. Die genauen molekularen Mechanismen sind noch nicht bis ins Detail verstanden, allerdings ist bekannt, dass Staurosporin die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) hemmt (Gescher 2000). Ebenfalls ist eine direkte Aktivierung von Caspase-3 beschrieben (Chae *et al.* 2000). Ein ähnlicher Effekt wurde für den Proteasominhibitor MG-132 beschrieben. In geringen Konzentrationen wird er eingesetzt, um irreversibel das Proteasom zu inhibieren. In höheren Konzentrationen führt er allerdings zu einer Aktivierung von C-Jun N-terminalen Kinasen, was anschließend zu einer Aktivierung von Caspase-3 führt. Dieser Prozess ist in Glioblastomzellen gut untersucht (Zanotto-Filho *et al.* 2012).

Sowohl der Einsatz von Staurosporin als auch von MG-132 führte zu einer gesteigerten Proteolyse von Kv7.1 und damit zu einer vermehrten Generierung des CTF2 von Kv7.1. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Proteolyse von Kv7.1 durch Induktion der Apoptose verstärkt werden kann. Weiterhin wurde der Einfluss von Caspase-3 auf die Proteolyse von Kv7.1 gezeigt. Einen Effekt auf die Generierung des CTF1 konnte weder durch Aktivierung der Apoptose, noch durch die verwendeten Inhibitoren beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass die Generierung des CTF1 und CTF2 von zwei verschiedenen Proteasen erfolgt und Caspasen nicht für die Entstehung des CTF1 verantwortlich sind.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch eine ER-Retentionsmutante von Kv7.1 prozessiert wurde, was darauf hin deutete, dass die Proteolyse von Kv7.1 bereits im endoplasmatischen Retikulum erfolgt. Eine Überexpression von Proteinen kann verschiedene Stresssignale in der Zelle auslösen, darunter auch die *Unfolded-Protein-Response* im endoplasmatischen Retikulum (Kaufman 1999). Aufgrund dieser Stresssituation werden unter anderem Caspase-3 und -12 aktiviert, wodurch fehlgefaltete Proteine schnell abgebaut werden können (Nakagawa *et al.* 2000; Ghribi *et al.* 2002; Morishima *et al.* 2002; Hitomi *et al.* 2004). Eine frühe Proteolyse von Kv7.1 im endoplasmatischen Retikulum durch Caspase-3 oder -12 könnte durch die Überexpression von Kv7.1 und die daraus resultierende Stresssituation hervorgerufen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Caspasen an der Prozessierung von Kv7.1 beteiligt sind. Ein Grund ist die große Ähnlichkeit innerhalb der Schnittstellen der Caspase-Substrate (McStay *et al.* 2008). Betrachtet man die Schnittstellen der verschiedenen Caspase-Substrate und die beteiligten Caspasen genauer, so stellt man fest, dass es eine hohe Übereinstimmung der Sequenzen untereinander gibt. In Abb. 52 sind verschiedene

Schnittstellen von Caspasen gegenübergestellt. Man erkennt deutlich das Aspartat an Position 4 innerhalb Aminosäuresequenz in den Schnittstellen der Caspase Substrate. Allerdings wird auch deutlich, dass bis auf Glycin an Position 5 der Caspase-2, -3 und -7 Substrate nur wenige Aminosäuren konserviert sind. Hierdurch wird klar, dass mehr als eine Caspase an der Proteolyse eines Proteins beteiligt sein kann. Welche Caspase letztendlich für die Spaltung eines Proteins *in vivo* verantwortlich ist, hängt von der analysierten Zelllinie ab, von der Kinetik der jeweiligen Caspasen und maßgeblich von der Proteinstruktur der Substrate (Thornberry *et al.* 1998; Stennicke *et al.* 2000; Shimbo *et al.* 2012).

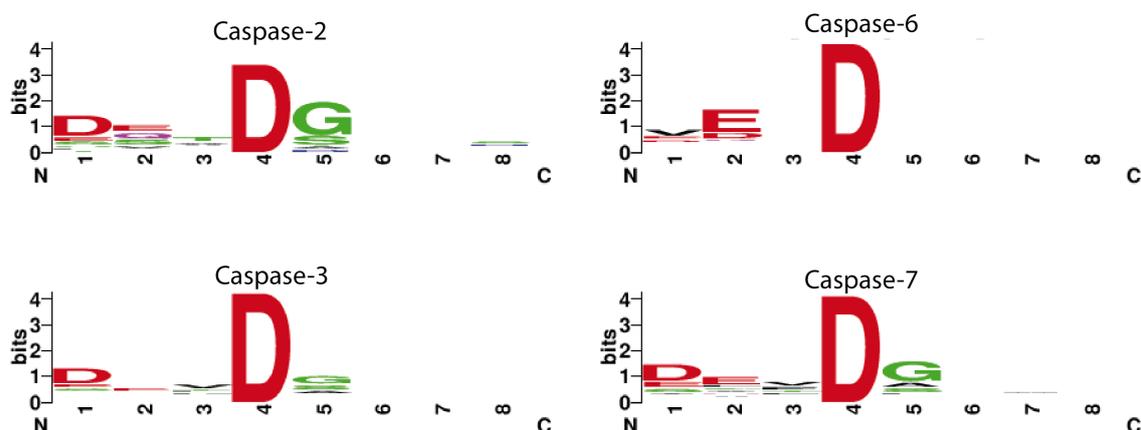


Abb. 52 Dargestellt ist die Sequenz der Schnittstellen verschiedener Caspase. An Position befindet sich, dass für die Spaltung wichtige Aspartat. Die Höhe der dargestellten Aminosäuren steht in direktem Zusammenhang mit der Häufigkeit dieser Aminosäure innerhalb der Schnittstelle der Caspase. (Quelle: Merops Datenbank)

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl an Caspase *knock out* Mäusen generiert (Degterev *et al.* 2003). Eine Analyse dieser *knock out* Tiere bzw. der daraus abgeleiteten Zelllinien könnten neue Erkenntnisse über die Proteolyse von Kv7.1 *in vivo* liefern.

Wie bereits beschrieben, wurde die Proteolyse von Kv7.1 in *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* nachgewiesen. Ein Vergleich der Proteinsequenz zeigte hierbei eine hohe Übereinstimmung der Sequenzen innerhalb der Schnittstelle (siehe Abb. 53).

Mensch	APRSHTLLSPSPKPKKSVMVKKKKFKLDKDNQVTPGKMLTVPHITCDPPEERRLDHFSV D GYDSSVRKSPTLLEVSMPH
Maus	PARSHTLLSPSPKPKKSVMVKKKKFKLDKDNQVTPGKMFNVPHITYDPPEDRRPDHFS D GYDSSVRKSPTLLEVSTPH
Ratte	PARSHTLLSPSPKPKKSVMVKKKKFKLDKDNGLSPGKIFNVPHITCDPPEDRRDPHFS D GYDSSVRKSPTLLEVSTPH

Abb. 53 Kv7.1 Sequenzvergleich von Kv7.1 in Mensch, Maus und Ratte. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz zwischen Helix A und Helix B von Kv7.1. Das Aspartat an Position 459 ist in rot dargestellt.

Um einen Überblick zu erhalten wie hoch konserviert, dass für die Proteolyse wichtige Aspartat an Position 459 ist, wurde ein Sequenzvergleich mit weiteren Spezies durchgeführt.

Hierfür wurde die *ConSurf Server* Datenbank verwendet. Als Referenz wurde die humane K_v7.1 Sequenz verwendet. Die Tabelle 14 (siehe Anhang) gibt einen Überblick über alle gefundenen Übereinstimmungen mit der Sequenz von K_v7.1 im Bereich des Aspartats 459. Die hohe Homologie und die Vielzahl der gefundenen Übereinstimmungen unterstreicht die Bedeutung dieses Motivs für die Funktion von K_v7.1 nicht nur in den drei oben genannten Spezies, sondern in vielen weiteren mehr.

Einfluss von K_v7.1 auf die Apoptose

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird die Proteolyse von K_v7.1 durch Caspasen vermittelt. Es war daher naheliegend, eventuelle Effekte auf die Apoptose in Zusammenhang mit K_v7.1 näher zu untersuchen. Ionenkanäle spielen in verschiedenen Prozessen des kontrollierten Zelltodes eine wichtige Rolle (Bortner *et al.* 1997; Yu *et al.* 1997; Yu *et al.* 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit Caspase-3 und K_v7.1 transfiziert wurden, verstärkt Merkmale der Apoptose zeigten. Als Marker für Apoptose wurde hierbei die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran mittels Annexin V nachgewiesen (Schutte *et al.* 1998; van Engeland *et al.* 1998). Weiterhin diente die Spaltung von Caspase-3 als Hinweis auf apoptotische Prozesse. Dieser Effekt war unabhängig von der Generierung des CTF2 und ebenfalls unabhängig von dem durch K_v7.1 vermittelten Kaliumstrom. Dies konnte durch die Mutante K_v7.1-D459A (keine Generierung des CTF2) sowie K_v7.1-D317A (dominant negative Mutation, führt zu einem inaktiven Kanal) gezeigt werden. Beide Mutationen führten in der Überexpression zusammen mit Caspase-3 zu einer vermehrten Bildung von aktiver Caspase-3. Die Aktivierung von Caspase-3 wird als eindeutiger Hinweis auf Apoptose angesehen (Nicholson *et al.* 1995; Jacobsen *et al.* 1996; Jessel *et al.* 2002). Erstaunlich ist, dass die Expression von Caspase-3 allein nicht ausreichte um Apoptose zu induzieren. Dies könnte daran liegen, dass für diese Caspase keine oder eine nur sehr geringe autokatalytische Aktivierung beschrieben ist und eine Aktivierung durch andere Caspasen z.B. Caspase-8 erfolgt (Roy *et al.* 2001; Porter 2006).

Eine Erklärung für die verstärkte Apoptose in mit Caspase-3 und K_v7.1 transfizierten Zellen, könnte in der Interaktion von K_v7.1 und Caspase-3 liegen. Buckley *et al.* konnten zeigen, dass Peptide, welche die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) enthalten zu einer Aktivierung von Caspase-3 führten. Die Peptide binden hierbei innerhalb einer Sequenz von Caspase-3, welche unter physiologischen Bedingungen die Autokatalyse verhindert (Broxterman *et al.* 1999; Buckley *et al.* 1999; Kim *et al.* 2007; Matsuki *et al.* 2008). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für K_v7.1 und Caspase-3 möglich. Innerhalb des C-Terminus existieren zwar keine RGD Motive, allerdings gibt es Sequenzen, die einem solchen Motiv sehr ähnlich sind. Die Apoptose würde hierbei durch die Interaktion von Caspase-3 und K_v7.1 und

der daraus resultierenden Aktivierung von Caspase-3 induziert. Möglicherweise ist die Generierung des CTF1 für diese Interaktion erforderlich. Die Proteolyse von $K_v7.1$ erlaubt eine Interaktion des C-Terminus mit anderen Proteinen unabhängig von der Lokalisation von $K_v7.1$ an der Plasmamembran.

Eng verbunden mit der Apoptose und der Aktivierung von Caspasen ist die Entstehung von Krebs. Dabei ist das Stagnieren der Apoptose der Hauptgrund für die Entstehung und das Voranschreiten von Krebs (Cotter 2009; Hanahan *et al.* 2011). Hierbei sind verschiedene Prozesse beteiligt: darunter Kalzium induzierte Signalwege, die Regulation des pH-Wertes und die Regulation von Wachstumsfaktoren durch Kaliumkanäle (Kunzelmann 2005). In den vergangenen Jahren sind vermehrt Publikationen erschienen, welche die Rolle von $K_v7.1$ und der Entstehung von Krebs untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass in $K_v7.1$ defizienten Mäusen vermehrt Tumore im Gastrointestinaltrakt gefunden wurden (Than *et al.* 2013). Als Ursache wurde eine veränderte Interaktion von $K_v7.1$ und dem Chloridkanal CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) gefunden, was eine gestörte Cl^- Sekretion zur Folge hat. Im Widerspruch dazu wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass in kolorektalen Karzinomen und in verschiedenen Krebszelllinie $K_v7.1$ vermehrt exprimiert wird (Shimizu *et al.* 2013). Die genauen Zusammenhänge zwischen $K_v7.1$ und Entstehung von Krebs sind bislang unbekannt. Interessanterweise wurde in Patientinnen mit einem Endometrium-Karzinom eine somatische Mutation in $K_v7.1$ gefunden ($K_v7.1$ -D459E)(Cancer Genome Atlas Research *et al.* 2013). Untersuchungen dieser Mutante zeigten, dass, ähnlich wie bei der $K_v7.1$ -D459A, keine Proteolyse des C-Terminus stattfindet (Daten von Anne Strigli, Biochemisches Institut, CAU Kiel).

