UNIVERSITÄT ULM

Abteilung Angewandte Physiologie
Abteilungsleiter:
Prof. Dr. Dr. h.c. F. Lehmann-Horn

Abteilung Neurologie
Abteilungsleiter:
Prof. Dr. A.C. Ludolph

Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus des neuen Antikonvulsivums Retigabin am KCNQ2 Kaliumkanal

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Thomas Volkmar Wuttke
geboren in München

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Lerche
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Tag der Promotion: 18.01.2007

Gewidmet meinen Eltern und meiner Freundin Judith

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1 EINLEITUNG 1

1.1 IONENKANÄLE 1

1.1.1 Spannungsgesteuerte Kationenkanäle: Struktur und Funktion 2

1.2 EPILEPSIE 7

1.2.1 Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe (BFNC) 9

1.2.2 Therapieresistenz in der Epileptologie 10

1.3 RETIGABIN 11

1.4 ZIELE 12

2 MATERIAL UND METHODEN 13

2.1 SUBSTANZEN 13

2.1.1 Chemikalien und Enzyme 13

2.1.2 Agarose Gelelektrophorese 13

2.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien 13

2.1.4 Bakterienstämme 14

2.1.5 Vektoren 14

2.1.6 cDNAs der verwendeten Kanäle 15

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 15

2.2.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden 15

2.2.2 Spezielle Molekularbiologische Methoden 27

2.3 XENOPUS LAEVIS OOZYTEN ALS EXPRESSIONSSYSTEM FÜR IONENKANÄLE 33

2.3.1 Oozytenpräparation 33

2.3.2 Mikroinjektion von cRNA in Oozyten 35

2.4 ELEKTROPHYSIOLOGIE 36

2.4.1 Zwei-Mikroelektroden-Spannungs-Klemme (TEVC) – Methodik 36

2.4.2 Aufbau des Meßstandes 37

2.4.3 Durchführung der Experimente 37

2.4.4 Protokolle und Datenauswertung 38

2.4.5 Statistik 40

2.5 COMPUTERGESTÜTZTE MODELLIERUNG DES KCNQ2 (KV7.2) KANALS 41

3 ERGEBNISSE 42

3.1 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNGSSTELLE VON RETIGABIN AM KCNQ2 (KV7.2) KANAL 42

3.1.1 Effekte von Retigabin auf die KCNQ1 (Kv7.1) und KCNQ2 (Kv7.2) WT Ionenkanäle 43

3.1.2 Analyse der KCNQ2/KCNQ1 (Kv7.2/Kv7.1) Chimären und Mutanten 44

3.1.3 Beeinflussung der Retigabin Sensitivität durch Punktmutationen im KCNQ2 (Kv7.2) Kanal 47

3.1.4 Einführen der Retigabin Bindungsstelle in KCNQ1 (Kv7.1) oder KCNQ1/KCNQ2 (Kv7.1/Kv7.2) Chimären 50

3.1.5 Modell für die Retigabin Bindung am KCNQ2 (Kv7.2) Kanal 52

3.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG EINER NEUEN KCNQ2 (KV7.2) MUTATION BEI NEONATALER EPILEPSIE (BFNC) 55

4 DISKUSSION 62

4.1 CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNGSSTELLE VON RETIGABIN AM KCNQ2 (KV7.2) IONENKANAL 62

4.1.1 Lokalisierung der Bindungsstelle 62

4.1.2 Biophysikalischer Mechanismus der Kanalaktivierung durch Retigabin 63

4.1.3 Das Retigabinmolekül wird nicht kooperativ gebunden 64

4.1.4 Kaliumkanalaktivierung als neuer antikonvulsiver Mechanismus 65

4.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG EINER NEUEN KCNQ2 (KV7.2) MUTATION BEI NEONATALER EPILEPSIE (BFNC) 66

4.2.1 Pathophysiologischer Mechanismus der Q2[E119G] Mutation 66

4.2.2 Die Q2[E119G] Mutation führt zum Verlust einer negativen Ladung 68

4.2.3 Die benachbarte Mutation Q2[S122L] führt zu weitgehend parallelen Veränderungen des Schaltverhaltens des KCNQ2 Kanals 68

4.2.4 Der Subschwellenbereich als relevanter Potentialbereich für den KCNQ2 Kanal 69

5 ZUSAMMENFASSUNG 70

6 LITERATURVERZEICHNIS 72

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS 80

DANKSAGUNG 81

LEBENSLAUF 82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	basepairs
BFNC	benigne familiäre neonatale Convulsionen
CAE	childhood absence epilepsy
CaM	Calmodulin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CACNA1H	Gen, das für den Cav3.2 T-Typ Calciumkanal kodiert
CHRN4A	Gen, das für die α-Untereinheit des neuronalen nikotinergen Acetylcholinrezeptor kodiert (ACHR4A)
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CLCN2	Chloridkanal 2
CHO	Chinese hamster ovary cells
CMV	Cytomegalie Virus
CNS	central nervous system
cRNA	complementary ribonucleic acid
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
Eag	ether a go-go spannungsgesteuerter Kaliumkanal (Kv10.1)
EDTA	ethylenediamine tetra-acetic acid
EEG	Elektroenzephalogramm
EGMA	Epilepsie mit Grand-Mal Anfällen beim Aufwachen
GABA	γ-amino Buttersäure
GABRA1	Gen, das für die α_1 Untereinheit des $GABA_A$ Rezeptor kodiert
GABRB2	Gen, das für die β_2Untereinheit des $GABA_A$ Rezeptor kodiert
GABRG2	Gen, das für die γ_2Untereinheit des $GABA_A$ Rezeptor kodiert
GEFS+	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen
H5	Kanalschleife, die den Selektivitätsfilter enthält
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfon-Säure

IGE	idiopathisch generalisierte Epilepsie
IKs	lansam verzögert gleichrichtender Kaliumkanal (slow delayed rectifier potassium current)
I_{max}	maximale Stromamplitude
IQ Motiv	Isoleucin- und Glutaminreiche Domäne
IsK	Kaliumkanal β-Untereinheit, siehe minK
JAE	juvenile Absenceepilepsie
JME	juvenile myoklonische Epilepsie
k	Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion
kB	Kilobasen
KCNQ1-5	humane spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
KCNQ1-5	Gene, die für die humanen KCNQ1-5 Kanäle kodieren
KcsA	bakterieller Kaliumkanal
Kir1-Kir7	einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle
Kv	spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
Kv7.1-sid_{Q3}	Kv7.1 Untereinheiten, die die C-terminale Interaktionsdomaine von Kv7.3 enthielten
KvAP	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
KvLQT1	KCNQ1 (siehe oben)
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LGI1	leucine-rich glioma inactivated Gen 1, das für ein Protein kodiert, das mit Kv1.1 Kanälen komplexiert
LQT	Long QT-Syndrom
MCS	multiple cloning site
M-current	Kaliumstrom, der durch muscarinische Acetylcholin Rezeptoren blockiert werden kann
minK	minimal potassium channel, Kaliumkanal β-Untereinheit
MRT	Magnetresonanztomogramm/ -graphie
MthK	calciumabhängiger bakterieller Kaliumkanal
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte

PC12 Zellen	Phäochromocytom-Zelllinie
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-loop	Porenschleife von Ionenkanälen
PS	Porenschleife von Ionenkanälen
Q1-5	KCNQ1-5 (siehe oben)
rpm	rounds per minute
RTG	Retigabin
RNA	ribonucleic acid
S1-S6	Transmembrandomänen in der α-Untereinheit von spannungsgesteuerten Ionenkanälen
SCG	superiores cervicales Ganglion
SCN1A	Gen, das für den Natriumkanal Nav1A kodiert
SCN1B	Gen, das für den Natriumkanal Nav1B kodiert
SCN2A	Gen, das für den Natriumkanal Nav2A kodiert
SDS	sodium dodecyl (lauryl) sulfate
SOB	salt optimized broth
SOC	= SOB + Glucose
TASK	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
TBS	tris buffered saline buffer
TEVC	two electrode voltage clamp
THIK	Kaliumkanal
Tm	Primer Schmelztemperatur
TMS	Transmembransegmente von Ionenkanälen
TRAAK	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
TREK	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
TWIK	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
UTR	untranslated region
V	voltage, Spannung
$V_{1/2}$	Spannung der halb-maximalen Aktivierung
WT	Wild-Typ
XE991	10,10-bis(4-Pyridinylmethyl)-9(10H)-Anthracenon
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind porenbildende Membranproteine, die einen spezifischen Ionenfluß getrieben von einem Konzentrationsgefälle ermöglichen. Sie sind elementarer Bestandteil des Organismus und als solcher an der Informationsweitergabe und Informationsverarbeitung beteiligt. Ohne sie wäre beispielsweise eine Muskelkontraktion oder die Weiterleitung eines Aktionspotentials in einem Nerven über eine weitere Distanz nicht denkbar. Ionenkanäle sind ubiquitär im Organismus in jeder Zelle vorhanden, wo sie unter anderem an der Homöostase, der Regulierung des Wasser-Elektrolythaushalts und des Ruhemembranpotentials beteiligt sind. Sie spielen in allen Organen eine lebenswichtige Rolle. So sind sie beispielsweise im Pankreas für die Regulierung der Insulinfreisetzung, in der Niere für die Kontrolle des Säure-Basen-Haushalts, im Herzmuskel für die Funktionalität des Reizleitungssystems und im Gehirn mit seiner immensen Anzahl an Neuronen und Synapsen für die Informationsverarbeitung und -weiterleitung von außerordentlicher Bedeutung. Während die Permeabilität einiger Ionenkanäle hoch selektiv für bestimmte Ionen (Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium) ist, leiten andere mehrere verschiedene Ionen. Manche werden durch das Membranpotential, andere durch Liganden oder durch physikalische bzw. chemische Stimuli (z.B. Temperatur, mechanische Kräfte, pH) gesteuert.

Bei einer so weiten Verbreitung im Organismus ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen in Ionenkanälen eine Vielzahl verschiedenster Erkrankungen wie z.B. Myopathien, Diabetes, Herzrhythmusstörungen, Mukoviszidose oder Epilepsien auslösen können. Erkrankungen, die infolge von Ionenkanalmutationen mit einer Über- oder Untererregbarkeit von Gewebe einhergehen, werden mittlerweile als Kanalkrankheiten oder international als „Channelopathies“ (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999; Ptacek, 1999; Cannon, 2000) bezeichnet und sind meist erblich bedingt.

1.1.1 Spannungsgesteuerte Kationenkanäle: Struktur und Funktion

Spannungsgesteuerte Kationenkanäle sind an der Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen und im Bereich von Synapsen an der Transmitterausschüttung beteiligt. Sie sind aus einer tetramerischen α-Untereinheit bestehend aus vier homologen Domänen zu je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) und fakultativ aus zusätzlichen kleineren β-, γ- oder δ-Untereinheiten aufgebaut. Während die α-Untereinheit den Hauptteil des Kanals mit Spannungssensor, Selektivitätsfilter und Pore bildet, kommen den kleineren Untereinheiten modifizierende Eigenschaften in Bezug auf Stromkinetik, Stromamplitude oder Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999; Catterall, 2000). Der Spannungssensor aller spannungsgesteuerten Kationenkanäle ist in den S4 Segmenten unter Beteiligung von jeweils vier bis acht positiv geladenen Aminosäuren (Bezanilla, 2000) lokalisiert und um die S5/S6 Segmente angeordnet. Diese wiederum beinhalten den Selektivitätsfilter und bilden zusammen mit der von ihnen flankierten Porenschleife die Porenregion. Bei Kaliumionenkanälen wird jede der vier Domänen von einem eigenen Gen, bei Natrium- und Kalziumkanälen dagegen die gesamte α-Untereinheit von nur einem Gen kodiert (MacKinnon, 1991; Catterall, 2000).

Es gibt drei Hauptkonformationszustände, in denen sich Ionenkanäle befinden können (geschlossen aktivierbar, offen aktiviert, inaktiviert und für Aktivierung refraktär). Während die geöffneten und geschlossenen Konformationen gemeinsame Merkmale aller spannungsgesteuerter Kanäle sind, werden ein oder mehrere Inaktivierungszustände nur von einigen bestimmten Kanälen durchlaufen. Im Ruhezustand, d.h. bei Ruhemembranpotential, befinden sich die Kanäle im geschlossenen aktivierbaren Zustand. Bei Depolarisation der Membran wird die Öffnung des Aktivierungstores durch den Spannungssensor initiiert und die Pore für den Ionenstrom freigegeben. Für eine Vielzahl von spannungsgesteuerten, aber auch ligandengesteuerten Kaliumkanälen wird hierfür ein gemeinsamer Mechanismus angenommen. Im geschlossenen Zustand liegen die inneren Helices (S5 und S6) der vier homologen Domänen, die die Pore umgebenden, in linearer Konformation vor und verschließen so die intrazelluläre Öffnung der Pore. Bei der Öffnung kommt es zu einer Beugung der S6 Segmente

nach außen, gefolgt von einer Konformationsänderung der S5 Segmente und somit zu einer Aufweitung des intrazellulären Durchmessers der Porenöffnung. Diese Konformationsänderung wird durch ein in vielen Kaliumkanälen konserviertes Glycin („gating hinge“, Gelenkstelle) im S6 Segment ermöglicht, indem es die Fähigkeit besitzt, Proteinketten in unterschiedlichem Winkel (dihedral angle) zu adaptieren und so einer Helix an dieser Stelle Flexibilität zu verleihen (Jiang et al., 2002). Bei weiter anhaltender Depolarisation gehen einige Ionenkanäle durch Schluss eines separaten und unabhängigen Inaktivierungstores in den inaktivierten für eine erneute Öffnung refraktären Zustand über. Eine erneute Aktivierung ist in diesem Falle erst nach sich anschließender Hyperpolarisation für eine definierte Zeitspanne mit Erholung von der Inaktivierung möglich. Durch Repolarisation schließt das Aktivierungstor, und der Kanal nimmt den geschlossenen aktivierbaren Zustand ein. Während Kalziumkanäle vorwiegend an der Regulierung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung beteiligt sind, generieren Natrium- und Kaliumkanälen das Aktionspotential.

1.1.1.1 Klassifikation der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle

Nach derzeitigem Kenntnisstand codiert das menschliche Genom für ca. 80 verschiedene Kaliumkanäle bzw. Kanaluntereinheiten (Hille, 2001). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen strukturellen Gruppen spannungsgesteuerter Kaliumkanäle. Die Einteilung erfolgt anhand der Anzahl an Domänen pro α-Untereinheit, Transmembransegmenten (TMS) pro Domäne und Porenschleifen (PS) pro Domäne (Gutman et al., 2003; Yellen, 2002).

Tabelle 1. Strukturelle Klassifikation der spannungsgesteuerten Kaliumionenkanal α-Untereinheiten.

Gruppe	Domänen	TMS	PS	Kanäle
I	4	2	1	• Kir1-Kir7 (einwärts gleichrichtend) • einige bakterielle Kanäle
II	2	4	2	• TWIK

				• TREK • TASK • TRAAK • THIK
III	4	6	1	• Kv: z.B. **Kv7.1-5 (KCNQ1-5)** • Eag • Kca
IV	2	8	2	werden in Hefe gefunden

TMS: Transmembransegmente; PS: Porenschleifen

1.1.1.2 KCNQ Kaliumionenkanäle

Zur Familie der KCNQ bzw. nach neuer Klassifikation Kv7 (Gutman et al., 2003) Ionenkanäle gehören bisher fünf Mitglieder (KCNQ1-5 bzw. Kv7.1-Kv7.5). Sie werden zu den spannungsgesteuerten Ionenkanälen gezählt. Jeder Kanal ist aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, wobei einerseits Homo-, andererseits durch Kombination von Q3 mit Q2, Q4 oder Q5 Untereinheiten in Analogie zu anderen Kv Kanälen wahrscheinlich Heterotetramere gebildet werden. Jede Untereinheit wiederum setzt sich aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), einer zwischen S5 und S6 gelegenen Porenschleife sowie einem intrazellulären N- und C-Terminus zusammen. Segment 4 enthält mehrere positiv geladene Aminosäuren (Arginine), die an der Bildung des Spannungssensors beteiligt sind. Dieser reagiert auf das Membranpotential und steuert somit Aktivierung und Deaktivierung der Kanäle. Die Porenschleife bildet zusammen mit den Segmenten 5 und 6 die Ionenpore und beinhaltet den aus den drei Aminosäuren GYG bestehenden Selektivitätsfilter, der dafür verantwortlich ist, dass die Kanäle selektiv nur für K^+ Ionen permeabel sind (Heginbotham et al, 1992). Als gemeinsames Charakteristikum der Mitglieder der KCNQ Familie ist der C-Terminus im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen elongiert und dient unter anderem der Interaktion zwischen KCNQ2 und KCNQ3 Untereinheiten (Maljevic et al., 2003; Schwake et al. 2003) bzw. der Formierung eines KCNQ1 Homotetramers (Schmitt et al., 2000). Darüber hinaus kann hier durch ein IQ Motiv (Isoleucin- und Gluaminreiche Domäne im C-Terminus) vermittelt ein Ca^{2+}-

Calmodulin-Komplex binden und so modulatorisch auf KCNQ2/3 Kanäle wirken (Gamper und Shapiro, 2003). Es handelt sich um bei Depolarisation der Zellmembran langsam aktivierende und bis auf KCNQ1 nicht inaktivierende Kanäle. Als Kaliumkanäle sind sie an der Regulation der Feuerungsrate im Subschwellenbereich durch Feinregulierung des Membranpotentials beteiligt. Die verschiedenen Mitglieder verfügen über unterschiedliche Expressionsmuster. KCNQ1 wird im Herzmuskel (Wang et al. 1996), in Lunge, Nieren, Leber, Innenohr sowie im Gastrointestinal-Trakt (Bleich und Warth, 2000) gefunden. KCNQ2 und KCNQ3 werden im Nervensystem, v.a. im Kleinhirnkortex, im Bereich des occipitalen, frontalen und temporalen Pols, in den Stammganglien (Striatum), in der Amygdala und im Hippocampus (Biervert et al., 1998; Schroeder et al., 1998; Tinel et al., 1998; Cooper et al., 2000) sowie in sympathischen Ganglienzellen des Ganglion cervicale superior (Wang et al., 1998) und in peripheren Nerven, exprimiert. KCNQ4 wird hauptsächlich in den äusseren Haarzellen des Innenohres und in den Haarzellen des Vestibularapparats (Kubisch et al. 1999; Kharkovets et al., 2000), KCNQ 5 im Skelettmuskel und ZNS (Lerche et al., 2000; Schröder et al., 2000) exprimiert. Bis auf KCNQ5 sind für alle Mitglieder der KCNQ Familie krankheitsauslösende Mutationen bekannt. Die Mutationen führen alle zu einer Reduktion der resultierenden Kaliumströme (Tabelle 2).

Tabelle 2. KCNQ Ionenkanalfamilie: Expressionsmuster und assoziierte Krankheiten.

Kanal	Chromosom	Expression in	Krankheit
KCNQ1	11	Herzmuskel, Lunge, Niere, Leber, Innenohr, GI-Trakt	Long QT Syndrom: Romano-Ward-Syndrom LQT1 (Wang et al., 1996) ; Long QT Syndrom und hereditäre Taubheit: Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom (Schmitt et al., 2000)
KCNQ2	20q13.3	ZNS, sympathische Ganglienzellen	BFNC (Singh et al., 1998; Biervert et al., 1998; Biervert und Steinlein,

			1999; Lerche et al., 1999)
KCNQ3	8q24	ZNS, sympathische Ganglienzellen	BFNC (Charlier et al.,1998; Hirose et al., 2000)
KCNQ4	1p34	Äussere Haarzellen des Innenohrs, Haarzellen des Vestibularapparats	Hereditäre Taubheit (Kubisch et al., 1999)
KCNQ5	6q14	Skelettmuskel, ZNS	

KCNQ: humane spannungsgesteuerte Kaliumkanäle; BFNC: benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe; ZNS: zentrales Nervensystem

1.1.1.3 M-Strom

Der sogenannte M-Strom wurde 1980 zuerst beschrieben (Brown und Adams, 1980). Sein molekulares Korrelat blieb allerdings bis Ende der 90er Jahre unbekannt. Es handelt sich um einen spannungsabhängigen langsam aktivierenden und nicht inaktivierenden Kaliumionenstrom, der im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet gefunden wird. Er lässt sich durch muskarinerge M1 Acetylcholinrezeptoragonisten (deshalb „M-Strom“) inhibieren (Brown und Adams, 1980) und wird selektiv durch Linopirdin (Aiken et al., 1995) und XE991 (Zaczek et al., 1998) blockiert (Brown and Yu, 2000; Marrion, 1997). 1998 gelang es Wang et al. anhand der kinetischen Eigenschaften, des Expressionsprofils sowie der Sensitivität der M-Kanäle gegenüber verschiedenen Substanzen heteromere KCNQ2/3 Kanäle als zumindest einen Teil des morphologischen Korrelats des M-Stroms zu bestimmen. Nach weiteren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass auch andere Kanäle der KCNQ Familie die oben genannten Eigenschaften teilen und somit auch die heteromeren KCNQ4/3 und KCNQ5/3 Kanäle Anteil an der Generierung des M-Stroms haben könnten (Selyanko et al., 2000; Kubisch et al., 1999; Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000). Der M-Strom ist als nicht inaktivierender Kaliumstrom an der Regulierung des Feuerungsverhaltens im Subschwellenbereich (Wang et al., 1998; Shapiro et al., 2000) und damit an der Regulierung der Erregbarkeit einer Vielzahl neuronaler Zellen (Brown und Adams, 1980; Jentsch, 2000) beteiligt. Eine Funktionseinschränkung bzw. Blockade dieses Stroms erhöht die Aktionspotential-Frequenz, während eine Aktivierung die Feuerungsrate erniedrigt (Delmas und

Brown, 2005). Dies wird in vivo dadurch bestätigt, dass Mutationen im KCNQ2 oder KCNQ3 Kanal, die eine Veränderung der Amplitude oder der Kinetik des M-Stroms bedingen, als Ursache für Myokymien und einen bestimmten Typ der Epilepsie (benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe) entdeckt wurden.

1.2 Epilepsie

Ein epileptischer Anfall entsteht durch eine plötzliche, zeitlich begrenzte (wenige Sekunden bis Minuten) Synchronisation und Rhythmisierung des Entladungsverhaltens eines Neuronenverbundes. Die Frequenz der Anfälle ist von Patient zu Patient sehr unterschiedlich und reicht von nur einem einzelnen Anfall im Leben bis zu mehreren 100 Anfällen pro Tag. Unter Epilepsie versteht man eine Erkrankung mit rezidivierenden, meist unprovozierten Anfällen. Hiervon müssen Gelegenheitsanfälle abgegrenzt werden, die im Rahmen akuter Geschehnisse wie z.B. entzündlicher, metabolischer oder traumatischer Erkrankungen, Intoxikationen oder Entzug (Alkohol, Drogen) auftreten. Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen mit einer kumulativen Lebenszeitinzidenz von 3 % (Hauser et al., 1996) und einer Prävalenz von 0.5-1 % in der Gesamtbevölkerung. Gemäß der derzeitig gültigen Klassifikation der epileptischen Syndrome und Epilepsien (International League against Epilepsy [ILAE], 1989) werden die Epilepsien einerseits in fokal oder generalisiert beginnende, andererseits in idiopathische, symptomatische oder kryptogene eingeteilt. Zu den symptomatischen Epilepsien zählt man solche, die aufgrund einer erkennbaren Läsion des Hirnparenchyms (z.B. in Form einer gliösen Narbe traumatischer oder infektiöser Natur, Hirntumor) oder von kortikalen Fehlbildungen entstehen und deren Phänomenologie (Semiologie) mit der Lokalisation des Defekts korreliert (z.B. vegetative, auditive, visuelle Auren, fokalmotorische Erscheinungen, Skotome, Paresen). Die kryptogenen Epilepsien (Epilepsien, denen wahrscheinlich fokale Läsionen oder kortikale Fehlbildungen zugrunde liegen, deren morphologisches Korrelat sich aber mit den derzeit zur Verfügung stehenden bildgebenden Verfahren nicht nachweisen lässt) gehen im Zuge immer modernerer MRT Geräte mit besserer Auflösung zunehmend in den symptomatischen Formen auf. Unter den idiopathischen Epilepsien werden

Formen verstanden, die nicht durch eine Läsion hervorgerufen werden. Ihre Ursache ist auf genetischer Ebene zu suchen, bei wenigen Epilepsieformen sogar in Form eines monogenen Erbgangs. Somit konnten für einige der idiopathischen Epilepsieformen bereits einzelne Genmutationen ausfindig gemacht werden. Die betroffenen Gene kodieren überwiegend für liganden- oder spannungsgesteuerte Ionenkanäle, deren Funktion in Folge der Mutation verändert ist und somit zur Veränderung der neuronalen Erregbarkeit führt. Diese Epilepsieformen treten gehäuft bereits im Säuglings-, Kindes-, oder Jugendalter auf und können im weiteren Verlauf auch wieder sistieren.

Tabelle 3. Bekannte Gene, die bei idiopathischen Epilepsien Mutationen aufweisen.