Der Einfluss der Proteolyse von $K_v7.1$ auf den Kaliumstrom

$K_v7.1$ Kanäle spielen zusammen mit der β -Untereinheit KCNE1 eine entscheidende Rolle, bei den für die Repolarisation verantwortlichen Kaliumströmen im Herzen. Vergleicht man die Kaliumströme von $K_v7.1$ und $K_v7.1$ -D459A stellt man fest, dass die Mutante einen um den Faktor 1.5 erhöhten Kaliumstrom zeigte. Die gleichzeitige Expression der β -Untereinheit verstärkte diesen Effekt noch weiter und führte zu einer Erhöhung um den Faktor 2.

Der C-Terminus von $K_v7.1$ ist besonders wichtig für die Assemblierung der vier α -Untereinheiten und die Interaktion mit den β -Untereinheiten (Haitin *et al.* 2008). Die Proteolyse innerhalb des C-Terminus könnte deshalb sowohl auf die Interaktion der einzelnen α - als auch β -Untereinheiten Auswirkungen haben. In Kooperation mit Dr. Tobias Huth (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Erlangen) wurde die Elektrophysiologie von verschiedenen $K_v7.1$ Mutanten mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Hierbei zeigte sich, dass mit $K_v7.1$ oder $K_v7.1$ -D459A transfizierte und anschließend mit Staurosporin behandelte Zellen geringe Unterschiede im Stromfluss

aufwiesen. Hierbei war die gemessene Stromstärke in den mit K_v7.1 und Staurosporin behandelten Zellen geringer als bei der K_v7.1-D459A Mutante. Diese Ergebnisse könnten auf eine Inaktivierung des Kanals aufgrund der Proteolyse hindeuten.

Mutationen im Gen für K_v7.1 können zum einen zu einer verminderten Funktion des Kanals führen (*Long-QT-Syndrom*) oder die Aktivität verstärken (*Short-QT-Syndrom*) (Priori *et al.* 2001; Hong *et al.* 2005; Brenyo *et al.* 2012; Zheng *et al.* 2012; Bostan *et al.* 2013). Patienten mit LQT-Syndrom zeigen eine Verlängerung in der Plateauphase des kardialen Aktionspotential aufgrund eines verminderten Kaliumionentransports mittels K_v7.1 (Delisle *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu zeigen Patienten mit einem SQT-Syndrom oder Vorhofflimmern eine schnellere Aktivierung des K_v7.1-Kanals und einen verstärkten Ionentransport (Chen *et al.* 2003; Bellocq *et al.* 2004), vergleichbar mit der K_v7.1-D459A Mutante. Aus diesem Grund sollten Patienten mit Vorhofflimmern oder *short-QT-Syndrom* auf die Prozessierung von K_v7.1 hin untersucht werden um dadurch Rückschlüsse auf die Regulation des Kanals zu erhalten.

Durch die Proteolyse von K_v7.1 könnte demnach eine Regulation des Kaliumstroms stattfinden. Zum Einen kann dies über den Transport der Kanäle zur Plasmamembran erfolgen und zum Anderen über die teilweise Inaktivierung der Kanäle. Der Transport des assemblierten Kanals zur Plasmamembran wird durch die Interaktion mit den β -Untereinheiten erhöht (Roura-Ferrer *et al.* 2010). Ein Fehlen des C-Terminus und eine damit verbundene Störung der Interaktion, hätte negativen Einfluss auf den Kaliumstrom an der Plasmamembran. Mutationen im C-Terminus von K_v7.1, die eine Proteolyse verhindern, könnten zu einer stärkeren Interaktion der α - als auch β -Untereinheiten führen und damit letztendlich zu einem erhöhten Kaliumstrom. Ein ähnlicher Effekt wäre für die Assemblierung des Kanals denkbar. Auch hier könnte die Proteolyse des C-Terminus zu einer verminderten Interaktion führen und dadurch zu einer teilweise Inaktivierung. Eine vor kurzem von Kimoto *et al.* entdeckte Mutation führt aufgrund eines Stopkodons zu einem verkürzten K_v7.1 Protein (Kimoto *et al.* 2013). Das Ende des Proteins befindet sich an Position 461 in der Aminosäuresequenz und damit nur zwei Aminosäuren entfernt vom Aspartat an Position 459. Die Analyse dieser Mutation zeigte eine gestörte Assemblierung des Kanals, einen verminderten Transport an die Plasmamembran sowie eine verminderte Funktion von K_v7.1 (Kimoto *et al.* 2013). Eng verbunden mit der Aufrechterhaltung der Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellularraum ist die Volumenregulation einer Zelle (Lang *et al.* 1998). Für die Zelllinie MCF-7 (humane Brustepithelzellen) wurde ein Zusammenhang von K_v7.1 und der Regulation des Zellvolumens beschrieben (vanTol *et al.* 2007). Sowohl die Expression einer dominant-negativen Mutante von K_v7.1 als auch die Inhibierung der Kanalaktivität von K_v7.1 führte zu einem Verlust der Volumenregulation der Zellen (vanTol *et al.* 2007) Die Proteolyse von K_v7.1 könnte einen neuartigen Inaktivierungsmechanismus von Ionenkanälen darstellen, der indirekt auch an der Volumenregulation von Zellen beteiligt ist. Für die Ca²⁺ ATPase (PMCA) wurde eine Regulation

der Aktivität durch Proteolyse bereits beschrieben (Paszty *et al.* 2002). PMCA ist ein Kalziumionentransporter, der für den Export von Kalziumionen aus der Zelle heraus verantwortlich ist (Verma *et al.* 1988). Während der frühen Phase der Apoptose wird dieser Transporter durch Caspase-3 proteolytisch gespalten. Als Folge der Prozessierung kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung und damit zu einem permanenten Kalziumausstrom aus der Zelle (Paszty *et al.* 2002).

Funktion des CTF2 von K_v7.1

Neben der Identifikation der für die Spaltung von K_v7.1 verantwortlichen Protease war es ein Ziel dieser Arbeit, die Funktion der Proteolyse von K_v7.1 zu untersuchen. Wie bereits beschrieben hat die Proteolyse auf den Kanal und seine Interaktionspartner großen Einfluss. Aber nicht nur die Proteolyse selbst, sondern auch das C-terminale Fragment (CTF2) scheint von großer Bedeutung.

Die Proteolyse und die Translokation von dabei entstehenden Fragmenten ist kein unbekannter Prozess. Als Paradebeispiel gilt hierfür die als *RIPping* (engl. regulated intramembrane proteolysis) bezeichnete Prozessierung des Notch Rezeptors und die anschließende Translokation des C-terminalen Fragments in den Zellkern (Brou *et al.* 2000; Kramer 2000). Durch die Bindung des Liganden an den Notch Rezeptor wird dieser aktiviert, was in der Abspaltung der intrazellulären Domäne von Notch mündet. Die Abspaltung dieser Domäne führt zum Lösen vom Transmembranteil und zur Translokation in den Zellkern. Dort reguliert die intrazelluläre Domäne von Notch die Expression einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die wiederum selbst die Expression weiterer Gene kontrollieren (Baron 2003).

Mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen das CTF2 von K_v7.1 im Zellkern lokalisiert ist. Untersuchungen der Sequenz des C-Terminus ergaben eine mögliche Kernimportsequenz (engl. nuclear leading sequenz – NLS). Durch gezielte Deletion und anschließender Untersuchung der Lokalisation, konnte gezeigt werden, dass diese Sequenz allerdings keine Rolle bei der Translokation in den Zellkern zu spielen scheint (Daten nicht gezeigt). Eine Möglichkeit den Export von Proteinen aus dem Zellkern zu verhindern und somit gezielt eine Akkumulation von Proteinen zu erreichen, besteht in der Verwendung von Leptomycin B. Hierdurch werden gezielt Kernexporter inhibiert und dadurch der Kernexport gestoppt (Kudo *et al.* 1998). Die Expression des CTF1 und die Verwendung von Leptomycin B zeigte eine deutliche Lokalisation dieses Fragments im Zellkern. Ohne Leptomycin wurde lediglich eine zytoplasmatische Lokalisation beobachtet. Die Expression des kleineren C-terminalen Fragments (CTF2) zeigte bereits ohne Leptomycin B Behandlung eine deutliche und fast ausschließliche Lokalisation im Zellkern. Hierdurch

wurden erste Anzeichen für eine Rolle des CTF2 im Zellkern erkennbar. Weiterhin scheint die Prozessierung des C-Terminus in das CTF2 erforderlich um den Transport in den Zellkern zu gewährleisten und dort eventuelle Funktionen als Transkriptionsfaktor auszuüben.

Die Suche nach Sequenzmotiven, welche eine mögliche Funktion der CTF's im Zellkern erklären könnten, führte zu einem Motiv am Ende des C-Terminus von K_v7.1. Dieses Motiv, bestehend aus den Aminosäuren LxxLL, wobei x eine beliebige Aminosäure sein kann, wird als Interaktionsmotiv mit Transkriptionsfaktoren in Verbindung gebracht (Plevin *et al.* 2005).

Um die Befunde der Immunfluoreszenzuntersuchungen und die Tatsache einer möglichen Interaktion mit Transkriptionsfaktoren durch ein Motiv innerhalb des CTF2 zu validieren, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus Zellen isoliert, welche vorher mit dem CTF2 transfiziert wurden. Um hier Effekte der Überexpression zu verhindern, wurden stabil transfizierte Zellen verwendet. Die Analyse wurde in unserem Auftrag von Dr. Robert Häsler am Institut für klinische Molekularbiologie in Kiel durchgeführt. Eine vollständige Auflistung der Ergebnisse ist in Tabelle 12 und Tabelle 13 (siehe Anhang) dargestellt. Die Auswertung zeigt, dass die Expression des CTF2 einen Einfluss auf eine Vielzahl von Genen hat, darunter auch andere Kaliumionenkanäle wie z.B. K_v7.5 und KCNT2, Hitzeschockproteine oder der Interleukin-13 Rezeptor.

Alle diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass das CTF2 an der Regulation von Proteinen auf transkriptioneller Ebene beteiligt ist. Allerdings wurden die oben beschriebenen Versuche stets in Überexpression und mit Fusionsproteinen durchgeführt. Hierdurch könnten, von physiologischen Prozessen, abweichende Effekte auftreten. Um solche Effekte zu vermeiden, sollte idealerweise mit *ungetaggt*en Proteinen gearbeitet werden. Weiterhin wäre auch die Durchführung einer weiteren Genexpressionsanalyse denkbar, in der direkt die Genexpression von K_v7.1 wt und K_v7.1 defizienten Mäusen verglichen wird.