Betroffenes Gen	Chromosomale Lokalisation	Erkrankung
CHRN4A (ACHR4A) (nikotinerger Acetylcholinrezeptor)l	20q13.2-q13.3	Autosomal dominante Epilepsie mit nächtlichen Frontallappenanfällen
KCNQ2, KCNQ3 (Kaliumkanäle)	20q13.3, 8q24	Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe
SCN2A1 (Natriumkanal)	2q24	Benigne familiäre Anfälle des Neugeborenen/Kindes
SCN1A, SCN1B, SCN2A (Natriumkanäle)	2q24.3, 19q13.1, 2q24	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+), Dravet-Syndrom
GABRG2 ($GABA_A$ Rezeptor γ2)	5q31.1-q33.1	GEFS+
GABRA1 ($GABA_A$ Rezeptor α1)	5q34-q35	Juvenile myoklonische Epilepsie (JME) Kindliche Absence Epilepsie (CAE)
LGI1 (leucine-rich glioma-inactivated 1)	10q24	Autosomal dominante laterale Temporallappenepilepsie

CLCN2 (Chloridkanal)	3q27-q28	Idiopathisch generalisierte Epilepsien CAE, JAE, JME, EGMA
CACNA1H (Kalziumkanal)	16p13.3	Kindliche Absence Epilepsie (CAE)

GEFS+: generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus; JME: juvenile myoklonische Epilepsie; CAE: kindliche Absence Epilepsie; JAE: juvenile Absence Epilepsie; EGMA: Epilepsie mit Grand-Mal Anfällen beim Aufwachen

1.2.1 Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe (BFNC)

Die autosomal dominant vererbten benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (Inzidenz ca. 1:100000) gehören zu den idiopathischen fokalen Epilepsien. Sie treten in den ersten Lebenstagen des Neugeborenen in Form unprovozierter Anfälle mit unterschiedlicher Semiologie und häufig in Clustern auf, und sie sistieren spontan nach einigen Wochen bis Monaten. Die Prognose ist gut, jedoch kann es in 15 % der Fälle später im Leben zu einem erneuten Auftreten von Anfällen kommen. Die Entwicklung der Kinder, das interiktuale EEG und die neurologische Untersuchung fallen meist normal aus. In den vergangenen Jahren konnten mehrere Mutationen im Gen des KCNQ2 (Singh et al., 1998; Biervert et al., 1998; Biervert und Steinlein, 1999; Lerche et al., 1999) und des KCNQ3 Kanals (Charlier et al. 1998; Hirose et al., 2000) als Ursache für dieses seltene epileptische Syndrom identifiziert werden (Abbildung.1 gibt einen Überblick über die meisten derzeit bekannten Mutationen). Hierbei ist auffällig, dass diese Mutationen in zwei Regionen der Kanäle, in der Porenschleife und im C-Terminus, gebündelt auftreten. In beiden Fällen resultiert eine Reduktion der Stromamplitude, die im Falle der Porenmutationen durch eine Verminderung der Einzelkanalleitfähigkeit erklärt werden könnte. Mutationen im C-Terminus führen dagegen vermutlich zu einer Störung der Tetramerisierung und infolge zu einer verminderten Dichte funktioneller Kanäle in der Membran (Schwake et al., 2000).

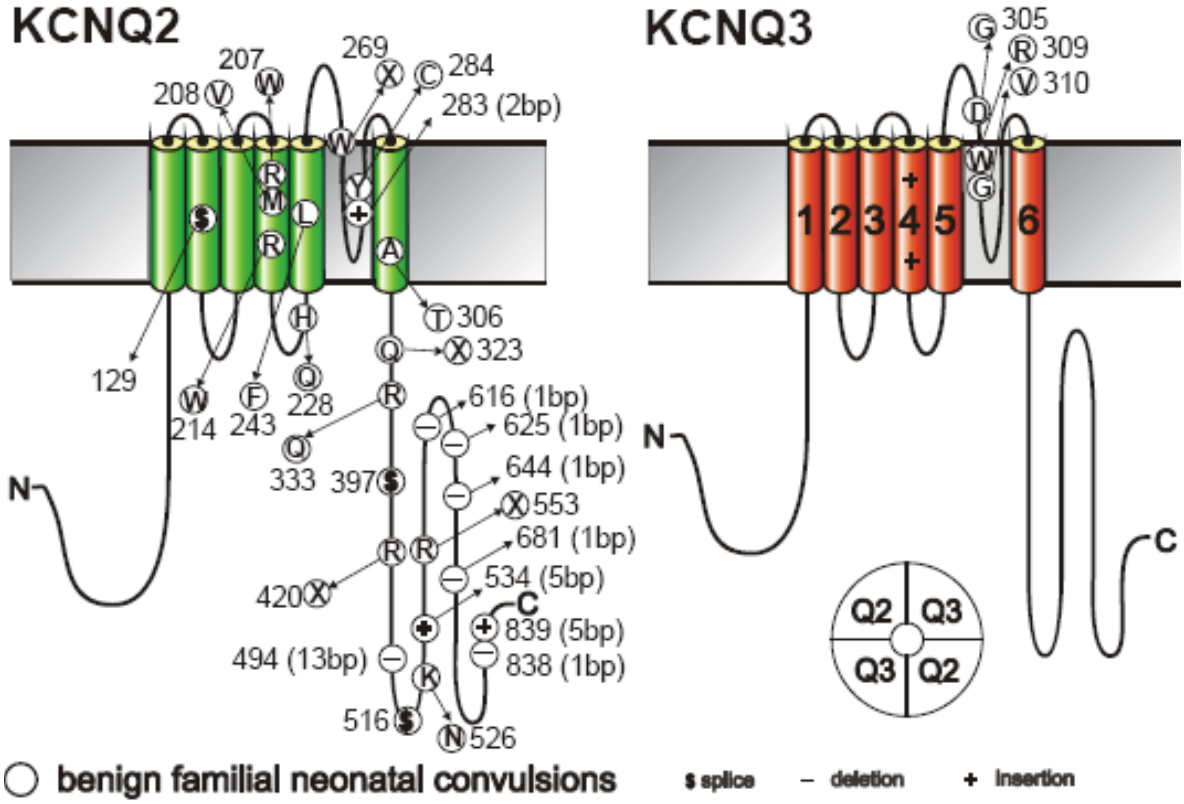

Abbildung 1. Benigne familiäre Neugeborenenkonvulsionen (BFNC) auslösende Mutationen in den KCNQ2/KCNQ3 Untereinheiten.

1.2.2 Therapieresistenz in der Epileptologie

Die pharmakologische Wirksamkeit der bisher in der Behandlung von Epilepsiepatienten Anwendung findenden Medikamente wird überwiegend durch Blockade von Natrium– und Kalziumkanälen, durch GABAerge Inhibition (durch Bindung der Substanzen an den $GABA_A$-Rezeptor oder durch Erhöhung der endogenen GABA-Konzentration im ZNS) oder durch Inhibierung von NMDA oder AMPA/Kainat Rezeptoren vermittelt. Obwohl 60 bis 80 % aller Patienten mit Epilepsie gut auf eine antikonvulsive Therapie ansprechen, bleiben etwa 30 % pharmakoresistent (Löscher, 1998). Darin liegt die Notwendigkeit begründet, neue Antikonvulsiva zu entwickeln. Diesen sollten nach Möglichkeit neue Wirkmechanismen zugrunde liegen, die sich von denen der aktuell in klinischem Gebrauch befindenden Medikamente unterscheiden, um die Möglichkeiten bei der Mono- und Polytherapie vielfältiger gestalten zu können.

1.3 Retigabin

Retigabin (RTG; $C_{16}H_{18}FN_3O_2$; 303,3 g/mol) wurde während der klinischen Evaluation von Flupirtin entdeckt. Hierbei fanden sich zwei Derivate (D-20443 und D-23129), deren Aktivität höher war, als die von Flupirtin selbst. 1993 wurde daher die klinische Testung von Flupirtin zugunsten von D-23129 (Retigabin) eingestellt. Retigabin zählt zu einer völlig neuen Klasse potentiell antikonvulsiver Substanzen, und seine Wirksamkeit konnte in einer Vielzahl von in vitro und in vivo Epilepsie- und Anfallsmodellen gezeigt werden. Diese umfassen sowohl elektrisch (Tober et al., 1996) als auch chemisch ausgelöste Anfälle wie z.B durch niedrige Magnesium- (Armand et al., 2000; Dost und Rundfeldt, 2000) bzw. Kalziumionenkonzentrationen (Dost und Rundfeldt, 2000) bei Ableitungen in hippocampalen Hirnschnitten, durch 4-Aminopyridin (4-AP) in entorhinalen kortikalen hippocampalen Schnitten der Ratte (Armand et al., 1999) oder durch Pentylentetrazol, Picrotoxin und NMDA (Rostock et al., 1996). Weiterhin konnte die Wirksamkeit von Retigabin im Amygdala-kindling Model (Tober et al., 1996) sowie in DBA/2 Mäusen (Rostock et al., 1996) demonstriert werden. In zwei Modellen war Retigabin sogar die einzige Substanz, die eine Übererregbarkeit in konzentrationsabhängiger Weise antagonisieren konnte (Armand et. al., 1999, 2000). Darüber hinaus konnte die Wirksamkeit von Retigabin auch in menschlichen Hirnschnitten, die in epilepsiechirurgischen Eingriffen bei pharmakoresistenten Patienten gewonnen wurden, nachgewiesen werden (Straub et al., 2001). Im Rahmen der Aufklärung des Wirkmechanismus konnte gezeigt werden, dass Retigabin einen Kaliumionenstrom in kortikalen Neuronen sowie in mit NGF (nerve growth factor) stimulierten PC12 (Phäochromozytom Zelllinie) Zellen jedoch nicht in undifferenzierten PC12 Zellen oder in Glia aktiviert (Rundfeldt, 1999). Etwas später konnte in CHO Zellen demonstriert werden, dass bereits niedrige Konzentrationen Retigabin (0.1 µM) KCNQ2/KCNQ3 Kanäle aktivieren (Rundfeldt und Netzer, 2000). Der hauptsächliche Wirkmechanismus von Retigabin ist somit die Aktivierung des M-Stroms (Main et al., 2000; Rundfeldt und Netzer, 2000; Wickenden et al., 2000; Tatulian et al., 2001; Wang et al., 1998). Keines der sich aktuell in klinischem Gebrauch befindenden Antikonvulsiva verfügt über einen vergleichbaren Wirkmechanismus. In späteren Experimenten

konnten über M-Strom vermittelte Wirkungen hinausgehende Effekte von Retigabin nachgewiesen werden, darunter eine Verstärkung der GABAergen Inhibition (Otto et al., 2002) oder in höheren Konzentrationen (100 µM) ein unspezifischer inhibitorischer Effekt auf Na^+ and Ca^{++} Kanäle sowie auf Kainat induzierte Ströme. Retigabin wurde in Phase II Studien bereits klinisch erprobt, Phase III Studien sind in Planung.

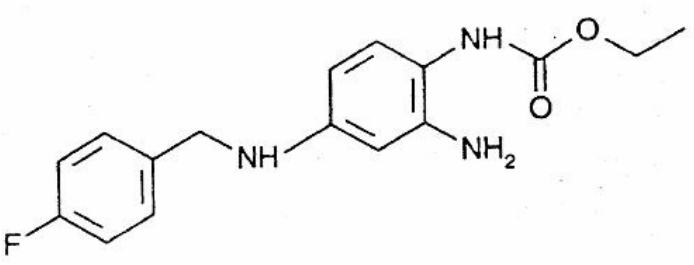

Abbildung 2. Strukturformel von Retigabin.

1.4 Ziele

Die Ziele dieser Arbeit sind, (i) die Bindungsstelle von Retigabin in KCNQ2 Kanälen zu identifizieren und dadurch den molekularen Mechanismus der Kanalaktivierung durch Retigabin aufzuklären. Hierzu werden Mutationen und Chimären zwischen dem Retigabin-sensitiven KCNQ2 und dem Retigabin-insensitiven KCNQ1 Kanal erzeugt und somit systematisch verschiedene Aminosäuresequenzen zwischen den Kanälen ausgetauscht. Die Auswirkungen auf die Bindung von Retigabin werden mittels heterologer Expression der Mutationen/Chimären in Xenopus Oozyten und anschließender elektrophysiologischer Charakterisierung untersucht.

Des weiteren soll (ii) eine neue Mutation Q2[E119G] (E119G) bei benignen familiären Neugeborenenkrämpfen (BFNC) heterolog in Xenopus Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch funktionell charakterisiert werden. Der Aminosäureaustausch liegt in einer bisher nicht durch Mutationen betroffenen Region des KCNQ2 Kanals, der extrazellulären S1-S2 Schleife, und führt zum Verlust einer negativen Ladung in diesem Bereich.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Substanzen

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Zur Herstellung von Lösungen wurden sofern nicht anders angegeben Chemikalien der Herstellerfirmen Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Diesenhofen, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), USB (Ohio, USA), Biorad (Hercules, USA), Riedel de Haen (Seelzen, Deutschland) verwendet. Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), New England Biolabs (Beverly, MA, USA) und Pharmacia (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bezogen. Oligonukleotide wurden von Thermohybaid (Ulm, Deutschland) hergestellt.

2.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Zum Abfotografieren von Gelen wurden ImageMater VDS sowie Thermal VDS Filme (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verwendet.

2.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

DEPC Wasser: 0.1% DEPC
DNA Ladepuffer: 30% (v/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0.25% Bromphenolblau, 0.1% SDS
Frosch Ringer: 115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, Einstellung des pHs auf 7.4 mit NaOH, Osmolalität 240 mosmol
OR2: 82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, Einstellen des pHs auf 7.6 mit NaOH
Retigabin stock Lösungen (1000-fach konzentriert): Lösung von Retigabin Pulver in Dimethyl Sulfoxid.

Retigabin Pefusionslösung: Verdünnung der Stock Lösung in Frosch Ringer (die maximale Dimethyl Sulfoxid Konzentration lag bei max. 1%)
LB Agar: 1.5% Agar in LB Medium
LB Medium (Luria-Bertani Medium): 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto Hefe Extrakt, 10 g/l NaCl, Einstellung des pHs auf 7.0 mit 5 N NaOH
Mini Präparation – Lösung A: 50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA
Mini Präparation – Lösung B: 8.8 ml H_2O, 1 ml 10% SDS, 200 µl 10 M NaOH
Mini Präparation – Lösung C: 60 ml 5 M Kaliumacetat, 11.5 ml Eisessig, auf 100 ml H_2O aufgefüllt
SOB: 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl2 und 10 mM MgSO4 in LB-Medium
SOC: 20 mM Glukose in SOB
TBE: 45 mM Tris-Borsäure , 1 mM EDTA, pH 8.0

2.1.4 Bakterienstämme

Es wurden die folgenden modifizierten E. coli K12 Klone verwendet:
DH5α (Invitrogen): F^-, ø80dlacZDM15, D(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk^-, mk^+), phoA, supE44, l^-, thi-1, gyrA96, relA1
XL1-Blue (Stratagene): recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 suppE44 relA1 lac [F´proAB $laqI^qZ\Delta M15$ Tn10 (Tet^r)]^c;
Top10F' (Invitrogen): F´{$lacI^q$, Tn10(Tet^R)} mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.1.5 Vektoren

Es wurden folgende zwei Expressionsvektoren für Xenopus laevis Oozyten verwendet:

pTLN: Dieser Vektor wurde vom pSP64 Vektor abgeleitet (Krieg und Melton, 1984). Es wurden Veränderungen in der multiple cloning site vorgenommen und dabei 3' und 5' nicht translatierte Regionen (UTR) des Xenopus laevis β-Globins sowie eine Restriktionsstelle zur Vektorlinearisierung nach der 3'-UTR (Lorenz et al., 1996) eingefügt. Er beinhaltet einen T7 Promotor.

pSGEM: Dieser Vektor wurde vom pGEMHE Vektor (Liman et al., 1992) abgeleitet. Neben einem T7 und einem SP6 Promotor beinhaltet er 3' und 5' UTRs des Xenopus laevis β-Globins sowie einen Polylinker, der von der multiple cloning site des pBluescript Vektors abgeleitet wurde. Upstream des SP6 Promotors befinden sich vier Restriktionsstellen, die zur Vektorlinearisierung verwendet werden können. Dieser Vektor wurde 1994 von Dr. Michael Hollmann (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, Deutschland) hergestellt und uns freundlicherweise von Dr. Christian Lerche (Aventis Pharma, jetzt Sanofi-Synthelabo, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 cDNAs der verwendeten Kanäle

Wir verwendeten humane Klone von KCNQ1 (von Dr. Christian Lerche zur Verfügung gestellt) sowie von KCNQ2 und KCNQ3 (von Prof. Dr. Thomas Jentsch zur Verfügung gestellt). Die GenBank™ Zugangsnummern für die Sequenzen der genannten Klone lauten wie folgt: hKCNQ1, AJ006345; hKCNQ2, NM004518.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation von Plasmid DNA in Bakterien

Bei der Arbeit mit kompetenten bakteriellen Zellen und Transformation wurden ausschließlich autoklavierte, sterile Materialien und Reagenzien verwendet. Bakterienkulturen wurden in einem Inkubator (Certhomath, B Brown Biotech International, Allentown, PA, USA) bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Agarplatten wurden bei 37°C inkubiert (Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland).

2.2.1.1.1 Präparation kompetenter E.coli Zellen

Kompetente Zellen wurden mit der $CaCl_2$ Methode (Sambrook, 1989) hergestellt. Wir legten Übernachtkulturen in 2 ml LB Medium an. Diese wurden in 50 ml LB Medium überführt und für weitere 2-3 h inkubiert bis eine OD (bei 600 nm bestimmt) von 0.6 - 0.7 erreicht wurde. Die Kulturen wurden daraufhin auf Eis platziert, zentrifugiert und das Pellet auf Eis mit $CaCl_2$ behandelt. Nach einer Stunde wurde erneut zentrifugiert und anschließend das Pellet in 100 mM $CaCl_2$ sowie 50% Glycerol in einem Mischungsvehältnis von 3:1 resuspendiert. 200 µl der Suspension wurden in Mikrozentrifugen Gefäßen aliquotiert und bei -80°C tief gefroren.

2.2.1.1.2 Hitze Schock

Kompetente bakterielle Zellen wurden mit der Hitze Schock Methode transformiert. Hierzu wurde ein 200 µl Aliquot kompetenter Zellen von -80°C aufgetaut und 2 µl gelöster Plasmid DNA (50 µg/ml) bzw. 10-20 µl eines Ligationsmixes hinzupipettiert. Die Zellen wurden behutsam gemischt und für 30 Minuten auf Eis aufbewahrt bevor sie für 50-60 s in einem Wasserbad bei 42°C inkubiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis überführt wurden. Nachdem 800 µl LB oder SOC Medium hinzugefügt wurden, erfolgte ein erneuter Inkubationsschritt bei 37°C in einem Schüttelinkubator für eine Stunde, so dass die Bakterien Antibiotikaresistenz Marker ausbilden konnten. 200 µl des Gesamtvolumens wurden auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB Agar Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Herangewachsene Kolonien wurden abgenommen und in das entsprechende Antibiotikum enthaltende LB Medium umgeimpft. Hieraus führten wir die Plasmidisolation mittels Mini-, Midi- oder Maxi Präparationen durch (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.2 Isolation von Plasmid DNA

In Abhängigkeit von der benötigten Menge und Reinheit der Plasmid DNA nutzten wir Mini-, Midi- oder Maxi Präparationen zur Plasmidisolation.

Wir verwendeten isolierte Plasmid DNA von Mini Präparationen für Sequenzierungen und Restriktionsanalysen, von Midi Präparationen zur Durchführung von Mutagenese sowie für die in vitro Transkription in cRNA und von Maxi Präparationen für Transfektionen. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde jeweils photometrisch und gelelektrophoretisch überprüft.

2.2.1.2.1 Mini Präparation

Um Plasmid DNA aufzureinigen und zu isolieren führten wir Mini Präparationen basierend auf der alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von einer pH Neutralisierung des Lysats mit einer Azetat Lösung, durch.
Hierzu verwendeten wir entweder selbsthergestellte Lösungen und Puffer (siehe 2.1.3) oder den GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosiences). In einem ersten Schritt wurde eine einzelne Kolonie von der Agar Platte abgenommen und eine Übernachtkultur in 3 ml LB Medium, das das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielt (Ampicillin 100 µg/ml, Neomycin 20 µg/ml), angelegt. Nachdem die Kultur für 12-14 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert worden war, wurden 1.5 ml in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 6 Minuten bei 7000 rpm (Mikrozentrifuge A14, Jouan, France) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl der Lösung A durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde frisch hergestellte Lösung B (Lysepuffer) hinzugefügt und die Suspension durch mehrmaliges Umdrehen des Gefäßes gemischt und schließlich bei Raumtemperatur für 1-2 Minuten inkubiert. Durch den Lysepuffer werden genomische DNA und Proteine denaturiert. Längere Inkubationszeiten sollten vermieden werden, um einer DNA Fragmentierung vorzubeugen. Zur Neutralisation wurden schließlich 150 µl der Lösung C hinzugefügt, durch mehrmaliges Umdrehen des Gefäßes gemischt und für 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm (Zentrifuge CR3, Jouan, France) erneut zentrifugiert. Es schlossen sich eine Präzipitation des Überstandes mit Ethanol sowie ein Waschschritt der präzipitierten DNA mit 70% Ethanol an. Das Pellet wurde nun bei Raumtemperatur für einige Minuten getrocknet und in 50 µl RNAse Wasser (20 µg/ml) gelöst. Um die RNAse Aktivität zu optimieren, inkubierten wir die Suspension für 30 Minuten bei 37°C.

Der GFX Micro Plasmid Prep Kit wurde gemäß der Instruktionen des Herstellers verwendet. Nach der Suspension einer Kolonie in einem RNAse beinhaltenden Puffer, der Lyse und der Neutralisation folgte in diesem Falle die Adsorption der DNA an einer Glasfiber Matrix und ein anschließender Reinigungsschritt mit dem Neutralisationspuffer. Um verbliebene Salze und andere Verunreinigungen auszuwaschen, wurde mit einem ethanolhaltigen Puffer nachgespült. Die an der Glasfiber Matrix adsorbierte DNA wurde durch Zentrifugieren getrocknet und anschließend mit 50-100 µl destilliertem Wasser eluiert.

2.2.1.2.2 Midi Präparation

Midi Präparationen zur Aufreinigung und Isolierung von Plasmid DNA wurden mit dem Jet Star Kit (Genomed, Löhne, Deutschland) gemäß der Herstellerinstruktionen durchgeführt. Hierzu wurde eine einzelne Kolonie in 3-5 ml LB Medium suspendiert, für 4 Stunden in einem Schüttler bei 37°C inkubiert sowie anschließend in 50 ml LB Medium überführt und über Nacht für 12-14 Stunden bei 225 rpm und 37°C geschüttelt. Zum Anlegen von Glyzerol Stocks wurden 500 µl dieser Kultur zu gleichem Anteil mit 50% Glyzerol gemischt. Der verbleibende Rest wurde in 50 ml Falcons übertragen und für 6 Minuten bei 7000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mittels der Lösungen des Kits alkalisch lysiert sowie die DNA nach Adsorption an den mitgelieferten Säulen gereinigt und eluiert. Die im Eluat enthaltene DNA wurde mit Isopropanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 50-100 µl destilliertem Wasser gelöst.

2.2.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren

2.2.1.3.1 DNA Präzipitation

Die DNA Präzipitation wurde dazu verwendet, um DNA zu konzentrieren und die Salzkonzentration zu verringern. Bei dieser Methode wurde die gelöste DNA mit 5M NH_4Ac (1/10 des Volumens) sowie 100% Ethanol (2.5 X des Volumens) gemischt und bei -20°C für mindestens 15 Minuten inkubiert, bevor ein 20 minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und 4°C folgte. Das DNA Pellet

wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einer angemessenen Menge Wasser gelöst.

2.2.1.3.2 RNA Präzipitation

Ähnlich wie bei der DNA Präzipitation wurde gelöste RNA mit 5M NH_4Ac (1/10 des Volumens) und Isopropylalkohol (1 X des Volumens) gemischt. Die Probe wurde für mindestens 15 Minuten bei -20^oC inkubiert, um die Ausfällung zu verbessern. Es schloss sich eine 15 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4^oC an. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und 70% (DEPC)Ethanol hinzugefügt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und die RNA in 15-25 µl DEPC H_2O (siehe 2.1.3) gelöst.

2.2.1.3.3 Phenol/Chlorophorm Extraktion

Die Phenol/Chlorophorm Extraktion dient der sorgfältigen Reinigung der DNA bzw. RNA von Proteinen.
DNA- oder RNA Lösung wurde mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1) gemischt, gefolgt von Vortexen und Zentrifugation für 2 Minuten bei 14000 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nun wurde eine equivalente Menge an Chloroform hinzugegeben, erneut für 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß übertragen, um das verbliebene Phenol zu entfernen. Dieser Überstand wurde dann für die Präzipitation verwendet.

2.2.1.3.4 DNA Aufreinigung von Agarose Gelen und Enzymreaktionen

Um PCR Produkte oder Restriktionsfragmente von Lösungen und Agarose Gel Banden aufzureinigen, verwendeten wir einen Pharmacia GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Die Aufreinigung von DNA und das Entfernen von Salzen, Nukleotiden, Oligonukleotiden und Agarose wurden hierbei durch chaotrope Salze ermöglicht, die Proteine denaturieren und Agarose auflösen. Der DNA Doppelstrang wird durch Wasserstoffbrückenbindungen und

nicht durch hydrophobe Bindungen zusammengehalten und wird somit nicht beeinträchtigt. Des Weiteren sättigen die Kationen des chaotropen Salzes negative Ladungen einer Fiberglas Matrix ab und ermöglicht so die Bindung der Doppelstrang DNA. Proteine und Salze können somit ausgewaschen werden und die gereinigte DNA in 30-50 µl destilliertem Wasser eluiert werden. Wir verwendeten die so aufgereinigte DNA unter anderem für PCR Reaktionen und Restriktionsanalysen.