Der Einfluss einer kardialen Hypertrophie auf die Generierung des CTF2

Kardiale Hypertrophie gehört zur Gruppe der Kardiomyopathien. Unter Hypertrophie versteht man eine, durch Zellvergrößerung verursachte, Vergrößerung von Organen oder Geweben, diese unterscheidet sich damit von einer Hyperplasie, welche durch vermehrte Zellteilung entsteht. Solche Veränderungen können unter anderem auch am Herzen auftreten und werden unter anderem durch Ischämie, Bluthochdruck, Herzklappenfehler oder durch Alterung verursacht (Frey *et al.* 2004). Eine Möglichkeit, solche Hypertrophien zu untersuchen, ist das TAC-Modell (engl. *transverse aortic constriction*). Im Zuge dessen wird die Aorta am Aortenbogen künstlich verengt. Dieser Zustand führt zu einem erhöhten Herzinnendruck und damit über einen längeren Zeitraum zu einer Hypertrophie des Herzens. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer Hypertrophie auf die Fragmentierung von K_v7.1 hin

untersucht. Hierfür wurden die Mäuse vier Wochen nach der Operation analysiert und mit Kontrolltieren verglichen. Die Auswertung der CTF2 Proteinmenge im Western Blot, zeigte vermehrt CTF2 in den Mäusen mit einer Hypertrophie. Gleichzeitig wurde auch vermehrt Caspase-3, sowie Bax und Bcl-2 nachgewiesen. Der Anstieg von Caspase-3 könnte für die vermehrte Proteolyse von K_v7.1 verantwortlich sein. Allerdings war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich einen Anstieg an aktiver Caspase-3 zu detektieren. Dies könnte an der starken Regulation des Caspasen liegen und dadurch verbunden zu einer sehr geringen Aktivierung welche, im Western Blot nicht detektiert werden kann.

Ein weitere Grund für das Fehlen von aktiver Caspase-3 könnte am Zeitpunkt der Analyse liegen In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse vier Wochen nach der Induktion einer kardialen Hypertrophie analysiert. Von Zhao *et al* wurde gezeigt, dass bereits 10 Tage nach Durchführung einer TAC-Operation, eine Vielzahl von proapoptotischen Genen vermehrt exprimiert werden. Darunter auch das für Caspase-3 kodierende Gen. Eine nach drei Wochen durchgeführte Analyse zeigte hingegen keine Veränderung der Caspase-3 expression (Zhao *et al.* 2004).

Die erhöhten Proteinmengen von Bax und Bcl-2, die in dieser Arbeit festgestellt wurden, deuten auf einen regulatorischen Mechanismus der Zelle, in Bezug auf die Apoptose hin. Um weitere Erkenntnisse über den Zeitpunkt der Caspase-3 Aktivierung und einen Zusammenhang mit der Proteolyse von K_v7.1 zu erhalten, wäre eine Untersuchung von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer TAC-Operation nötig.

Identifikation von Diablo als neuer Interaktionspartner von K_v7.1

Wie bereits beschrieben, wird die Funktion von K_v7.1 maßgeblich durch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst. Um unter anderem den Zusammenhang von K_v7.1 und der Apoptose zu beschreiben, wurde nach weiteren Interaktionspartnern von K_v7.1 gesucht.

Nach Prüfung der einzelnen Interaktionen auf eine relevante Interaktion wurden mit dem Protein SMAC/ Diablo weitere Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der vorliegenden Arbeit, schien ein Zusammenhang zwischen einem, an der Regulation der Apoptose beteiligten Protein und K_v7.1 denkbar.

Anhand verschiedener Trunkationsmutanten von K_v7.1 war es möglich, den Bereich einzugrenzen, der für die Interaktion beider Proteine verantwortlich ist. Hierbei scheint der distale Bereich des C-Terminus oder das CTF2 für die Bindung an Diablo erforderlich (siehe Abb. 54). Diablo selbst hat dabei jedoch keine Auswirkung auf die Proteolyse von K_v7.1.

Auch innerhalb von Diablo war es möglich die Region zu identifizieren, welche an der Interaktion mit K_v7.1 beteiligt ist. Diablo wird als Proform synthetisiert und mittels einer N-terminalen Importsequenz an die äußere Mitochondrienmembran transportiert. Nach

Insertion des Proteins in die äußere Mitochondrienmembran wird diese Sequenz abgespalten und es entsteht die mature Form von Diablo (Chai *et al.* 2000; Du *et al.* 2000). Genau diese Sequenz scheint für die Interaktion mit dem C-Terminus von Kv7.1 verantwortlich zu sein. Wie in dieser Arbeit durch Kopräzipitationsexperimente gezeigt werden konnte, kann mittels CTF2 nur die Proform von Diablo, nicht aber die mature Form präzipitiert werden.

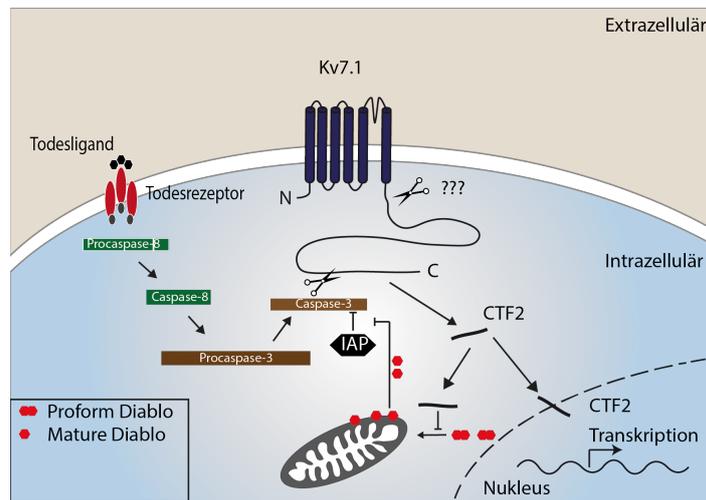


Abb. 54 Schematische Darstellung der Proteolyse von Kv7.1 sowie die Interaktion mit Diablo. Dargestellt ist die Proteolyse von Kv7.1 im distalen C-Terminus durch Caspase-3. Das hierbei entstehende CTF2 transloziert in den Nukleus und ist dort an der Genregulation beteiligt. Durch die Interaktion des CTF2 mit der Proform von Diablo wird die Interaktion von IAP (*inhibitor of apoptosis*) und Caspase-3 vermindert.

Denkbar wäre eine Regulation der Apoptose durch die Interaktion des CTF2 mit Diablo. Apoptose-Inhibitor Proteine – IAP (engl. *inhibitor of apoptosis protein*) sind verantwortlich für die Inhibition der Caspasen-3, -7 sowie der Procaspase-9 (Deveraux *et al.* 1999) und wirken damit antiapoptotisch. Diablo ist in der Lage, diese IAP's zu binden und dadurch ihre Wirkung auf die Caspasen zu unterbinden (siehe Abb. 55). Da CTF2 nur mit der Proform von Diablo interagiert, ist eine direkte Regulation unwahrscheinlich. Vielmehr könnte durch die Interaktion mit der Proform das Gleichgewicht zwischen Pro- und maturer Form auf die Seite der Proform verschoben werden. Hierdurch würde weniger Diablo in die Mitochondrienmembran eingelagert, was im Falle einer Induktion der Apoptose einen antiapoptotischen Effekt haben könnte.

Die veränderte Maturierung von Diablo durch CTF2 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Allerdings scheint auch CTF1 ab einer bestimmten Konzentration einen Einfluss auf Diablo zu haben.

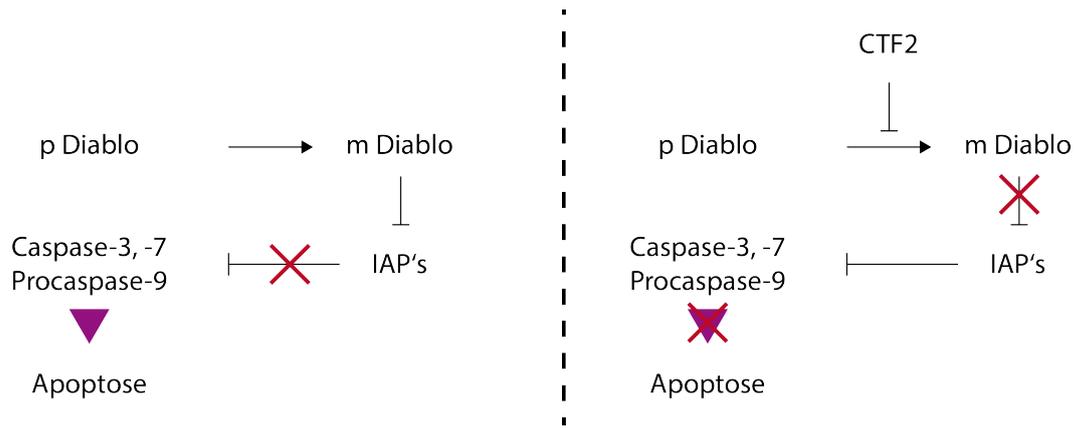


Abb. 55 Schematische Darstellung der Funktion von Diablo mit und ohne CTF2 Interaktion. Proteine der IAP-Familie wirken durch Interaktion mit Caspase-3, -7 und -9 inhibitorisch auf die Apoptose. Die mature Form von Diablo ist in der Lage, IAP's zu binden und wirkt daher exzitatorisch auf die Apoptose. Die Interaktion der Diablo Proform und des CTF2 führen zu einer verminderten Bildung der maturen Form. Hierdurch wird die proapoptotische Wirkung des IAP/ Diablo-Komplexes minimiert. (p Diablo – Proform Diablo; m Diablo – mature Form Diablo; IAP – *inhibitor of apoptosis protein*; CTF2 – C-terminales Fragment 2 von K_v7.1).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der spannungsabhängige Kaliumkanal $K_v7.1$ innerhalb seines zytosolisch lokalisierten C-Terminus proteolytisch gespalten wird. Die Proteolyse von $K_v7.1$ wird dabei durch Caspasen, die zu den Cysteinproteasen zählen vermittelt. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass Caspase-3 hierbei eine bedeutende Rolle übernimmt. Die Prozessierung des C-Terminus von $K_v7.1$ scheint einen regulatorischen Effekt auf die Funktion des Kanals zu besitzen. Weiterhin wurde in einem murinen kardialen Hypertrophiemodell eine gesteigerte Expression der Caspase-3 beobachtet sowie ein Anstieg in der Generierung des C-terminalen Fragments 2 (CTF2) von $K_v7.1$. Ebenfalls wurde eine, von der regulierten Proteolyse von $K_v7.1$ unabhängige, Aktivierung der Caspase-3 durch $K_v7.1$ beobachtet.

Die Proteolyse von $K_v7.1$ nimmt eine Sonderstellung innerhalb der K_v7 Familie ein, da ein solches Phänomen für andere Mitglieder dieser Familie bisher nicht beobachtet werden konnte. Für $K_v7.1$ selbst konnte die Prozessierung des C-Terminus in verschiedenen Spezies beobachtet werden, darunter *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens*.

Ebenfalls wurde eine Translokation des durch die Proteolyse entstehenden CTF2 von $K_v7.1$ in den Zellkern beobachtet. Anhand einer ersten Genexpressionsanalyse konnte ein Einfluss dieses Fragments auf die Transkription anderer Gene beschrieben werden. Darunter sind solche, die bei der Regenerierung von Gewebe, der Zelladhäsion, der Organentwicklung oder auch der Regulation des Zelltodes eine Rolle spielen.

Die Funktion und Kinetik von $K_v7.1$ und der zytoplasmatischen Proteolysefragmente von $K_v7.1$ werden maßgeblich durch andere Proteine beeinflusst. Um weitere regulatorische Interaktionspartner für $K_v7.1$ zu identifizieren, wurde ein *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen* durchgeführt. Hierbei konnte das Protein Diablo als ein putativer Interaktionspartner von $K_v7.1$ identifiziert werden. Die Ergebnisse der Hefe Interaktionsstudien konnten durch Überexpression beider Proteine und anschließender Kopräzipitation validiert werden. Diablo spielt eine wichtige Rolle bei apoptotischen Prozessen. Das Protein bindet dabei in seiner maturen Form an *Inhibitor of Apoptosis* Proteine (IAP - endogene Inhibitoren der Apoptose) und hebt deren repressiven Effekt auf die Apoptose auf. Als wichtige Bereiche für die Interaktion beider Proteine, konnten für $K_v7.1$ der distale C-Terminus und für Diablo der N-Terminus identifiziert werden. Die Bindung von $K_v7.1$ an Diablo führt zu einer verminderten Reifung von Diablo von der Proform zur maturen Form. Durch diese Verschiebung in der Maturierung können weniger *Inhibitor of Apoptosis* Proteine gebunden werden. Die Interaktion von Diablo und $K_v7.1$ hat also eine antiapoptotisch Wirkung.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die gezielte Proteolyse durch Caspasen in der frühen Phase der Apoptose eine Regulationsmöglichkeit von spannungsabhängigen Kaliumkanälen darstellt. Weiterhin wurde der Grundstein für die

Erforschung eines möglichen Zusammenhangs einer kardialen Hypertrophie und der Proteolyse von K_v7.1 gelegt.

7 Summary

In this study the proteolytical cleavage of the voltage gated potassium channel K_v7.1 within its cytosolic C-terminus is described for the first time. This proteolysis is mediated by caspases, members of the cysteine protease family. In detail it was shown that caspase-3 plays a crucial role. The processing of the C-terminus of K_v7.1 seems to have a regulatory effect on the channel. Furthermore, an increase in caspase-3 expression as well as an increase in generation of the C-terminal fragment 2 (CTF2) was observed in a murine cardiac hypertrophy model. Moreover, K_v7.1 was shown to activate caspase-3. This activation is independent of the proteolysis of K_v7.1 within the C-terminus.

The proteolysis of K_v7.1 illustrates a unique position within the K_v7 family, since such a phenomenon for other members of this family has not been observed yet. Processing of the K_v7.1 C-terminus could be observed in several species, including *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* and *Homo sapiens*.

Furthermore, cleavage of K_v7.1 led to the translocation of the CTF2 to the nucleus. Using a gene expression analysis, it was shown that CTF2 influenced the transcription of further genes. Including those responsible for tissue regeneration, cell-cell adhesion, organ development and regulation of cell killing.

The function and kinetics of K_v7.1 and its cleavage fragments are highly influenced by other proteins. To identify more of these regulatory proteins we used a split-ubiquitin yeast two-hybrid screen, which identified Diablo as a putative interaction partner of K_v7.1. This interaction was validated by overexpression experiments followed by immunoprecipitation. Diablo plays an important role in apoptosis. In the mature form, Diablo interacts with inhibitor of apoptosis proteins (IAP) and prevents their repressive function. An area within the distal C-terminus of K_v7.1 was identified to be critical for the interaction with the N-terminus of Diablo. In fact, the binding of K_v7.1 to Diablo led to a shift in the maturation of Diablo, from the mature form to the proform. Due to this shift in the maturation less IAPs are occupied by the interaction with Diablo. Therefore the interaction of Diablo and K_v7.1 has an antiapoptotic effect.

Summing up, in this study the proteolytical cleavage of a voltage gated potassium channel by caspases in the early phase of apoptosis was described. Furthermore, this cleavage seems to be a new regulatory mechanism for these channels. Moreover, this study sets a basis for the research of cardiac hypertrophy and their relation with cleavage events in ion channels.

8 Literaturverzeichnis

- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Alzamora, R., F. Gong, et al. (2010). "AMP-activated protein kinase inhibits KCNQ1 channels through regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2 in renal epithelial cells." *Am J Physiol Renal Physiol* **299**(6): F1308-1319.
- Antz, C. and B. Fakler (1998). "Fast Inactivation of Voltage-Gated K(+) Channels: From Cartoon to Structure." *News Physiol Sci* **13**: 177-182.
- Anversa, P., B. Hiler, et al. (1986). "Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart." *J Am Coll Cardiol* **8**(6): 1441-1448.
- Anversa, P., T. Palackal, et al. (1990). "Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart." *Circ Res* **67**(4): 871-885.
- Arcangeli, A., L. Bianchi, et al. (1995). "A novel inward-rectifying K+ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells." *J Physiol* **489** (Pt 2): 455-471.
- Armstrong, C. M., F. Bezanilla, et al. (1973). "Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase." *J Gen Physiol* **62**(4): 375-391.
- Ashcroft, F. M. (2000). *Ion channels and disease channelopathies*. San Diego u.a., Acad. Press.
- Bal, M., J. Zhang, et al. (2008). "Homomeric and heteromeric assembly of KCNQ (Kv7) K+ channels assayed by total internal reflection fluorescence/fluorescence resonance energy transfer and patch clamp analysis." *J Biol Chem* **283**(45): 30668-30676.
- Baran, P., R. Nitz, et al. (2013). "Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling." *J Biol Chem* **288**(21): 14756-14768.
- Barhanin, J., F. Lesage, et al. (1996). "K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current." *Nature* **384**(6604): 78-80.
- Baron, M. (2003). "An overview of the Notch signalling pathway." *Semin Cell Dev Biol* **14**(2): 113-119.
- Belloq, C., A. C. van Ginneken, et al. (2004). "Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome." *Circulation* **109**(20): 2394-2397.
- Bendahhou, S., C. Marionneau, et al. (2005). "In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart." *Cardiovasc Res* **67**(3): 529-538.
- Bertuccio, C. A., H. C. Chapin, et al. (2009). "Polycystin-1 C-terminal cleavage is modulated by polycystin-2 expression." *J Biol Chem* **284**(31): 21011-21026.
- Boldin, M. P., I. L. Mett, et al. (1995). "Self-association of the /death domains/ of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects." *J Biol Chem* **270**: 387-391.
- Bortner, C. D., F. M. Hughes, Jr., et al. (1997). "A primary role for K+ and Na+ efflux in the activation of apoptosis." *J Biol Chem* **272**(51): 32436-32442.
- Bostan, O., S. G. Temel, et al. (2013). "Jervell and Lange-Nielsen Syndrome: Homozygous Missense Mutation of KCNQ1 in a Turkish Family." *Pediatr Cardiol*.
- Brenyo, A. J., D. T. Huang, et al. (2012). "Congenital long and short QT syndromes." *Cardiology* **122**(4): 237-247.
- Brou, C., F. Logeat, et al. (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Mol Cell* **5**(2): 207-216.
- Brown, D. A. (2008). "Kv7 (KCNQ) potassium channels that are mutated in human diseases." *J Physiol* **586**(7): 1781-1783.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." *Cell* **89**(3): 331-340.
- Broxterman, H. J. and K. Hoekman (1999). "Direct activation of caspases by RGD-peptides may increase drug sensitivity of tumour cells." *Drug Resist Updat* **2**(3): 139-141.
- Bruns, P. (1868). "Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste." *Beitr Klin Chir*(3): 443-446.

- Bucher, D., S. Raugei, et al. (2006). "Polarization effects and charge transfer in the KcsA potassium channel." *Biophys Chem* **124**(3): 292-301.
- Buckley, C. D., D. Pilling, et al. (1999). "RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation." *Nature* **397**(6719): 534-539.
- Buttner, S., T. Eisenberg, et al. (2007). "Endonuclease G regulates budding yeast life and death." *Mol Cell* **25**: 233-246.
- Cancer Genome Atlas Research, N., C. Kandoth, et al. (2013). "Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma." *Nature* **497**(7447): 67-73.
- Carattino, M. D., S. Sheng, et al. (2006). "The epithelial Na⁺ channel is inhibited by a peptide derived from proteolytic processing of its alpha subunit." *J Biol Chem* **281**(27): 18901-18907.
- Caserta, T. M., A. N. Smith, et al. (2003). "Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties." *Apoptosis* **8**(4): 345-352.
- Catterall, W. A. (1993). "Structure and function of voltage-gated ion channels." *Trends Neurosci* **16**(12): 500-506.
- Cerretti, D. P., C. J. Kozlosky, et al. (1992). "Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme." *Science* **256**(5053): 97-100.
- Chae, H. J., J. S. Kang, et al. (2000). "Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts." *Pharmacol Res* **42**(4): 373-381.
- Chai, J., C. Du, et al. (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." *Nature* **406**(6798): 855-862.
- Chen, Y. H., S. J. Xu, et al. (2003). "KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation." *Science* **299**(5604): 251-254.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1997). "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death." *Science* **275**(5303): 1122-1126.
- Chouabe, C., N. Neyroud, et al. (1997). "Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias." *Embo J* **16**(17): 5472-5479.
- Claycomb, W. C., N. A. Lanson, Jr., et al. (1998). "HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 2979-2984.
- Cotter, T. G. (2009). "Apoptosis and cancer: the genesis of a research field." *Nat Rev Cancer* **9**(7): 501-507.
- de Graaf, A. O., L. P. van den Heuvel, et al. (2004). "Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis." *Exp Cell Res* **299**(2): 533-540.
- DeCoursey, T. E., K. G. Chandy, et al. (1984). "Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?" *Nature* **307**(5950): 465-468.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* **22**(53): 8543-8567.
- Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 378-390.
- Delisle, B. P., B. D. Anson, et al. (2004). "Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking." *Circ Res* **94**(11): 1418-1428.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-252.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Duvernay, M., S. Young, et al. (2013). "Protease-activated receptor (PAR) 1 and PAR4 differentially regulate factor V expression from human platelets." *Mol Pharmacol* **83**(4): 781-792.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan, et al. (1991). "Mechanisms and functions of cell death." *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-698.
- Fannin, J., K. M. Rice, et al. (2013). "The Effects of Aging on Indices of Oxidative Stress and Apoptosis in the Female Fischer 344/Nnia X Brown Norway/BiNia Rat Heart." *Open Cardiovasc Med J* **7**: 113-121.

- Frey, N., H. A. Katus, et al. (2004). "Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?" Circulation **109**(13): 1580-1589.
- Fulda, S. (2014). "Molecular Pathways: Targeting Death Receptors and Smac Mimetics." Clin Cancer Res.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." Oncogene **25**(34): 4798-4811.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.
- Gamper, N. and M. S. Shapiro (2003). "Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels." J Gen Physiol **122**(1): 17-31.
- Garcia-Caballero, A., Y. Dang, et al. (2008). "ENaC proteolytic regulation by channel-activating protease 2." J Gen Physiol **132**(5): 521-535.
- Gescher, A. (2000). "Staurosporine analogues - pharmacological toys or useful antitumour agents?" Crit Rev Oncol Hematol **34**(2): 127-135.
- Gewirtz, D. A., S. Grant, et al. (2007). Apoptosis, Senescence, and Cancer. Totowa, NJ, Humana Press Inc.
- Ghribi, O., M. M. Herman, et al. (2002). "The endoplasmic reticulum is the main site for caspase-3 activation following aluminum-induced neurotoxicity in rabbit hippocampus." Neurosci Lett **324**(3): 217-221.
- Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, et al. (2006). "The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)_{1.2} encodes a transcription factor." Cell **127**(3): 591-606.
- Gonzalvez, F. and A. Ashkenazi (2010). "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL." Oncogene **29**(34): 4752-4765.
- Grutter, M. G. (2000). "Caspases: key players in programmed cell death." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 649-655.
- Gunther, W., A. Luchow, et al. (1998). "ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8075-8080.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, et al. (2003). "International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels." Pharmacol Rev **55**(4): 583-586.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 473-508.
- Haitin, Y. and B. Attali (2008). "The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module." J Physiol **586**(7): 1803-1810.
- Hampton, R. Y. (2002). "Proteolysis and sterol regulation." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 345-378.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Harmer, S. C., J. S. Mohal, et al. (2014). "Cellular mechanisms underlying the increased disease severity seen for patients with long QT syndrome caused by compound mutations in KCNQ1." Biochem J.
- Hedfalk, K. (2012). "Codon optimisation for heterologous gene expression in yeast." Methods Mol Biol **866**: 47-55.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.
- Hernandez, C. C., B. Falkenburger, et al. (2009). "Affinity for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determines muscarinic agonist sensitivity of Kv7 K⁺ channels." J Gen Physiol **134**(5): 437-448.
- Hille and Bertil (2001). Ion channels of excitable membranes. Sunderland, Mass., Sinauer.
- Hille, B., C. M. Armstrong, et al. (1999). "Ion channels: from idea to reality." Nat Med **5**(10): 1105-1109.
- Hitomi, J., T. Katayama, et al. (2004). "Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12." Neurosci Lett **357**(2): 127-130.

- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." *J Physiol* **117**(4): 500-544.
- Hong, K., D. R. Piper, et al. (2005). "De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero." *Cardiovasc Res* **68**(3): 433-440.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-195.
- Jacobsen, M. D., M. Weil, et al. (1996). "Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death." *J Cell Biol* **133**(5): 1041-1051.
- Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). "Programmed cell death in animal development." *Cell* **88**(3): 347-354.
- Jessel, R., S. Haertel, et al. (2002). "Kinetics of apoptotic markers in exogenously induced apoptosis of EL4 cells." *J Cell Mol Med* **6**(1): 82-92.
- Kapplinger, J. D., D. J. Tester, et al. (2009). "Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test." *Heart Rhythm* **6**(9): 1297-1303.
- Kathofer, S., K. Rockl, et al. (2003). "Human beta(3)-adrenoreceptors couple to KvLQT1/MinK potassium channels in *Xenopus* oocytes via protein kinase C phosphorylation of the KvLQT1 protein." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **368**(2): 119-126.
- Kaufman, R. J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." *Genes Dev* **13**(10): 1211-1233.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Kim, D. Y., B. W. Carey, et al. (2007). "BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity." *Nat Cell Biol* **9**(7): 755-764.
- Kim, S. Y., H. K. Oh, et al. (2007). "RGD-peptide presents anti-adhesive effect, but not direct pro-apoptotic effect on endothelial progenitor cells." *Arch Biochem Biophys* **459**(1): 40-49.
- Kimoto, K., K. Kinoshita, et al. (2013). "Characterization of a novel mutant KCNQ1 channel subunit lacking a large part of the C-terminal domain." *Biochem Biophys Res Commun* **440**(2): 283-288.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *EMBO J* **14**: 5579-5588.
- Kleyman, T. R., M. D. Carattino, et al. (2009). "ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases." *J Biol Chem* **284**(31): 20447-20451.
- Kramer, H. (2000). "RIPping notch apart: a new role for endocytosis in signal transduction?" *Sci STKE* **2000**(29): pe1.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, et al. (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* **87**: 99-163.
- Kudo, N., B. Wolff, et al. (1998). "Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1." *Exp Cell Res* **242**(2): 540-547.
- Kunzelmann, K. (2005). "Ion channels and cancer." *J Membr Biol* **205**(3): 159-173.
- Lamkanfi, M., N. Festjens, et al. (2007). "Caspases in cell survival, proliferation and differentiation." *Cell Death Differ* **14**(1): 44-55.
- Lang, F., G. L. Busch, et al. (1998). "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms." *Physiol Rev* **78**(1): 247-306.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**: 491-501.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* **412**: 95-99.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* **91**: 479-489.

- Lindstrom, J., R. Schoepfer, et al. (1987). "Molecular studies of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor family." *Mol Neurobiol* **1**(4): 281-337.
- Lopes, C. M., J. I. Remon, et al. (2007). "Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP2-sensitivity of K⁺ channels." *Channels* **1**(2): 124-134.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**: 481-490.
- Maeno, E., Y. Ishizaki, et al. (2000). "Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9487-9492.
- Marcello, E., F. Gardoni, et al. (2010). "An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **285**(14): 10376-10384.
- Matsuki, K., T. Sasho, et al. (2008). "RGD peptide-induced cell death of chondrocytes and synovial cells." *J Orthop Sci* **13**(6): 524-532.
- McCrossan, Z. A. and G. W. Abbott (2004). "The MinK-related peptides." *Neuropharmacology* **47**(6): 787-821.
- McStay, G. P., G. S. Salvesen, et al. (2008). "Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways." *Cell Death Differ* **15**(2): 322-331.
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, et al. (1999). "Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall." *J Mol Biol* **288**(4): 765-786.
- Morishima, N., K. Nakanishi, et al. (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." *J Biol Chem* **277**(37): 34287-34294.
- Morrison, K. L. and G. A. Weiss (2001). "Combinatorial alanine-scanning." *Curr Opin Chem Biol* **5**(3): 302-307.
- Mullberg, J., K. Althoff, et al. (2000). "The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology." *Eur Cytokine Netw* **11**(1): 27-38.
- Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* **403**(6765): 98-103.
- Nakajo, K., M. H. Ulbrich, et al. (2010). "Stoichiometry of the KCNQ1 - KCNE1 ion channel complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(44): 18862-18867.
- Nasu-Nishimura, Y., D. Hurtado, et al. (2006). "Identification of an endoplasmic reticulum-retention motif in an intracellular loop of the kainate receptor subunit KA2." *J Neurosci* **26**(26): 7014-7021.
- Neyroud, N., F. Tesson, et al. (1997). "A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome." *Nat Genet* **15**(2): 186-189.
- Nguyen, H. M., H. Miyazaki, et al. (2012). "Modulation of voltage-gated K⁺ channels by the sodium channel beta1 subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(45): 18577-18582.
- Nicholson, D. W., A. Ali, et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." *Nature* **376**(6535): 37-43.
- Panaghie, G. and G. W. Abbott (2007). "The role of S4 charges in voltage-dependent and voltage-independent KCNQ1 potassium channel complexes." *J Gen Physiol* **129**(2): 121-133.
- Papazian, D. M. (1999). "Potassium channels: some assembly required." *Neuron* **23**(1): 7-10.
- Paszy, K., A. K. Verma, et al. (2002). "Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis." *J Biol Chem* **277**(9): 6822-6829.
- Phaneuf, S. and C. Leeuwenburgh (2002). "Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**(2): R423-430.
- Plant, L. D., D. Xiong, et al. (2014). "Individual IKs channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Plevin, M. J., M. M. Mills, et al. (2005). "The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation." *Trends Biochem Sci* **30**(2): 66-69.

- Porter, A. G. (2006). "Flipping the safety catch of procaspase-3." *Nat Chem Biol* **2**(10): 509-510.
- Priori, S. G., R. Bloise, et al. (2001). "The long QT syndrome." *Europace* **3**(1): 16-27.
- Puente, X. S. and C. Lopez-Otin (2004). "A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors." *Genome Res* **14**(4): 609-622.
- Puente, X. S., L. M. Sanchez, et al. (2005). "A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 2): 331-334.
- Purtell, K., M. Paroder-Belenitsky, et al. (2012). "The KCNQ1-KCNE2 K(+) channel is required for adequate thyroid I(-) uptake." *FASEB J* **26**(8): 3252-3259.
- Raff, M. (1998). "Cell suicide for beginners." *Nature* **396**(6707): 119-122.
- Ramage, P., D. Cheneval, et al. (1995). "Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 beta-converting enzyme precursor." *J Biol Chem* **270**(16): 9378-9383.
- Rawlings, N. D., M. Waller, et al. (2014). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue): D503-509.
- Richards, F. M. and C. E. Kundrot (1988). "Identification of structural motifs from protein coordinate data: secondary structure and first-level supersecondary structure." *Proteins* **3**(2): 71-84.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 897-907.
- Roberts, D. L., W. Merrison, et al. (2001). "The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity." *J Cell Biol* **153**(1): 221-228.
- Roura-Ferrer, M., L. Sole, et al. (2010). "Impact of KCNE subunits on KCNQ1 (Kv7.1) channel membrane surface targeting." *J Cell Physiol* **225**(3): 692-700.
- Roux, B., S. Berneche, et al. (2011). "Ion selectivity in channels and transporters." *J Gen Physiol* **137**(5): 415-426.
- Roy, S., C. I. Bayly, et al. (2001). "Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6132-6137.
- Rupinder, S. K., A. K. Gurpreet, et al. (2007). "Cell suicide and caspases." *Vascul Pharmacol* **46**(6): 383-393.
- Sachse, C. C., Y. H. Kim, et al. (2013). "BACE1 and presenilin/gamma-secretase regulate proteolytic processing of KCNE1 and 2, auxiliary subunits of voltage-gated potassium channels." *FASEB J* **27**(6): 2458-2467.
- Sachse, C. C., Y. H. Kim, et al. (2013). "BACE1 and presenilin/gamma-secretase regulate proteolytic processing of KCNE1 and 2, auxiliary subunits of voltage-gated potassium channels." *FASEB J*.
- Sakamoto, K. M. (2002). "Ubiquitin-dependent proteolysis: its role in human diseases and the design of therapeutic strategies." *Mol Genet Metab* **77**(1-2): 44-56.
- Sanguinetti, M. C., M. E. Curran, et al. (1996). "Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel." *Nature* **384**(6604): 80-83.
- Sanguinetti, M. C. and N. K. Jurkiewicz (1990). "Two components of cardiac delayed rectifier K+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents." *J Gen Physiol* **96**(1): 195-215.
- Sansonetti, P. J., A. Phalipon, et al. (2000). "Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation." *Immunity* **12**: 581-590.
- Schlondorff, J. and C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding." *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3603-3617.
- Schroeder, B. C., S. Waldegger, et al. (2000). "A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3." *Nature* **403**(6766): 196-199.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, et al. (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." *Eur J Biochem* **254**: 439-459.
- Schutte, B., R. Nuydens, et al. (1998). "Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells." *J Neurosci Methods* **86**(1): 63-69.

- Schwake, M., D. Athanasiadu, et al. (2006). "Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly." *J Neurosci* **26**(14): 3757-3766.
- Schwake, M., T. J. Jentsch, et al. (2003). "A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly." *EMBO Rep* **4**(1): 76-81.
- Shamgar, L., L. Ma, et al. (2006). "Calmodulin is essential for cardiac IKS channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations." *Circulation research* **98**(8): 1055-1063.
- Shimbo, K., G. W. Hsu, et al. (2012). "Quantitative profiling of caspase-cleaved substrates reveals different drug-induced and cell-type patterns in apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(31): 12432-12437.
- Shimizu, T., T. Fujii, et al. (2013). "Up-regulation of Kv7.1 channels in thromboxane A-induced colonic cancer cell proliferation." *Pflugers Arch*.
- Shiromizu, T., J. Adachi, et al. (2013). "Identification of missing proteins in the neXtProt database and unregistered phosphopeptides in the PhosphoSitePlus database as part of the Chromosome-centric Human Proteome Project." *J Proteome Res* **12**(6): 2414-2421.
- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, et al. (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations." *Science* **288**: 2354-2357.
- Srinivasula, S. M., P. Datta, et al. (2000). "Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway." *J Biol Chem* **275**(46): 36152-36157.
- Stagljar, I., C. Korostensky, et al. (1998). "A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5187-5192.
- Stennicke, H. R., M. Ratus, et al. (2000). "Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8." *Biochem J* **350 Pt 2**: 563-568.
- Stoeckenius, W. and D. M. Engelman (1969). "Current models for the structure of biological membranes." *J Cell Biol* **42**(3): 613-646.
- Studholme, D. J., N. D. Rawlings, et al. (2003). "A comparison of Pfam and MEROPS: two databases, one comprehensive, and one specialised." *BMC Bioinformatics* **4**: 17.
- Tafani, M., D. A. Minchenko, et al. (2001). "Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine." *Cancer Res* **61**(6): 2459-2466.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 621-632.
- Takahashi, A., H. Yamaguchi, et al. (1993). "Change in K⁺ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique." *Am J Physiol* **265**(2 Pt 1): C328-336.
- Takei, N. and Y. Endo (1994). "Ca²⁺ ionophore-induced apoptosis on cultured embryonic rat cortical neurons." *Brain Res* **652**(1): 65-70.
- Takumi, T., H. Ohkubo, et al. (1988). "Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current." *Science* **242**(4881): 1042-1045.
- Tamargo, J., R. Caballero, et al. (2004). "Pharmacology of cardiac potassium channels." *Cardiovasc Res* **62**(1): 9-33.
- Teiger, E., V. D. Than, et al. (1996). "Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat." *J Clin Invest* **97**(12): 2891-2897.
- Than, B. L., J. A. Goos, et al. (2013). "The role of KCNQ1 in mouse and human gastrointestinal cancers." *Oncogene*.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." *Nature* **356**(6372): 768-774.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-1316.
- Tosato, M., V. Zamboni, et al. (2007). "The aging process and potential interventions to extend life expectancy." *Clin Interv Aging* **2**(3): 401-412.

- Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 785-799.
- Ubersax, J. A. and J. E. Ferrell, Jr. (2007). "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 530-541.
- Urrego, D., A. P. Tomczak, et al. (2014). "Potassium channels in cell cycle and cell proliferation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**(1638): 20130094.
- van Engeland, M., L. J. Nieland, et al. (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." *Cytometry* **31**(1): 1-9.
- vanTol, B. L., S. Missan, et al. (2007). "Contribution of KCNQ1 to the regulatory volume decrease in the human mammary epithelial cell line MCF-7." *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(3): C1010-1019.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." *Nature* **335**(6189): 440-442.
- Verma, A. K., A. G. Filoteo, et al. (1988). "Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump." *J Biol Chem* **263**(28): 14152-14159.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, et al. (2005). "Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer." *Ann Hematol* **84**(10): 627-639.
- Wang, J., H. J. Chun, et al. (2001). "Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling." *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13884-13888.
- Wang, L., F. Du, et al. (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." *Cell* **133**(4): 693-703.
- Wang, Q., M. E. Curran, et al. (1996). "Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias." *Nature genetics* **12**(1): 17-23.
- Wang, Y. C., S. E. Peterson, et al. (2014). "Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells." *Cell Res* **24**(2): 143-160.
- Warner, H. R. (1997). "Aging and regulation of apoptosis." *Curr Top Cell Regul* **35**: 107-121.
- Warner, H. R., R. J. Hodes, et al. (1997). "What does cell death have to do with aging?" *J Am Geriatr Soc* **45**(9): 1140-1146.
- Wen, H. and I. B. Levitan (2002). "Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels." *J Neurosci* **22**(18): 7991-8001.
- Wiener, R., Y. Haitin, et al. (2008). "The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction." *J Biol Chem* **283**(9): 5815-5830.
- Wilson, K. P., J. A. Black, et al. (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme." *Nature* **370**(6487): 270-275.
- Wrobel, E., D. Tapken, et al. (2012). "The KCNE Tango - How KCNE1 Interacts with Kv7.1." *Front Pharmacol* **3**: 142.
- Wu, D., H. D. Wallen, et al. (1997). "Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9." *Science* **275**(5303): 1126-1129.
- Wu, D. M., M. Jiang, et al. (2006). "KCNE2 is colocalized with KCNQ1 and KCNE1 in cardiac myocytes and may function as a negative modulator of I(Ks) current amplitude in the heart." *Heart Rhythm* **3**(12): 1469-1480.
- Yamin, T. T., J. M. Ayala, et al. (1996). "Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme." *J Biol Chem* **271**(22): 13273-13282.
- Yang, M. Y., H. Chuang, et al. (2002). "Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks." *J Leukoc Biol* **71**(2): 231-237.
- Yang, T., H. Kanki, et al. (2003). "Phosphorylation of the IKs channel complex inhibits drug block: novel mechanism underlying variable antiarrhythmic drug actions." *Circulation* **108**(2): 132-134.
- Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, et al. (2005). "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." *Pharmacol Rev* **57**(4): 387-395.
- Yu, S. P. and D. W. Choi (2000). "Ions, cell volume, and apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9360-9362.
- Yu, S. P., C. H. Yeh, et al. (1997). "Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current." *Science* **278**(5335): 114-117.

- Yuan, J. Y. and H. R. Horvitz (1990). "The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death." *Dev Biol* **138**: 33-41.
- Yus-Najera, E., I. Santana-Castro, et al. (2002). "The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels." *J Biol Chem* **277**(32): 28545-28553.
- Zanotto-Filho, A., E. Braganhol, et al. (2012). "Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling." *Invest New Drugs* **30**(6): 2252-2262.
- Zhao, M., A. Chow, et al. (2004). "Microarray analysis of gene expression after transverse aortic constriction in mice." *Physiol Genomics* **19**(1): 93-105.
- Zheng, Y., X. Zhu, et al. (2012). "Hexachlorophene is a potent KCNQ1/KCNE1 potassium channel activator which rescues LQTS mutants." *PLoS One* **7**(12): e51820.
- Zhou, H. X. and J. A. McCammon (2010). "The gates of ion channels and enzymes." *Trends Biochem Sci* **35**(3): 179-185.
- Zhou, Y., J. Wang, et al. (2002). "Modulation of *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel activity by bound protein kinase a catalytic subunit." *J Neurosci* **22**(10): 3855-3863.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." *Cell* **90**: 405-413.

9 Material

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe, D), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Merck (Darmstadt, D) und Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Puffer und Lösungen

Tabelle 3 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

LB Medium	1% [w/v] NaCl; 1% [w/v] Trypton/Pepton aus Casein; 0,5% Hefeextrakt; pH 7,0
LB-Amp	1 l LB Medium 50 µg/ml Ampicillin
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-HCl; 0,05 M EDTA; 5,5% Essigsäure
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Lysispuffer	PBS; 1% TritonX-100; 1 Tablette CompleteProtease Inhibitor Roche auf 50 ml
TBS	150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,5
TBS/T	TBS; 0,1% [v/v] Tween-20
SDS-Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycin; 250 mM Tris-HCl; 35 mM SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl; 0,4% [w/v] SDS; pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl; 0,4% [w/v] SDS; pH 6,8
Stripping Puffer	0,2 M NaOH
ND-96	96 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; 5 mM HEPES; pH 7,4; G418 (0,05 mg/ml)
SDS-Probenpuffer (5x)	1 M Tris-HCl; 86% [v/v] Glycerin; 10% [w/v] SDS; 500 mM DTT; Bromphenolblau
Transferpuffer (10x)	250 mM Tris-HCl; 2 M Glycin; pH 8,3
Transferpuffer (1x)	10% [v/v] 10x Transferpuffer; 20% [v/v] Methanol

Tabelle 4 Liste der Puffer und Lösungen für den *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen*

YPD-Medium	1% [w/v] Bacto™ Yeast extract; 2% [w/v]; Bacto™ Pepton; 2% [w/v] Glucose
LiSorb	100 mM Li-Acetat; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 M Sorbitol
LiPEG	100 mM Li-Acetat; 10 mM Tris-HCl; 1 M EDTA; 40% [v/v] PEG3350; pH 8,0
SC-Leu; -Leu/-Trp; -Leu/-Trp/-His -Medium	0,67% [w/v] Yeast nitrogen base w/o amino acids; 0,2% [w/v] Drop-out Mix; 2% [w/v] Glucose
SC-Leu; -Leu/-Trp; -Leu/-Trp/-His -Platten	SC-X Medium; 1,5% [w/v] Agar-Agar

Transformations-Mix	33% [v/v] PEG 3350; 100 mM Li-Acetat; 2,8% [v/v] Lachsspermien DNA (10 mg/ml)
Puffer 1	0,9 M Sorbitol; 0,1 M EDTA; 25% [w/v] Zymolyase 20T; pH 8,0
Puffer 2	50 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; pH 7,4
10x SC-His/ -Trp/ -Leu/ -Ura Drop-out Mix	je 20 g Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin; 20 g Inositol; 5 g Adenin; 2 g p-Aminobenzoesäure
Drop-out Mix	18,3 g 10x SC-His/Trp/Leu/Ura Drop-out Mix; 1 g Histidin; 2 g Leucin; 1 g Uracil; 1 g Tryptophan

Tabelle 5 Liste der verwendeten Kit

Bezeichnung	Hersteller
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
NucleoSpin RNA Kit	Machery-Nagel
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit	Life Technologies
Annexin V Apoptosis Detection Kit APC	eBioscience

Zelllinie

Die vorliegende Arbeit wurde mit den in Tabelle 6 aufgeführten Zelllinien durchgeführt.

Tabelle 6 Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme.

Zelllinie	Referenz
Eukaryotische Zellen	
Cos7	Niere der grünen Meerkatze DMSZ, Braunschweig, D
HEK293T	Humane embryonale Nierengewebszellen DKFZ, Heidelberg, D
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen DMSZ, Braunschweig, D
HL-1	Murine Kardiomyozyten Claycomb, Prof.
NRVCM	Primäre Kardiomyozyten der Ratte
NMY51	Hefe-Reporterstamm Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
Prokaryotische Zellen	
E.coli	E. coli XL1 Blue Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Antikörper

Tabelle 7 Liste der verwendeten Primärantikörper.

Antigen	Bezeichnung	Hersteller	Erzeugt in	Verdünnung	
				WB	IF
K _v 7.1	ab65092	Abcam	Kaninchen	1:1000	/
K _v 7.1	AB5932	Millipore	Kaninchen	1:500	/
K _v 7.1	Q1T1	Pineda	Kaninchen	1:2500	/
Aktin	Aktin	Sigma	Kaninchen	1:5000	/
myc	9B11	Cell Signaling	Maus	1:1000	1:500
HA	3F10	Roche	Ratte	1:1000	1:500
HA-POD	HA-POD	Roche	Ratte	1:1000	/
Caspase-3	8G10	Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	/
Caspase-8	4790	Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	/
Bax	556467	BD	Maus	1:500	/
Bcl-2	PC68	Millipore	Kaninchen	1:500	/
KDEL	KDEL	Enzo	Maus	/	1:250
SP-1	SP-1	Millipore	Kaninchen	1:5000	/
GAPDH	GT239	GeneTex	Maus	1:1000	/
Diablo	Diablo	Cell Signaling	Maus	1:500	/

Tabelle 8 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Antigen	Bezeichnung	Hersteller	Erzeugt in	Verdünnung	
				WB	IF
Maus IgG	Maus-POD	Santa Cruz	Schaf	1:50000	/
Ratte IgG	Ratte-POD	Santa Cruz	Schaf	1:50000	/
Kaninchen IgG	Kaninchen-POD	Santa Cruz	Esel	1:50000	/
Maus IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies	Esel	/	1:500
Ratte IgG	Alexa Fluor 594	Life Technologies	Esel	/	1:500
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies	Kaninchen	/	1:500

Plasmide und Vektoren

Diese Arbeit wurde mit den in Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführten Plasmiden und Vektoren angefertigt.

Tabelle 9 Liste der verwendeten Plasmide.

Name	Vektor	Tag	Restriktions-schnittstellen
K _v 7.1-myc	pForg	-myc	HindIII/BamHI
mK _v 7.1	pSport6	/	
K _v 7.1-CTF1-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-CTF2-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-Δ445-475-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-Δ445-450-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-Δ445-456-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI

K _v 7.1-Δ445-462-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-Δ445-468-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-S457A-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-V458A-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-D459A-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-G460A-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-G460S-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-Y461A-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-D462A-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-V458W-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-F456R-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-G460W-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-D317A-HA	pFrog	-HA	HindIII/EcoRI
K _v 7.1-D446E-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-R451W-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-P448L-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-ER-myc	pFrog	-myc	HindIII/BamHI
K _v 7.1-Flag	pcDNA™ 4/TO	-3xFlag	
mK _v 7.1-Flag	pcDNA™ 4/TO	-3xFlag	
K _v 7.1-CT-eGFP	pFrog	-eGFP	HindIII/BamHI
K _v 7.1-HA-CT-myc	pFrog	HA-myc	HindIII/BamHI
Caspase-3	pFrog	/	HindIII/EcoRI
Caspase-D28A/D175A	pFrog	/	HindIII/EcoRI
KCNE1-HA	pFrog	-HA	
Diablo-HA	pFrog	-HA	
Diablo ΔNT-HA	pFrog	-HA	

Tabelle 10 Liste der verwendeten Vektoren.