2.2.1.4 Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1.4.1 Quantitative und qualitative photometrische Analyse

Neben der Gelelektrophorese benutzten wir die Photometrie, um die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren zu bestimmen. Hierzu wurde die Extinktion A_{260} bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmt und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes aus der gemessenen Extinktion sowie des bekannten Extinktionskoeffizentens berechnet. Hieraus ließ sich ableiten, dass die optische Dichte A_{260}=1 einer Konzentration von 40 µg/ml Einzelstrang RNA bzw. 50 µg/ml Doppelstrang DNA entspricht, so dass sich die Berechnung auf folgende Formeln vereinfachen ließ:

Für RNA: A_{260} X Verdünnungsfaktor X 40=µg/ml RNA
Für DNA: A_{260} X Verdünnungsfaktor X 50=µg/ml DNA

Durch Berechnung des Koeffizienten aus A_{260} und A_{280} (weist auf Proteine in der Lösung hin) ließ sich die Reinheit der Proben abschätzen. A_{260} /A_{280} sollte hierbei zwischen 1.6 und 2.0 liegen.

2.2.1.4.2 Enzymreaktionen

Wir verwendeten Restriktionsenzyme (Endonukleasen vom Typ 2) der Firmen MBI, NEB oder Pharmacia. Die Verdaus wurden mit den gemäß der Herstellerangaben empfohlenen Puffern und Temperaturen (meist 37°C) in

Wasser (Gesamtvolumen von 20-70 µl) angesetzt und durchgeführt. Für Restriktionsanalysen wurden die Proben für 30-60 Minuten, für präparative Restriktionen 2-4 Stunden und im Falle von PCR Produkten mit 4-10 Basenpaaren Überhang für 3-6 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Enzyme hitzeinaktiviert oder mit Hilfe des GFX PC DNA und Gel Purification Kits (siehe 2.2.1.3.4) entfernt und die verdaute DNA auf ein Agarosegel (siehe unten, 2.2.1.4.3) aufgetragen.

2.2.1.4.3 Agarosegel Elektrophorese von DNA

Wie mit der Photometrie kann auch mit der Agarosegel Elektrophorese (Sambrook et al., 1989) die Reinheit und Konzentration der DNA abgeschätzt werden, sie ermöglicht aber auch ein Auftrennen von DNA Fragmenten nach ihrer Anzahl an Basenpaaren.

Zur Herstellung der Gele wurde Agarose (Menge je nach gewünschter Konzentration des Gels) in TBE Puffer (siehe 2.1.3) kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Um die DNA Banden nach Durchführung der Elektrophorese im UV Licht sichtbar machen zu können, fügten wir nach Abkühlen des Gels auf 60°C 0.1 µg/ml Ethidiumbromid hinzu. Anschließend wurde das Gel in eine horizontale Kammer (Peglab, Erlangen, Deutschland) gegossen. Ein Kamm hielt dabei die zum Laden der DNA benötigten Taschen frei und wurde nach Aushärten des Gels vorsichtig entfernt. Um sicherzustellen, dass die DNA beim Laden in die Geltaschen einsinkt, wurde jede Probe mit 1/5 des Gesamtvolumens Ladepuffer (siehe 2.1.3) vermischt. Die Größe der DNA Fragmente konnte anhand eines zeitgleich mit den Proben aufgetragenen kb Markers abgeschätzt werden. Die Konzentration des Gels (0.7%-2.0%), die angelegte Spannung (80-140 mV) sowie die Dauer der Elektrophorese hing von der Größe der aufzutrennenden Fragmente ab. Niedrig konzentrierte Gele wurden aufgrund der geringeren elektrophoretischen Beweglichkeit großer Fragmente für Fragmente >3 kb, höher konzentrierte Gele zur Auftrennung kleinerer Fragmente verwendet. Das zu Beginn beigemischte Ethidiumbromid interkaliert bei der Wanderung der Fragmente durch das Gel in die DNA und ermöglicht somit eine Sichtbarmachung sowie Fotodokumentation (Transluminator ImageMaster VDS (siehe 2.1.2)) der DNA Banden im UV Licht.

2.2.1.4.4 Agarosegel Elektrophorese von RNA

Die Gelelektrophorese von RNA erlaubt es, die Konzentration und Reinheit der RNA abzuschätzen. Um die RNA vor Degradation durch ubiquitär vorhandene RNAsen zu schützen, bedarf es einer 30 minütigen Vorbehandlung der Gelkammer mit 3% H_2O_2 sowie der Verwendung eines frisch hergestellten TBE Puffers und Gels. Ethidiumbromid wurde entsprechend den Angaben für die Gelelektrophorese von DNA (siehe 2.2.1.4.3) hinzugefügt. Es wurde 1 µl RNA mit 9 µl DEPC Wasser und 2 µl RNA Ladepuffer (im Ambion mMessage mMachine Kit (siehe 2.2.1.6) enthalten) gemischt und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Wir ließen die Gele für 1 Stunde bei 60-90 mV laufen und photodokumentierten die Banden im UV Licht.

2.2.1.4.5 Sequenzieren von DNA

DNA Sequenzierungen wurden entweder von GATC (Konstanz, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland) oder von uns selbst durchgeführt.
Für auswärtige Sequenzierungen verdünnten wir die Proben gemäß der Empfehlungen der Firmen. Die benötigten Primer wurden von uns zur Verfügung gestellt.
Sequenzierungen im Hause wurden unter Verwendung des BigDye Terminator Ready Reaction Kit sowie des ABI Prism 310 Genetic Analyzer (beide von Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach der Dideoxy Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Bei dieser Technik kommt es durch Verwendung jeweils einer von vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten - zu einer der vier Basen analogen – 2',3'-dideoxy Base zu einem kontrolliertem Abbruch der Synthese des DNA Komplementärstranges. Auf diese Weise entstehen DNA Fragmente unterschiedlicher Länge, die auf einem hochauflösendem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung nach Anregung mit einem Argonionen Laser spektroskopisch detektiert werden können.
Für die Sequenzierungs PCR (T3 Thermocycler, Biometra, Goettingen, Deutschland) verwendeten wir Midiprep DNA als Template sowie 20-30

Basenpaare lange Primer mit einer Schmelztemperatur von 55-60°C und einem Guanin oder Cytosin am 3' Ende.

PCR Ansatz:

Primer (3 pM/µl)	1 µl
BigDye Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
DNA Template	300-500 ng
ddH_2O	up to 20 µl

PCR Protokoll:

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
	Erste Denaturierung	96°C	45 Sekunden
25	Denaturierung Annealing Extension	96°C 50°C 60°C	15 Sekunden 10 Sekunden 4 Minuten

Bei Guanin/Cytosin reichen Sequenzen fügten wir dem Ansatz 5% DMSO zu und verlängerten den ersten Denaturierungsschritt von 45 Sekunden auf 5 Minuten.
Zur Aufreinigung der PCR Produkte verwendeten wir den auf der Gelfiltrationschromatographie beruhenden Qiagen DveEx Spin Kit (Hilden, Germany) gemäß der Herstellerinstruktionen. Hierzu wurden die PCR Produkte auf Säulen geladen und mittels Zentrifugation das synthetisierte PCR Produkt von Nukleotiden getrennt, die in den Poren der Filtermatrix hängen blieben. In einem zweiten Schritt wurde die eluierte DNA für 2 Minuten bei 95°C inkubiert, um die Sekundärstruktur aufzubrechen. Die Sequenzierung der so behandelten DNA erfolgte im Anschluß mit dem ABI Prism 310 Sequenzierer. Die Sequenzen

wurden mittels spezieller Software zur Auswertung von Sequenzierungen (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert.

2.2.1.5 Modifikation von DNA

2.2.1.5.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1987 von Mullis und Faloona entwickelt. Sie dient der Verfvielfältigung und zielgerichteten (site-directed) Mutagenese von Doppelstrang DNA. PCR Reaktionen wurden von uns mit dem T3 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Deutschland) wie in der Tabelle (siehe 2.2.1.4.5) dargestellt durchgeführt. Bei dieser Methode wurden drei Reaktionsschritte, bestehend aus der Trennung der Doppelstrang DNA in die zwei Einzelstränge (Denaturierung), Bindung der Primer an die Einzelstrang DNA (Annealing) sowie Anlagerung der Nukleotide (Elongation), zyklisch wiederholt. Zur Denaturierung der Doppelstrang DNA in ihre beiden Einzelstränge wurde der PCR Mix für einige Sekunden auf 95-98°C aufgeheizt und somit im nächsten Schritt die Bindung der Primer an das DNA Template ermöglicht. Primer wurden hierbei dem Mix in großem Überschuss beigefügt, um eine möglichst effiziente Bindung herbeizuführen. Abkühlen der Reaktion auf die Annealingtemperatur der Primer (Berechnung siehe weiter unten im Text) für wenige Sekunden führte schließlich zu deren Anlagern an die Einzelstränge (Annealing). Es schloss sich ein erneutes Aufheizen der Proben auf die optimale Arbeitstemperatur (68°C bzw. 72°C) der im Mix enthaltenen thermostabilen Polymerase (Taq oder Pfu) für einige Minuten (genaue Dauer in Abhängigkeit der Länge der zu vervielfältigenden DNA) an, die schließlich am 3’ Ende der Primer beginnend die komplementären DNA Stränge synthetisierte (Elongation).

Neben der Vervielfältigung von Doppelstrang DNA kann die PCR auch zur Einführung von Punktmutationen in der DNA oder sogar zum Einfügen kurzer nicht komplementärer Sequenzen in der Mitte oder am 5’ Ende des Primers verwendet werden. Um eine spezifische Bindung des Primers zu ermöglichen, sollte der zur Template DNA komplementäre Anteil des Primers aber mindestens 12 bp betragen.

Bei der Berechnung der Schmelztemperatur T_m von Primern muss einerseits deren Länge und andererseits deren Guanin/Cytosin Gehalt beachtet werden. Aufgrund der dreifachen Wasserstoffbrückenbindung zwischen Guanin und Cytosin im Gegensatz zur Doppelbindung zwischen Adenin und Thymin steigt die Schmelztemperatur mit dem GC Gehalt der Primer an.

Die Schmelztemperatur T_m von Primern kleiner als 20 bp lässt sich wie folgt berechnen:

$$T_m[°C]=2(N_A+N_T)+4(N_G+N_C)$$

Zur Erstellung von Primern verwendeten wir die DNA Star Computersoftware (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA), durch die T_m automatisch berechnet wurde.

Berechnung der Annealingtemperatur für die Durchführung der PCR Reaktion:

Annealingtemperatur= T_m (des Primers mit dem höheren Wert) – 5°C

Sowie die Pfu (Stratagene, Stratagene, La jolla, CA, USA) als auch die Taq (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) Polymerase synthetisieren mit einer Geschwindigkeit von 0.5 kb pro Minute. Bei der Vervielfältigung Guanin- und Cytosinreicher Sequenzen wurden dem PCR Mix 5% Glyzerol oder 5% DMSO beigefügt.

2.2.1.5.2 Dephosphorylierung von Vektor DNA

Dephosphorylierte DNA Enden können nicht ligiert werden. Dadurch verhindert die Dephosphorylierung von DNA auch eine intramolekulare Selbstligation von Vektorfragmenten.
Im Anschluss an eine Restriktionsreaktion wurde das dabei entstandene Vektorfragment mit dem Pharmacia GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit (siehe 2.2.1.3.4.) aufgereinigt und die DNA mit 50 µl eluiert. Danach inkubierten wir die aufgereinigte DNA mit 1 Einheit Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)

und 5 µl Dephosphorylierungs Puffer bei 37°C. Nach 30 Minuten wurde dem Mix 1 weitere Einheit CIAP hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug erneut 30 Minuten, bevor das Enzym durch Erhitzen des Mixes für 15 Minuten auf 85°C inaktiviert und das gesamte Volumen nochmals mit dem GFX Purification Kit aufgereinigt wurde. Die dephosphorylierte DNA wurde mit 25-30 µl eluiert.

2.2.1.5.3 Ligation von DNA Fragmenten

Diese Methode dient dazu, um zwei oder drei durch Restriktion mit Endonukleasen entstandene DNA Fragmente wieder miteinander zu verbinden und in einen Vektor einzufügen. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass die Enden der zu ligierenden Fragmente durch Auswahl entsprechender Restriktionsenzyme jeweils kompatibel zueinander sind. Somit lässt sich auch die Reihenfolge und Orientierung, in der beispielsweise drei Fragmente ligiert werden, festlegen. Wir inkubierten ca. 200 ng dephosphoryliertes Vektor Fragment in 10-fach molarem Überschuß mit den zu ligierenden Fragmenten, Ligase Puffer ($MgCl_2$, DTT und ATP) und T4 DNA Ligase Enzym. Das Gesamtvolumen von 10 - 30 µl wurde über Nacht bei entweder 4°C, 16°C oder Raumtemperatur (hauptsächlich bei blunt-end Fragmenten) inkubiert und anschließend mit Hitze Schock (siehe 2.2.1.1.2) transformiert. Um zu verhindern, dass nichttransformierte Bakterien nach dem Ausplattieren auf den Agarnährböden (mit Selektionsantibiotikum versehen) Kolonien ausbilden, enthielten die verwendeten Vektoren ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen.