Name	Herkunft	Promotor	Resistenz	Tag
pFrog		CMV/SV40	Amp/Neo	HA/myc
pCMV-Sport6	Addgene	CMV/SV40	Amp	/
pcDNA™4/TO	Life Technologies	CMV/SV40	Amp/Zeo	3xFlag
pTMBV4	Dualsystems Biotech	Cub-LexA-VP16	Kan/Leu	

Tabelle 11 Liste der verwendeten Inhibitoren.

Inhibitor	Verwendete Konzentration	Gelöst in	Hersteller
Caspase-8	20-50 μM	DMSO	Merck Millipore
z-VAD-FMK	50-100 μM	DMSO	Promega
Q-VD-OPh	450 nM	DMSO	Merck Millipore

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematischer Aufbau einer K_v7 -Kanal- α -Untereinheit.....	8
Abb. 2 Übersicht über Strukturen im C-Terminus von $K_v7.1$ und dessen Interaktionspartner..	10
Abb. 3 Die 5 Phasen des kardialen Aktionspotentials.....	11
Abb. 4 Einfluss der β -Untereinheiten auf $K_v7.1$ (KCNQ1).....	12
Abb. 5 Aufbau der Caspasen.....	15
Abb. 6 Aktivierung von Caspasen durch den extrinsischen- und intrinsischen Signalweg.....	15
Abb. 7. Gezeigt ist der extrinsische Signalweg der Apoptose.	17
Abb. 8 Dargestellt ist der intrinsische Signalweg der Apoptose.....	19
Abb. 9 Schematische Darstellung des Vektors pFrog. (Abbildung nach (Gunther <i>et al.</i> 1998)...	23
Abb. 10 Schematische Darstellung einer zweistufigen PCR:	24
Abb. 11 Analyse der Proteinsynthese von $K_v7.1$	36
Abb. 12 Nachweis der Proteinsynthese von endogenem $K_v7.1$	37
Abb. 13 Untersuchung der Proteinsynthese von $K_v7.1$ in verschiedenen Organen der Maus....	38
Abb. 14 Topologie verschiedener $K_v7.1$ Trunkationsmutanten.	39
Abb. 15 Expression der Trunkationsmutanten.....	39
Abb. 16 Schematische Darstellung der Deletionsmutanten zwischen Helix A und Helix B.....	40
Abb. 17 <i>Alanin</i> scan zur Identifizierung der zweiten Schnittstelle von $K_v7.1$	41
Abb. 18 $K_v7.1$ Sequenzvergleich von $K_v7.1$ in Mensch und Maus.....	42
Abb. 19 Fragmentierung von murinem $K_v7.1$	42
Abb. 20 Caspase-3 Schnittstelle.	43
Abb. 21 Einfluss der LQT-Mutation auf die Spaltung von $K_v7.1$	44
Abb. 22 Spaltung in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation.	45
Abb. 23 Elektrophysiologische Untersuchung von $K_v7.1$	46
Abb. 24 Einfluss von z-VAD-FMK auf die CTF2 Generierung.....	47
Abb. 25 Einfluss von Q-VD-OPh auf die Prozessierung von $K_v7.1$ in HeLa Zellen.....	48
Abb. 26 Einfluss von Staurosporin auf die Generierung des CTF2.....	49
Abb. 27 Proteolyse des C-Terminus von $K_v7.1$	50
Abb. 28 Inhibition der Proteolyse von $K_v7.1$ durch Caspase-8 Inhibitor.....	51
Abb. 29 siRNA gegen Caspase-3, -6, -8 und -9.	52
Abb. 30 Western Bot Analyse der Koexpression von $K_v7.1$ mit GFP und Caspase-3.....	53
Abb. 31 Einfluss von inaktiver Caspase-3 auf die Spaltung von $K_v7.1$. I.	54
Abb. 32 Arginin und Tryptophan Mutationen innerhalb der Caspase-3 Schnittstelle.....	55
Abb. 33 Caspase-3 Aktivierung mittels MG 132.	56
Abb. 34 Apoptose Induktion in HI-1 Zellen.....	57
Abb. 35 Einfluss von $K_v7.1$ auf Apoptose.	58
Abb. 36 Einfluss von $K_v7.1$ auf die Prozessierung von Caspase-3.....	59
Abb. 37 Einfluss der Kanalaktivität auf die Spaltung von $K_v7.1$	60
Abb. 38 Einfluss von Caspase-3 auf die Spaltung von $K_v7.1$	61
Abb. 39 Aortenstenose an Mäuseherzen.....	62
Abb. 40 Densitometrische Auswertung der künstlichen Aortenstenose.....	62
Abb. 41 Lokalisation des CTF1 innerhalb der Zelle.....	63
Abb. 42 Lokalisation des $K_v7.1$ C-Terminus..	64
Abb. 43 Fragmentierung des $K_v7.1$ -C-Terminus.....	65
Abb. 44 Lokalisation des CTF2 innerhalb der Zelle.....	66
Abb. 45 Auswertung der Genexpressionsanalyse.....	67
Abb. 46 Zelluläre Lokalisation von Diablo und $K_v7.1$	69
Abb. 47 Interaktion von Diablo und Diablo Δ NT mit $K_v7.1$	70
Abb. 48 Interaktion der $K_v7.1$ Trunkationsmutanten mit Diablo..	71
Abb. 49 Maturierung von Diablo.	71
Abb. 50 Densitometrische Auswertung der Diablo Maturierung.....	72
Abb. 51 Struktur der Breitspektrum Caspase Inhibitoren Q-VD-OPh und Z-VAD-FMK.....	76

Abb. 52 Dargestellt ist die Sequenz der Schnittstellen verschiedener Caspase.....	78
Abb. 53 K _v 7.1 Sequenzvergleich von K _v 7.1 in Mensch, Maus und Ratte.....	78
Abb. 54 Schematische Darstellung der Proteolyse von K _v 7.1 sowie die Interaktion mit Diablo.85	
Abb. 55 Schematische Darstellung der Funktion von Diablo mit und ohne CTF2 Interaktion. ..	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale ausgewählter Ionen.....	5
Tabelle 2: Verteilung der K _v 7 Kanäle in verschiedenen Geweben.....	7
Tabelle 3 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.	98
Tabelle 4 Liste der Puffer und Lösungen für den <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen</i>	98
Tabelle 5 Liste der verwendeten Kit.....	99
Tabelle 6 Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme.....	99
Tabelle 7 Liste der verwendeten Primärantikörper	100
Tabelle 8 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	100
Tabelle 9 Liste der verwendeten Plasmide.....	100
Tabelle 10 Liste der verwendeten Vektoren.....	101
Tabelle 11 Liste der verwendeten Inhibitoren.	101
Tabelle 12 Auswertung der Genexpressionsanalyse.....	108
Tabelle 13 Auswertung der Genexpressionsanalyse.....	110
Tabelle 14 Sequenzalignment der Aminosäuren im Bereich der zweiten Schnittstelle von K _v 7.1.....	112

Abkürzungen

[v/v]	<i>volume per volume</i>
[w/v]	<i>weight per volume</i>
%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Amper
Abb.	Abbildung
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AK	Antikörper
Apaf	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
CaM	<i>Calcium modulated protein</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
Casp.	Caspase
Caspase	<i>Cysteiny-Aspartate Specific Protease</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CoIP	Ko-Präzipitat
cRNA	capped RNA
CTF	C-terminale Fragment
Cub	C-terminales Ubiquitin Fragment
Cyt c	Cytochrom c
Da	Dalton
DABCO	Diazobicyclooctan
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DcR	Decoy Rezeptor
DD	<i>Death Domain</i>
ddH2O	doppelt deionisiertes Wasser

DED	<i>Death effector domain</i>
Diablo	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP's	Desoxynukleotidtriphosphate
DR	<i>Death Receptor</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ENDOG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alteri</i>
F	Farad
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	Fas-assoziierte Protein mit Todesdomäne
FAS-L	CD95 Ligand
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Gramm
g	Beschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	human
h	Stunde
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
His	Histidin
HRP	<i>Horse-Radish-Peroxidase</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAD	<i>Inhibitor of caspase-activated DNase</i>
ICE	<i>Interleukin Converting Enzyme</i>
IF	Immunfluoreszenz
IKK	IκB Kinase

IL	Interleukin
IP	Präzipitat
JLNS	Jervell- und Lange-Nielsen-Syndrom
k	Kilo
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LB	Lysogeny broth
Leu	Leucin
m	Milli
M	Molar
m	Minute
min	Minute
MinK	<i>Minimal potassium ion channel</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NRVCM	<i>Neonatal rat ventricular cardiomyocytes</i>
NTF	N-terminale Fragment
NubG	N-terminale Ubiquitin Fragment mit Glycin
NubI	N-terminale Ubiquitin Fragment mit Isoleucin
OD	Optische Dichte
p	Piko
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Proteinkinase C
POD	Peroxidase
rcf	<i>relative centrifugal force</i>

RIP	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RWS	Romano-Ward-Syndrom
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SID	<i>Subunit interaction domain</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMAC	Second Mitochondria-derived activator of caspases
Src	Tyrosinkinase
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tBid	<i>truncated Bid</i>
TBS(T)	<i>Tris buffered saline (+Tween 20)</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Trp	Tryptophan
U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
YPD-Medium	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
α-	anti
μ	Mikro
Ω	Ohm

Tabellen

Tabelle 12 Auswertung der Genexpressionsanalyse. Dargestellt sind die Gene mit einer gesteigerten Expression in den mit CTF2 transfizierten HEK293T Zellen.

Gen	Referenz	Beschreibung	Änderung
ALDH1L2	NR_027752.1	aldehyde dehydrogenase 1 family	10,64
INA	ENST00000369849	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	10,11
NEFM	ENST00000221166	neurofilament, medium polypeptide	9,55
SNAI2	ENST00000020945	snail homolog 2	8,88
FAM150A	ENST00000358543	family with sequence similarity 150	8,46
KCNT2	ENST00000294725	potassium channel, subfamily T	7,97
PCDH10	NM_032961.1	protocadherin 10	6,90
DDR2	ENST00000415555	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	6,83
SLC7A3	NM_032803.5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system)	6,33
SLC35F1	ENST00000360388	solute carrier family 35, member F1	5,72
HAS2	ENST00000303924	hyaluronan synthase 2	5,45
ZIC3	ENST00000287538	Zic family member 3	5,45
GABRE	ENST00000370325	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor	5,30
OLFM2	ENST00000264833	olfactomedin 2	4,97
CPS1	ENST00000518043	carbamoyl-phosphate synthase 1	4,75
B3GALT1	ENST00000305861	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase	4,63
FNDC1	ENST00000297267	fibronectin type III domain containing 1	4,54
ITGA4	ENST00000233573	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	4,47
FAM5C	ENST00000367462	family with sequence similarity 5, member C	4,29
ZNF22	ENST00000298299	zinc finger protein 22 (KOX 15)	4,20
KCNQ5	NM_001160130.1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5	4,08
SMARCA1	NM_139035.2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	3,93
BCHE	ENST00000264381	butyrylcholinesterase	3,82

GALNT13	ENST00000392825	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13	3,69
ZNF804A	ENST00000302277	zinc finger protein 804A	3,50
SERPINF1	ENST00000254722	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor)	3,44
TMSB15A	ENST00000289373	thymosin beta 15a	3,26
PTPRU	NM_133177.3	protein tyrosine phosphatase, receptor type U	3,24
FAM70A	NM_001104544.1	family with sequence similarity 70, member A	3,23
CLGN	NM_001130675.1	calmegin (CLGN), transcript variant 1	3,15
CYBRD1	NM_001127383.1	cytochrome b reductase 1	3,11
NAP1L3	ENST00000373079	nucleosome assembly protein 1-like 3	3,09
HTATIP2	NM_001098522.1	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	3,02
FHAD1	ENST00000358897	forkhead-associated (FHA) phosphopeptide binding domain 1	3,01
ITGA8	ENST00000378076	integrin, alpha 8	3,00
PXDN	ENST00000252804	peroxidasin homolog (Drosophila)	2,98
CRMP1	NM_001313.3	collapsin response mediator protein 1	2,98
FAM13C	NM_001143773.1	family with sequence similarity 13, member C	2,98
BAI3	ENST00000370598	brain-specific angiogenesis inhibitor 3	2,96
HHIP	ENST00000296575	hedgehog interacting protein	2,95
CFHR3	ENST00000471440	complement factor H-related 3	2,95
PLAGL1	NM_002656.3	pleiomorphic adenoma gene-like 1	2,95
CNTN1	NM_001256063.1	contactin 1	2,92
SLC16A2	ENST00000276033	solute carrier family 16, member 2	2,88
MAP7D2	NM_001168465.1	MAP7 domain containing 2	2,88
HCN2	ENST00000251287	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	2,87
EPDR1	NM_017549.4	ependymin related protein 1 (zebrafish)	2,84
HOXA6	ENST00000222728	homeobox A6	2,83
STXBP5L	ENST00000273666	syntaxin binding protein 5-like	2,79

Tabelle 13 Auswertung der Genexpressionsanalyse. Dargestellt sind die Gene mit einer verminderten Expression in den mit CTF2 transfizierten HEK293T Zellen.