2.2.1.5.4 Linearisierung von Plasmid DNA zur cRNA-Synthese

Um DNA mittels in-vitro Transkription in RNA umschreiben zu können, ist es notwendig, die Plasmid DNA vorher zu linearisieren. Hierzu wurde das Plasmid downstream der zu transkribierenden Sequenz mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Entfiele dieser Schritt, so käme es zu einer über die gewünschte Sequenz hinausgehender RNA Synthese. Linearisierungen wurden in einem Gesamtvolumen von 40 µl durchgeführt. Wir setzten 10 µg Plasmid DNA ein und inkubierten den Restriktionsansatz mit Mlu I für KCNQ2 und Chimären, die ebenso

im pTLN Vektor vorlagen bzw. Nhe I im Falle von KCNQ1 und Chimären, die im pSGEM Vektor ligiert wurden. Die so linearisierte DNA wurde mit Phenol/Chlorophorm (siehe 2.2.1.3.3.) extrahiert sowie mit NH_4-Azetat und 100% Ethanol gefällt (siehe 2.2.1.3.1.). Die DNA wurde für einige Minuten getrocknet und schließlich in 12 µl DEPC Wasser (siehe 2.1.3) gelöst. Um sicher zu gehen, dass die gesamte DNA linearisiert wurde, analysierten wir 2 µl auf dem Agarosegel (siehe 2.2.1.4.3).

2.2.1.6 cRNA-Synthese

Bei der Synthese von cRNA mittels in-vitro Transkripton verwendeten wir den SP6 oder T7 mMessage TM mRNA Machine Kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA) gemäß der Herstellerinstruktionen. Zur Vermeidung der Degradation der synthetisierten RNA durch ubiquitär vorhandene RNAsen verwendeten wir stets DEPC Wasser (siehe 2.1.3). Enzyme und der Ribonukleotid Mix wurden auf Eis aufbewahrt. Wir inkubierten 1 µg linearisierter Plasmid DNA zusammen mit 2µl Transkriptionspuffer, 10µl Ribonukleotidmix und 2 µl Enzymmix in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37°C. Um die DNA zu entfernen, fügten wir dem Ansatz nach 2 Stunden 1 µl RNAse-freie DNAse Typ I (2 U/µl) bei und setzten die Inkubation für 15 Minuten bei 37°C fort. Die synthetisierte RNA wurde mit der Phenol/Chloroform Methode (siehe 2.2.1.3.3.) extrahiert, mit Isopropanol präzipitiert (siehe 2.2.1.3.2.) und mit 70% Ethanol gewaschen. Schließlich ließen wir die RNA für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur trocknen und lösten sie in 15-25 µl DEPC Wasser. Reinheit und Konzentration wurden auf dem Agarosegel (siehe 2.2.1.4.4) abgeschätzt und gegebenenfalls elektrophotometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.4.1).

2.2.2 Spezielle Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Einführung von Punktmutationen in DNA

Punktmutationen in DNA wurden PCR basiert erzeugt. In Abhängigkeit der Entfernung der zu mutierenden Aminosäure von einer Schnittstelle konnte die

Mutation durch nur eine PCR Reaktion erzeugt werden bzw. bedurfte es einer Overlap PCR Strategie bestehend aus drei PCR Reaktionen. In beiden Fällen kommen neben Wildtypprimern Mutageneseprimer zum Einsatz, die neben der einzuführenden Punktmutation zusätzliche stille Mutationen enthielten, die keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hatten, aber eine zusätzliche Restriktionsstelle einführten. Diese erleichterte es später, Klone zu finden, die positiv für die gewünschte Mutation waren.

Sollte die Mutation in unmittelbarer Nähe einer Restriktionsschnittstelle erzeugt werden, setzten wir eine PCR Reaktion unter Verwendung eines Wildtypprimers und eines Primers an, der sowohl die Mutation als auch die unmittelbar benachbarte Schnittstelle enthielt. Der Wildtypprimer wurde dabei so gewählt, dass er sich hinter einer Schnittstelle an der Template DNA anlagerte. Beide Schnittstellen durften jeweils nur einmal im gesamten Plasmid vorhanden sein. Das PCR Produkt wurde auf einem Agarosegel elktrophoretisch getrennt (siehe 2.2.1.4.3), aus dem Gel aufgereinigt (siehe 2.2.1.3.4) und schließlich mit den entsprechenden zwei Restriktionsenzymen verdaut (siehe 2.2.1.4.2).

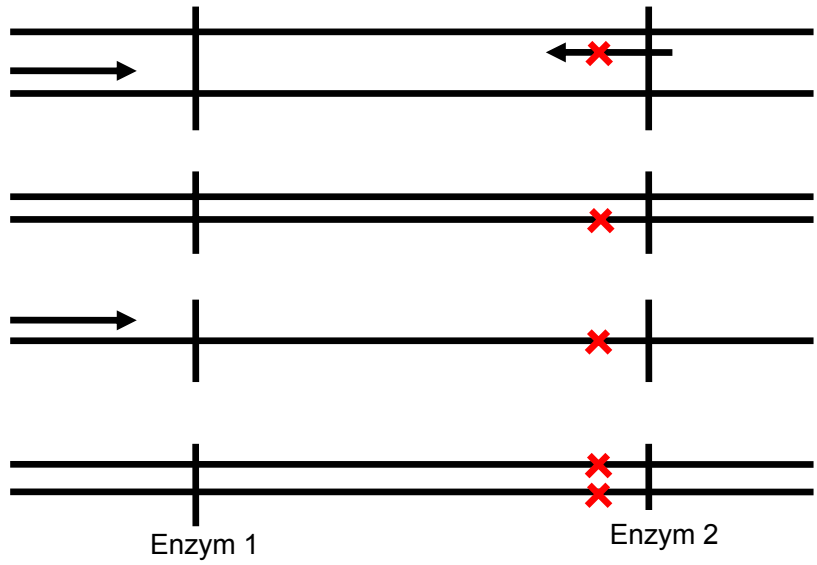

Abbildung 3. Einführung einer Punktmutation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Eine in unmittelbarer Nähe zu einer unikalen Restriktionsstelle gelegene Punktmutation wird durch einen Mutageneseprimer eingeführt. Das entstandene PCR Produkt wird an beiden Enden jeweils mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (als vertikale Linien dargestellt) geschnitten. Das die Wildtyp DNA enthaltene Plasmid wird mit den gleichen Enzymen verdaut, so dass es mit dem erzeugten PCR Produkt ligiert werden kann.

Sollte die Mutation zwischen zwei Restriktionsstellen in weiterer Entfernung beider eingeführt werden, benutzten wir eine Overlap PCR Strategie. Hierbei setzten wir vorerst zwei PCR Reaktionen mit jeweils einem Wildtypprimer und einem Mutatgeneseprimer an, wobei die beiden Mutageneseprimer komplementär aufgebaut waren. Die Wildttypprimer wurden so gewählt, dass sie sich jeweils hinter einer unikalen Restriktionsstelle an der Template DNA anlagerten. Diese Schnittstellen wurden im weiteren Verlauf zur Insertion des endgültigen PCR Produktes in das gewünschte Plasmid benötigt. Beide PCR Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die eingesetzten Mutageneseprimer komplementär aufgebaut waren, überlappten sich beide PCR Produkte im Bereich der Mutation mit 20-25 bp und konnten somit als Template für die dritte PCR Reaktion dienen. Bei dieser wurden jeweils 1-5 µl der beiden eluierten PCR Produkte und die bei den beiden bereits durchgeführten PCRs verwendeten Wildtypprimer eingesetzt. Das PCR Produkt 3 wurde ebenfalls auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Diese wurden ebenfalls verwendet, um den Vektor zu schneiden und für die Insertion des PCR Produktes 3 vorzubereiten. In einigen fällen schloss sich hier eine Dephosphorylierungs Reaktion (siehe 2.2.1.5.2) an. Falls keine unikalen Restriktionsstellen vorhanden waren, führten wir eine Dreipunkt Ligation durch. Die Fragmente des verdauten PCR Produkts und der Vektor wurden zur Konzentrationskontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen, bevor die Ligation (siehe 2.2.1.5.3) angesetzt und transformiert (siehe 2.2.1.1.2) wurde. Aus den herangewachsenen Kolonien reinigten wir dann mit Minipreps (siehe 2.2.1.2.1) Plasmid DNA auf und testeten diese auf die eingeführte stille Restriktionsstelle und somit auch auf die eingeführte Punktmutation. Positive Klone wurden zur Bestätigung der Mutation und zur Kontrolle der übrigen Sequenz im Bereich der PCR sequenziert (siehe 2.2.1.4.5).

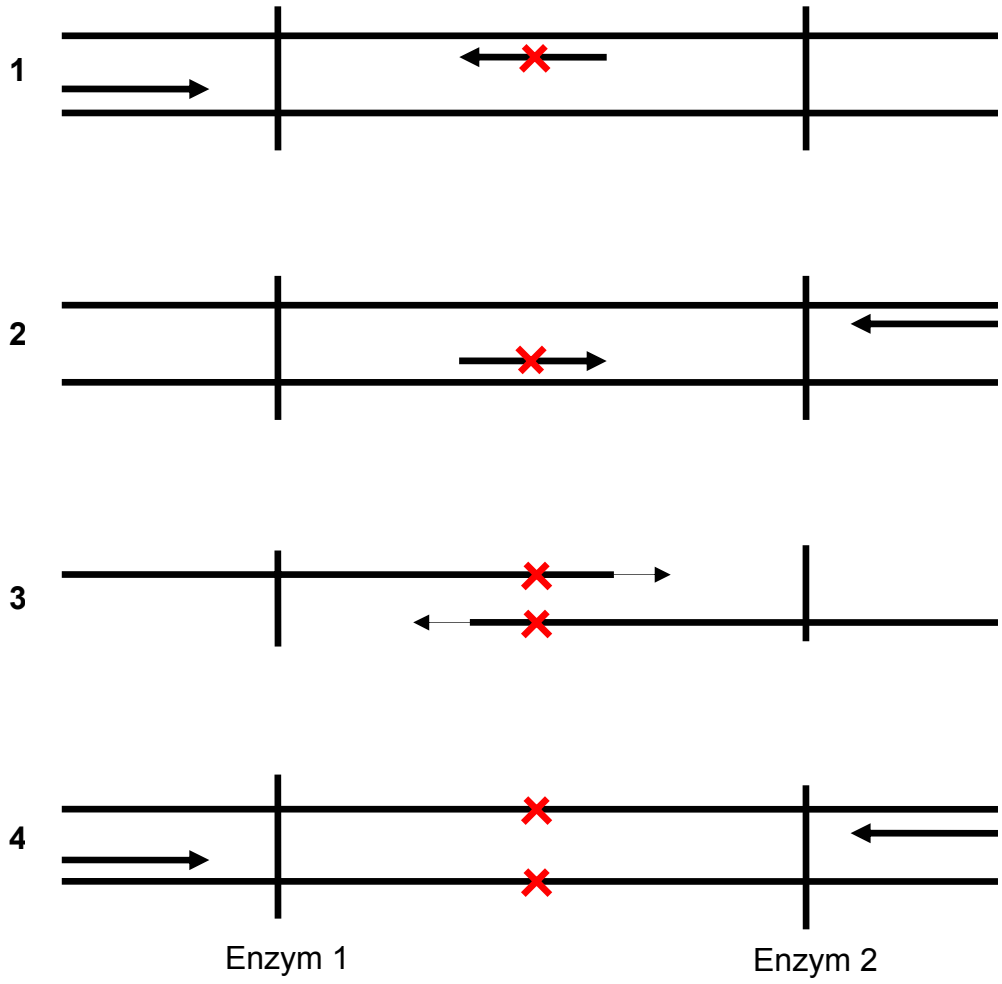

Abbildung 4. Einführung einer Punktmutation mittels Overlap Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Vorerst werden zwei PCR Reaktionen unter Verwendung von zwei komplementären Mutageneseprimern und zwei Wildtypprimern, die vor zwei unikalen Restriktionsschnittstellen (als vertikale Linien dargestellt) positioniert werden, durchgeführt (1 und 2). In der PCR 3 werden die beiden Produkte aus den ersten Reaktionen zusammen mit den Wildtypprimern eingesetzt. Da die Mutageneseprimer komplementär konstruiert werden, überlappen sich die beiden Produkte, können aneinander binden und somit als Template dienen (3). Das entstehende PCR Produkt wird nun unter Mitwirkung der Wildtypprimer vervielfältigt (4).

2.2.2.2 Konstruktion von Ionenkanal Chimären

Werden analoge Sequenzen zwischen verwandten Proteinen ausgetauscht, so erhält man Chimären. Im Rahmen dieser Arbeit wurden korrespondierende Sequenzen zwischen dem KCNQ1 und dem KCNQ2 Kaliumionenkanal ausgetauscht. Die Konstruktion von Chimären erfolgte auf cDNA Ebene. Hierbei kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Bei der ersteren wurden PCR basiert Mutationen in beiden Kanälen eingefügt, die keinen Aminosäurenaustausch (silent mutations) zur Folge hatten, sondern unikale Restriktionsstellen vor und hinter der auszutauschenden Sequenz erzeugten. Insgesamt wurden so eine Sac I Stelle am zytoplasmatischen Ende von S5 (Glu/Leu, 231/232 in KCNQ2), eine Xho I Stelle im Membrananteil von S5 (Ala/Ser/Phe 246/247/248 in KCNQ2), eine Nsi I Stelle am Beginn von H5 (Asp/Ala/Leu 266/267/268 in KCNQ2), eine Kpn I Stelle am Ende von H5 (Lys/Tyr/Pro 283/284/285 in KCNQ2) sowie eine BamH I Stelle im Bereich des zytoplasmatischen Ende von S6 (Gly/Ser 313/314 in KCNQ2) und jeweils an korrespondierenden Positionen in KCNQ1 eingefügt. Durch Restriktion und Ligation konnten so gewünschte Sequenzen ausgetauscht werden.

Zum Austausch von S1/S2, S3/S4 and S4/S4-S5 wendeten wir eine Multistep PCR ähnlich der Overlap PCR an, da in diesen Bereichen keine passenden Restriktionsstellen vorhanden waren bzw. eingeführt werden konnten. Wir führten zunächst zwei PCR Reaktionen mit komplementären chimärischen Primern, zwei Wildtypprimern sowie KCNQ1 und KCNQ2 DNA als Template durch. Die verwendeten Primer waren zur Hälfte (20-25 bp) zum Ursprungskanal und zur Hälfte zur einzuführenden Sequenz des anderen Kanals komplementär. Beide Anteile hatten etwa die gleiche Schmelztemperatur. In der PCR 1 wurde so der Anteil des Empfängerkanals vor der auszutauschenden Sequenz, in der PCR 2 der Anteil hinter der auszutauschenden Sequenz amplifiziert. In der dritten PCR wurde die einzufügende Sequenz vervielfältigt. In der PCR 4 setzten wir die Produkte aus den Reaktionen 1 und 3 zusammen mit dem entsprechenden Wildtypprimer und chimärischen Primer ein. Da chimärische Primer verwendet wurden, konnten sich die zwei Ausgangsprodukte aneinander anlagern und als Template dienen. Wir erhielten ein Produkt, das aus der einzuführenden Sequenz und dem dieser vorangehenden Anteil des Empfängerkanals zusammengesetzt

war. In der PCR 5 diente dieses Produkt zusammen mit dem Produkt aus PCR 2 als Template. Durch Zugabe der entsprechenden Wildtypprimer wurde schließlich das gewünschte Produkt synthetisiert und amplifiziert. Nach Restriktion mit unikalen Endonukleasen konnte das PCR Produkt in den Vektor eingefügt werden.

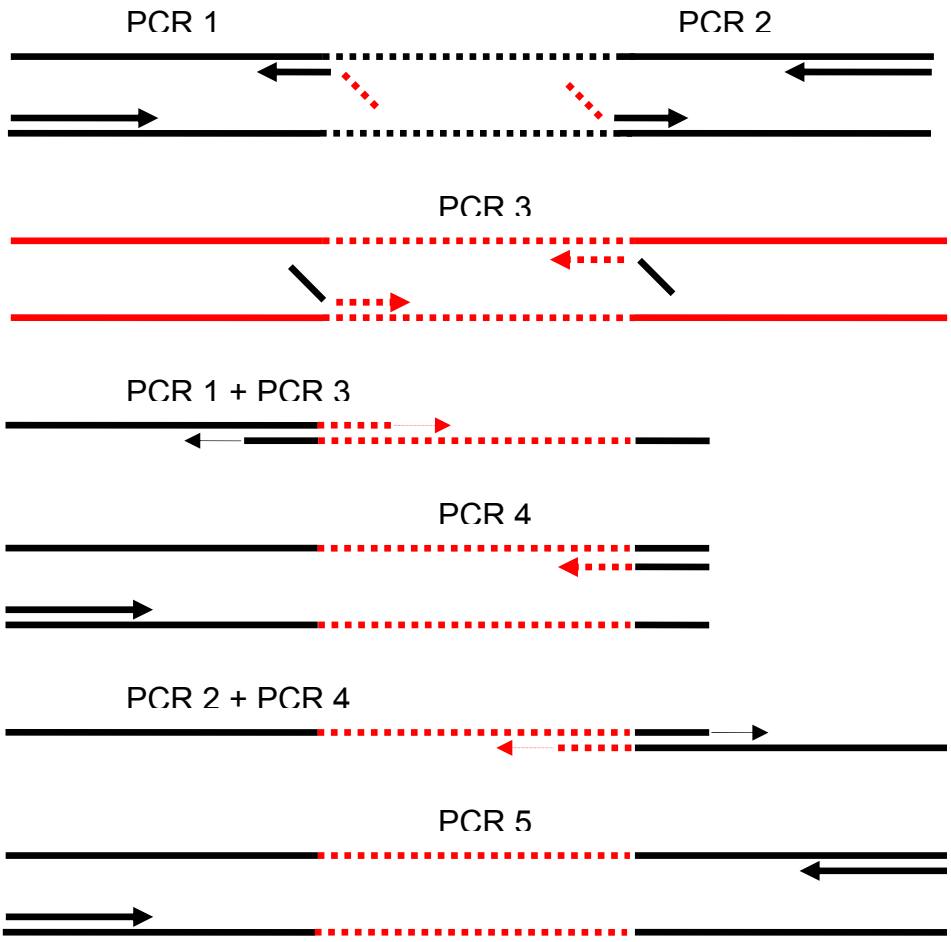

Abbildung 5. Multistep Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Konstruktion von Chimären.

Die verschiedenen Farben markieren den KCNQ1 bzw. KCNQ2 Kanal. Die auszutauschende Sequenz ist gestrichelt dargestellt. Neben Wildtypprimern werden spezielle chimärische Primer (siehe Text) verwendet. Die Produkte der zu Beginn durchgeführten PCRs 1, 2 und 3 dienen als Templates für die folgenden PCRs 4 und 5. Das synthetisierte PCR Produkt 5 wird schließlich in die Vektor DNA eingefügt.

2.3 Xenopus Laevis Oozyten als Expressionssystem für Ionenkanäle

Xenopus Oozyten sind eines der Standardexpressionssysteme (Miledi et al., 1983), die bei der elektrophysiologischen Untersuchung von Ionenkanälen zur Anwendung kommen. Ihr Vorteil besteht in der Einfachheit der Handhabung sowie in dem nur geringen Gehalt endogener Kanäle. Injizierte, für Ionenkanäle kodierende RNA, wird von ihnen in aller Regel gut translatiert und die synthetisierten Kanalproteine in ihre Zellmembran transportiert, wo sie dann elektrophysiologischen Messungen zugänglich sind.

2.3.1 Oozytenpräparation

2.3.1.1 Frosch Operation

Für die tierexperimentellen Studien lag die Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen vor.

Zu Beginn wurde der Arbeitsplatz und das verwendete chirurgische Besteck mit 70% Ethanol desinfiziert sowie ein Gefäß mit Eis bereitgestellt. Wir verwendeten erwachsene Xenopus laevis Frösche mit einer Mindestlänge von 9-12 cm. Die Frösche wurden für ca. 10-15 Minuten in 1 l 0.1% 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung (=Tricain, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) anästhesiert. Die benötigte Narkosetiefe wurde anhand des Beinmuskeltonus verifiziert. Um die Narkose aufrechtzuerhalten und das Blutungsrisiko möglichst gering zu halten, wurde der Frosch vor Beginn der Operation mit dem Rücken auf Eis gelegt und Kopf und Extremitäten mit Eis bedeckt. Mit einem sterilen Skalpell wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt durchgeführt und darunter liegende Faszie und Muskel durchtrennt. Durch diesen Zugang konnten anschließend mit Pinzette und Schere Teile der Ovarialsäcke entnommen werden. Muskel mit Faszie sowie die Haut wurden mit selbstresorbierbarem atraumatischem Nahtmaterial (Serafit, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) verschlossen. Der Frosch verblieb noch bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins in einem mit Leitungswasser gefüllten separaten Gefäß, bevor er wieder ins Aquarium verbracht wurde.



Abbildung 6. Weiblicher Xenopus laevis Frosch.

2.3.1.2 Defollikulierung und Auswahl von Oozyten.

Noch vor Beginn der Operation lösten wir 14 mg Kollagenase (Typ CLS III, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) in 7 ml Ca^{2+} freiem OR2 Medium (siehe 2.1.3). Zur Defollikulierung und Separation wurden die Oozyten direkt im Anschluss an die Entnahme in diese Lösung überführt und für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Um die Kollagenasereaktion abzubrechen, wurden die Oozyten mehrfach mit Frosch Ringer Lösung (siehe 2.1.3) gewaschen. Um einen Keimbefall zu verhindern, bewahrten wir die Oozyten in steril gefilterter und mit 50 µg/ml Gentamycin Sulfat (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) angereicherter Frosch Ringer Lösung bei 18°C auf. Das Medium wurde alle 1-2 Tage gewechselt und Oozytenfragmente entfernt. Die Mikroinjektion von cRNA erfolgte meist am darauf folgenden Tag.

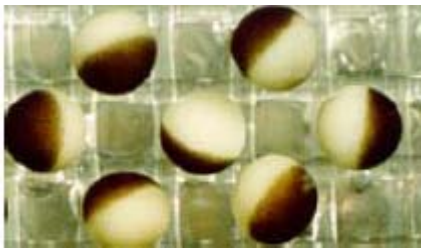

Abbildung 7. Oozyten im Stadium VI.

2.3.2 Mikroinjektion von cRNA in Oozyten

In-vitro transkribierte cRNA kann in *Xenopus laevis* Oozten injiziert und exprimiert werden (Gurdon *et al*., 1971). Zum Schutz der RNA wurden alle Schritte mit Latexhandschuhen durchgeführt und der gesamte Arbeitsplatz mit 70% Ethanol gereinigt. Hierzu suchten wir gesunde Oozyten des Stadiums V und VI (Dascal, 1987) aus und überführten diese in die mit Frosch Ringer Lösung gefüllten Vertiefungen eines Plexiglasblockes. Injektionspipetten wurden aus Borosilikat Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1.14 mm und einem Innendurchmesser von 0.53 mm (Drummond Scientific, Broomall, USA) mit einem horizontalen Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg, Deutschland) hergestellt. Durch Abbrechen der Spitze mit einer Pinzette erhielten wir eine scharfe Öffnung mit einem optimalen Durchmesser von ca. 20 µm. Mit dieser konnte die Verletzung der Oozytenmembran gering gehalten, aber dennoch problemlos RNA aufgesaugt werden. Die Pipetten wurden zur Abdichtung mit Mineralöl (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gefüllt und anschließend über den Metallkolben des NANOJECT Auto-Nanoliter Injector (Drummond Scientific, Broomall, USA) geschoben und befestigt. Ein 1.5 µl Tropfen RNA wurde mit speziellen RNAse freien Pipettenspitzen auf Parafilm aufgebracht und mit der Kapillarspitze aufgesogen. Die Kapillarspitze wurde nun in den vegetativen (=hellen) Pol der bereits zuvor in den Vertiefungen des Plexiglasblock platzierten Oozyten eingestochen und 36.8 nl cRNA (die Konzentration betrug 0.5-1 µg/µl) injiziert. Der animale, dunkle Pol enthält den Zellkern, der nicht verletzt werden sollte. Injizierte Oozyten wurden für weitere zwei Tage in 6-Loch-Gewebekulturplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) bedeckt von steril gefilterter und mit 50 µg/ml Gentamycin Sulfat (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) angereicherter Frosch Ringer Lösung aufbewahrt. Die Menge der injizierten cRNA korrelierte gut mit der Stromamplitude.