Gen	Referenz	Beschreibung	Änderung
SLFN11	NM_001104588.1	schlafen family member 11	-18,21
IL13RA2	ENST00000243213	interleukin 13 receptor, alpha 2	-12,78
MLH1	ENST00000231790	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2	-9,25
BASP1	ENST00000322611	brain abundant, membrane attached signal protein 1	-8,98
KAL1	ENST00000262648	Kallmann syndrome 1 sequence	-8,32
ZNF681	ENST00000395385	zinc finger protein 681	-7,76
EPM2AIP1	ENST00000322716	EPM2A (laforin) interacting protein 1	-7,69
IFI16	ENST00000426592	interferon, gamma-inducible protein 16	-7,44
LCP1	ENST00000323076	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	-7,31
BMP2	ENST00000378827	bone morphogenetic protein 2	-6,20
ZNF253	ENST00000355650	zinc finger protein 253	-6,09
SLC35D2	ENST00000253270	solute carrier family 35, member D2	-5,94
GADD45B	ENST00000215631	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	-5,87
ZNF43	ENST00000354959	zinc finger protein 43	-5,78
VAMP8	NM_003761.4	vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin)	-5,42
CGA	NM_001252383.1	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	-5,34
HSPA1A	ENST00000375651	heat shock 70kDa protein 1A	-5,10
CCDC144A	ENST00000448331	coiled-coil domain containing 144A	-5,08
ENPEP	NM_001977.3	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	-5,04
FAM111B	NM_001142703.1	family with sequence similarity 111, member B	-4,88
ZNF331	ENST00000253144	zinc finger protein 331	-4,73
ZNF254	NM_203282.2	zinc finger protein 254	-4,71
SLCO1A2	NM_021094.3	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	-4,45
JAKMIP2	ENST00000507386	janus kinase and microtubule interacting protein 2	-4,43
PNPLA4	NM_001142389.1	patatin-like phospholipase domain containing 4	-4,35
MMP13	ENST00000260302	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	-4,34
TRIM49	ENST00000329758	tripartite motif containing 49	-4,18
ID1	NM_181353.2	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	-4,15
HSPA1A	ENST00000400040	heat shock 70kDa protein 1A	-4,10
CYP4X1	NM_178033.1	cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1	-4,08
PTGR1	ENST0000053896	prostaglandin reductase 1	-3,97

	2		
SEPP1	NM_001093726.1	selenoprotein P, plasma, 1	-3,89
HSPA1B	ENST0000037565 0	heat shock 70kDa protein 1B	-3,89
HSPA1A	ENST0000043006 5	heat shock 70kDa protein 1A	-3,89
ZNF506	NM_001099269.2	zinc finger protein 506	-3,88
HSPA1B	ENST0000054642 2	heat shock 70kDa protein 1B	-3,81
TNFRSF9	ENST0000037750 7	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	-3,79
STAC	ENST0000027318 3	SH3 and cysteine rich domain	-3,77
KRTAP19-5	NM_181611.1	keratin associated protein 19-5	-3,74
HIST1H2AE	ENST0000030391 0	histone cluster 1, H2ae	-3,73
ACTBL2	ENST0000042339 1	actin, beta-like 2	-3,62
MAL2	ENST0000053461 9	mal, T-cell differentiation protein 2	-3,61
SYT11	ENST0000036832 4	synaptotagmin XI	-3,59
CXCL10	ENST0000030660 2	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-3,48
ZNF93	ENST0000034376 9	zinc finger protein 93	-3,42
MMP12	ENST0000032622 7	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	-3,36
PCDH11X	NM_032968.3	protocadherin 11 X-linked	-3,21
DPYSL3	NM_001387.2	dihydropyrimidinase-like 3	-3,16
CDH8	ENST0000029934 5	cadherin 8, type 2	-3,15
POU6F2	NM_001166018.1	POU class 6 homeobox 2	-3,12
TRIM49L1	XM_001713681.2	tripartite motif containing 49-like 1 (TRIM49L1), mRNA.	-3,10

Tabelle 14 Sequenzalignment der Aminosäuren im Bereich der zweiten Schnittstelle von Kv7.1. Als Referenzsequenz wurde humanes Kv7.1 (NM_000218.2) verwendet. In rot ist die Asparaginsäure an Position 459 im humanen Kv7.1 dargestellt.

Art	Aminosäuresequenz																					
Homo sapiens	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	L	D	H	F	S	V	D	G
Chelonia mydas	Q	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	N	I	D	A
Rattus norvegicus	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	D	R	R	P	D	H	F	S	I	D	G
Heterocephalus glaber	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	G
Canis familiaris	H	I	T	C	E	P	V	S	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	N
Felis catus	H	I	T	C	E	P	V	S	-	-	E	K	R	R	P	D	H	F	S	V	D	T
Squalus acanthias	N	I	T	Y	D	H	V	V	D	K	D	D	R	K	F	E	N	S	N	I	D	G
Oryctolagus cuniculus	Q	I	T	C	E	P	-	P	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	P	V	D	S
Loxodonta africana	H	I	T	Y	D	P	V	G	-	-	D	D	R	R	A	D	R	L	S	L	D	G
Anolis carolinensis	Q	I	T	F	D	H	A	V	-	-	D	E	R	K	S	D	N	F	H	L	D	P
Chrysemys picta bellii	H	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	N	I	D	A
Pelodiscus sinensis	H	I	T	Y	D	H	V	V	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	S	I	D	A
Ovis aries	H	I	T	C	E	P	V	L	-	-	E	D	R	R	P	E	P	I	S	V	D	G
Mus musculus	H	I	T	Y	D	P	-	P	-	-	E	D	R	R	P	D	H	F	S	I	D	G
Sorex araneus	H	I	T	C	E	P	P	A	-	-	E	G	R	R	P	V	H	F	S	V	D	G
Dasyopus novemcinctus	H	I	T	C	E	P	A	P	-	-	E	E	R	R	P	D	H	A	S	L	D	G
Meleagris gallopavo	H	I	T	Y	D	H	V	T	-	-	D	D	K	K	P	D	-	F	C	F	D	T
Meleagris gallopavo	H	I	T	Y	D	H	V	T	-	-	D	D	K	K	P	D	-	F	C	F	D	T
Pantholops hodgsonii	H	I	T	C	E	P	V	L	-	-	X	D	R	R	P	E	P	V	S	V	D	G
Bos mutus	H	I	T	C	D	P	V	A	-	-	E	D	R	R	P	E	P	F	S	V	D	G
Vicugna pacos	H	I	T	C	D	L	A	S	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	G
Bos taurus	H	I	T	C	D	P	V	A	-	-	E	D	R	R	P	E	P	F	S	V	D	G
Pongo abelii	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	L	D	H	F	S	V	D	G
Pelodiscus sinensis	H	I	T	Y	D	H	V	V	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	S	I	D	A
Mus musculus	H	I	T	Y	D	P	-	P	-	-	E	D	R	R	P	D	H	F	S	I	D	G
Tursiops truncatus	H	I	T	C	D	P	T	S	-	-	E	E	R	R	P	E	H	F	S	V	D	G
Trichechus manatus latirostris	H	I	T	C	D	P	A	G	-	-	E	D	R	R	A	D	G	L	S	L	D	G
Papio anubis	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	L	D	H	F	S	V	D	G
Anolis carolinensis	Q	I	T	F	D	H	A	V	-	-	D	E	R	K	S	D	N	F	H	L	D	P
Camelus ferus	H	I	T	C	D	L	A	A	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	G
Gallus gallus	H	I	T	Y	D	H	V	T	-	-	D	D	K	K	P	D	-	F	C	F	D	T
Sarcophilus harrisii	H	I	T	Y	D	H	I	A	-	-	E	D	R	K	S	D	Q	F	A	M	D	G
Echinops telfairi	Q	I	T	C	D	A	A	C	-	-	E	E	R	R	P	D	H	S	A	L	D	G
Chrysemys picta bellii	H	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	N	I	D	A
Tupaia chinensis	H	I	T	C	-	-	X	X	-	-	X	X	R	K	P	D	H	F	S	V	D	G
Ochotona princeps	H	I	T	C	E	P	-	P	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	T	D	S
Alligator mississippiensis	H	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	S	I	D	A
Latimeria chalumnae	H	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	N	D	P	K	S	E	G	L	S	M	D	G
Cricetulus griseus	H	I	T	Y	D	P	-	P	-	-	E	D	R	R	P	D	H	F	S	I	D	G
Rattus norvegicus	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	D	R	R	P	D	H	F	S	I	D	G
Macaca mulatta	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	L	D	H	F	S	V	D	G

Mustela putorius furo	H	I	T	C	E	P	V	S	-	-	E	D	R	K	P	D	H	F	S	V	D	S
Heterocephalus glaber	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	G
Latimeria chalumnae	H	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	N	D	P	K	S	E	G	L	S	M	D	G
Canis familiaris	H	I	T	C	E	P	V	S	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	N
Alligator sinensis	H	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	S	I	D	A
Chrysemys picta bellii	H	I	T	Y	D	H	V	M	-	-	D	D	R	K	S	D	-	F	N	I	D	A
Pteropus alecto	H	I	T	C	D	H	V	P	-	-	D	E	Q	R	T	D	P	F	S	V	D	C
Chinchilla lanigera	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	G
Macaca mulatta	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	L	D	H	F	S	V	D	G
Heterocephalus glaber	H	I	T	C	D	P	-	P	-	-	E	E	R	R	P	D	H	F	S	V	D	G

Lebenslauf

Name: Christian Raab
Geburtsdatum: 08.07.1981
Geburtsort: Friedrichroda
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion August 2010 – Juli 2014

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

Thema: Charakterisierung der Caspase vermittelten Proteolyse des spannungsabhängigen Kaliumkanals K_v7.1

Studium Oktober 2005 – Juli 2010

Biochemie / Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Abschluss: Diplom

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Paul Saftig und Dr. Michael Schwake für die Möglichkeit der Promotion in dieser Arbeitsgruppe, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Roeder für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Mitarbeitern der AG Saftig, insbesondere Dr. Michelle Rothaug, Dr. Mirka Allerdin, Judith Peters und Friedrike Zünke danke ich für ihre Freundschaft und eine schöne Zeit im Labor und außerhalb. Ihr Mädels seid einfach spitze und es war eine super Zeit mit euch.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit und darüber hinaus.

Bastian danke ich ganz besonders für sein Verständnis, seine Unterstützung und die fantastischen letzten Jahre.

Eidesstattliche Erklärung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von August 2010 bis Juli 2014 am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. Paul Saftig am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Hiermit versichere ich an Eides statt,

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

Die Bestimmungen der Promotionsprüfungsordnung sind mir bekannt.

Kiel, 20. Juli 2014

Christian Raab