2.4 Elektrophysiologie

2.4.1 Zwei-Mikroelektroden-Spannungs-Klemme (TEVC) – Methodik

Die elektrophysiologische Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle erfolgte mit der Zwei-Mikroelektroden-Spannungs-Klemme (Two-Electrode-Voltage-Clamp = TEVC). Mit dieser Methode ist es möglich, Ganz-Zell-Ströme von Xenopus Oozyten zu messen. Die Experimente wurden 3-5 Tage nach Injektion von cRNA in die Oozyten durchgeführt. Die Technik wurde von Marmont und Cole 1949 erfunden und schließlich 1952 von Hodgkin und Huxley weiterentwickelt. Zu Beginn des Experiments werden eine Spannungs- (E*) sowie eine Stromelektrode (I*) in die Oozyte eingestochen. Die Elektroden sind mit einem Rückkopplungsverstärker verbunden, der das aktuelle Potential (E) der Oozyte misst und über den das Membranpotential auf eine vorgewählte Spannung eingestellt werden kann. Mit zunehmender Depolarisation öffnen immer mehr Ionenkanäle in der Membran. Kaliumionen strömen aus den Zellen aus, gefolgt von einer Veränderung des vorgegebenen Membranpotentials. Diese Abweichung wird vom Verstärker gemessen und über einen Rückkopplungsmechanismus durch Applikation von Strom ausgeglichen. Der applizierte Strom entspricht im Idealfall dem Stromfluss durch die Ionenkanäle.

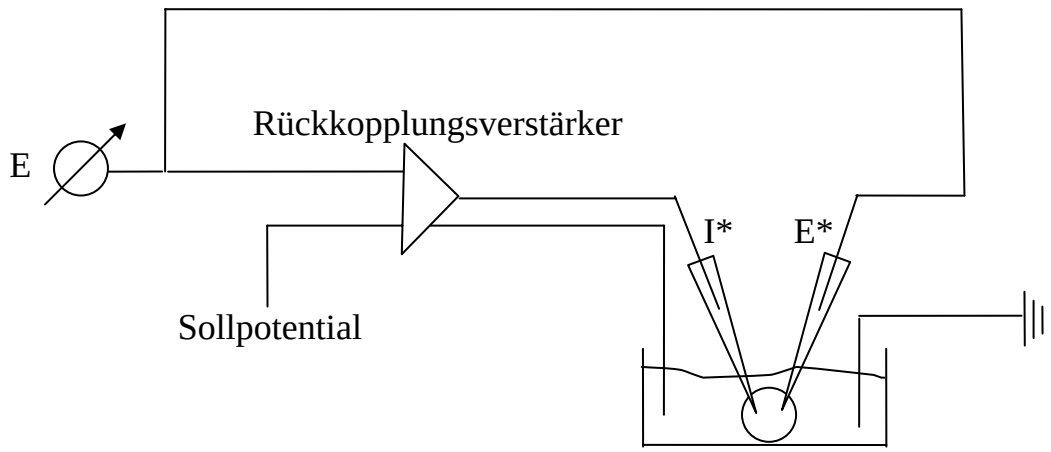

Abbildung 8. Diagramm der Zwei-Mikroelektroden-Spannungs-Klemm Methode (TEVC).

E Potential; I* Stromelektrode; E* Spannungselektrode

2.4.2 Aufbau des Meßstandes

Der gesamte Mess-Stand wurde auf einer luftgefederten Granitplatte aufgebaut und alle Metallteile geerdet. Head-stages und Pipettenhalter (Axon Industries) wurden auf Leitz Manipulatoren befestigt und mit einem TurboTec01c Rückkopplungsverstärker (NPI Elektronik GmbH, Tamm, Deutschland) verbunden. Die gemessenen Ströme wurden mit dem DIGIDATA 1200 AD/DA Wandler (Axon Instruments, Union City, USA) digitalisiert und in einem Personal Computer mit der Clampex 6.0 Software (Axon Instruments, Union City, USA) unter Microsoft DOS 6.2 (Microsoft Corp. Redmond, USA) aufgenommen. Eine speziell aus Plexiglas angefertigte Messkammer wurde zwischen den Mikromanipulatoren montiert. Die Kammer war so konstruiert, dass die Badlösung durch einen Zu- und Abfluss mittels eines nicht kommerziellen Multi-Gefäß Perfusionssystems ausgetauscht werden konnte. Die Lösungen flossen dabei aufgrund des hydrostatischen Drucks von den Vorratsbehältern in die Kammer und wurden mit einer elektrischen Pumpe abgesaugt. Oberhalb der Kammer wurde ein Stereomikroskop (StereoZoom 3, Bausch&Lomb, Dornach, Deutschland) installiert. Um Ag/AgCl Elektroden zu erhalten, wurden Silberdrähte (l=5cm, d=300µm, Science Products, Hoffheim, Deutschland) in Fe_2Cl_3 Lösung chloriert. Diese wurden in die Pipettenhalter eingespannt. Glaselektroden wurden aus Borosilikatglas Kapillaren mit Filament (Science Products, Hofheim, Deutschland; Außendurchmesser 1.5 mm, Innendurchmesser 1.17 mm) mit einem horizontalen Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg, Deutschland) hergestellt. Sie hatten einen Widerstand von 0.3-1MΩ, wurden mit 3 M KCl Lösung befüllt und wurden so in den Pipettenhaltern fixiert, dass die Ag/AgCl Elektroden in die Lösung eintauchten.

2.4.3 Durchführung der Experimente

Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Oozyte wurde in einer kleinen Vertiefung in der Mitte der Kammer von Badlösung umgeben platziert. Beide Elektrodenspitzen wurden an die Oozyte herangeführt und die

Elektrodenpotentiale im Stromklemmmodus des Verstärkers kompensiert. Nach Einstechen der Spannungselektrode konnte am Verstärker das Ruhemembranpotential (zwischen -35 und -75 mV) abgelesen und notiert werden. Der Leckstrom wurde nach Einstechen der Stromelektrode gemessen und betrug maximal 5% der maximalen Stromamplitude. Die gemessenen Ströme wurden mit 0.3 kHz tiefpass-gefiltert und mit einer Sampling Rate von 1kHz aufgenommen. Ströme wurden auf einem PC mit Clampfit (Axon), Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) sowie Origin (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) ausgewertet.

2.4.4 Protokolle und Datenauswertung

2.4.4.1 Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven

Die Oozyten wurden auf ein Potential von -100 mV bzw. -80 mV geklemmt und anschließend in 20 mV bzw. 10 mV Schritten für 2 Sekunden bis zu einem maximalen Potential von +20 mV bzw. +40 mV depolarisiert. Es schloss sich jeweils ein 500 ms langer Puls auf -30 mV an, um die Tail-Ströme zu messen und Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven zu erzeugen. Die Kurven wurden jeweils zur maximalen Amplitude der Tail-Ströme normalisiert, und es wurde die nachfolgend aufgeführte Boltzmann Funktion an die Daten angepasst:

$$I/Imax(V) = 1/(1 + \exp[(V-V_{0.5})/k]),$$

wobei I/Imax der normalisierten Tail-Strom Amplitude, $V_{0.5}$ dem Potential bei halbmaximaler Aktivierung und k einem Steigungsfaktor entsprechen.

2.4.4.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Um die Wirkung von Retigabin (Verschiebung der Aktivierungskurven hin zu negativeren Potentialen) auf die verschiedenen KCNQ Kanäle und Chimären/Mutanten zu testen, wurde Retigabin in aufsteigender Konzentration (0 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) in die Messkammer eingewaschen, und es wurden

jeweils Strom-Spannungs-Kurven aufgezeichnet. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve berechneten wir die Differenz zwischen den Spannungen bei halbmaximaler Aktivierung vor ($V_{0.5}$) und nach Applikation von Retigabin ($V_{0.5}$ (+RTG)). Die Werte wurden semilogarithmisch aufgetragen und eine Hill Funktion nach der folgenden Gleichung angepasst:

$$\text{Wirkung} = A_2 + [(A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^{nH})],$$

wobei A_1 die minimale Wirkung, A_2 die maximale Wirkung, x die Retigabin Konzentration, x_0 die EC_{50} (Retigabin Konzentration, bei der halbmaximale Linksverschiebung der Aktivierungskurven auftrat) und n_H die Steigung (Hill Koeffizient) der Kurve repräsentieren.

2.4.4.3 Tail Stromamplituden und Peak Strom

Retigabin hatte auf die Stromamplituden einiger Chimären einen konzentrationsabhängigen Effekt. Für diese sowie für KCNQ1, KCNQ2, Q2[E119G] sowie die Coexpressionen von Q2[E119G] mit KCNQ3 und KCNQ2/3 bestimmten wir die maximalen Tail Stromamplituden oder die Peak Ströme bzw. die normalisierten Peak Ströme für ein Aktivierungspotential von +20 mV oder 0 mV. Im Falle der Experimente zur Retigabin-Bindung extrapolierten wir die Amplituden gemäß der Boltzmann Gleichung zur vollen Aktivierung. Diese Werte wurden als relative Stromamplituden semilogarithmisch gegen die Retigabin Konzentrationen aufgetragen und eine Hill Funktion (siehe 2.4.4.2) an die Datenpunkte angepasst.

2.4.4.4 Aktivierung und Deaktivierung

Zur Bestimmung der Zeitkonstanten für die Aktivierung wurden Exponentialfunktionen erster oder zweiter Ordnung an den ansteigenden Teil der Ströme bei verschiedenen Potentialen angepasst. Um die Zeitkonstanten der Deaktivierung zu bestimmen, zeichneten wir nach einer Depolarisation auf +50 mV Tail Ströme für Potentiale zwischen -80 und -120 mV auf. An den abfallenden Anteil der Ströme wurden Exponentialfunktionen erster Ordnung angepasst.

Gleichungen der verwendeten Exponentialfunktionen:

Exponential Funktion erster Ordnung:

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

Exponentialfunktion zweiter Ordnung:

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

A: Strom Amplitude zum Zeitpunkt t
A_0: persistierende Stromamplitude im Gleichgewicht
A_1, A_2 : Amplituden der Transienten
t: Zeit
τ_1, τ_2: Zeitkonstanten

2.4.5 Statistik

Zur Signifikanztestung wurde der Student T-Test angewandt. P-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant gewertet. Nicht signifikante Werte wurden durch „n.s.“ markiert. Alle Ergebnisse wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean = S.E.M.) angegeben. S.E.M. wurde wie folgt berechnet:

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

x_i = Einzelwerte
n =Anzahl der Einzelwerte
x = Mittelwert

2.5 Computergestützte Modellierung des KCNQ2 (Kv7.2) Kanals

Wir erstellten ein dreidimensionales Strukturmodell für die Domänen S5 bis S6 des KCNQ2 Ionenkanals basierend auf der Homologie zu den röntgenstrukturanalysierten Kristallstrukturen der korrespondierenden Domänen von MthK (kalziumabhängiger bakterieller Kaliumkanal) und KcsA (bakterieller Kaliumkanal). Die Strukturen des MthK Kanals (1LNQ) und des KcsA Kanals (1BL8) wurden von der Protein Datenbank abgerufen. Die Modelle für den KCNQ2 Kanal wurden mit der frei im Internet erhältlichen SWISS-MODEL Software ((http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html) erzeugt. Die Energieoptimierung erfolgte mittels der Gromos96 Software (Grundeinstellungen) im Swiss-PdbViewer (Guex und Peitsch, 1997)

Retigabin wurde manuell in acht energieoptimierten Konformationen (ACD/Chemsketch; Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada) in die KCNQ2 Homologiemodelle eingepasst. Das resultierende Modell wurde erneut mit Gromos96 energieoptimiert. Das wahrscheinlichste Modell wird weiter unten in dieser Arbeit dargestellt (Abbildung 14).

3 ERGEBNISSE

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der Bindungsstelle von Retigabin am KCNQ2 (Kv7.2) Kanal

Retigabin induziert eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, so dass die Kanäle bereits bei negativeren Potentialen öffnen.

Um die Bindungsstelle von Retigabin am KCNQ2 Kanal einzugrenzen, nutzten wir die Tatsache, dass Retigabin im Gegensatz zum KCNQ2 Kanal keinen Effekt auf den KCNQ1 Kanal hat. Im Allgemeinen wird eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung entweder durch einen direkten Effekt auf den Spannungssensor oder alternativ durch eine Beeinflussung der Kopplung des Spannungssensors mit der Öffnung der Pore (z.B. Aktivierungstor) hervorgerufen. Eine wichtige Kandidatenregion für die Bindungsstelle stellten folglich die die Pore und das Aktivierungstor beinhaltenden Domänen S5 bis S6 dar, so dass wir uns in einem ersten Schritt entschlossen, für diese Region einen Sequenzvergleich für die Kanäle der KCNQ Familie durchzuführen. Hierbei zeigte sich eine weitreichende Übereinstimmung der Aminosäuren des KCNQ1 und KCNQ2 Kanals in dieser Region. Unter der Annahme einer spezifischen Interaktion von Retigabin mit einzelnen Aminosäuren erzeugten wir eine Reihe von Chimären (siehe 2.2.2.2) zwischen beiden Kanälen. Das Ziel war es hierbei, durch einen sukzessiven Austausch immer kürzerer Sequenzen und schließlich einzelner Aminosäuren (siehe 2.2.2.1) die Wirkung von Retigabin am KCNQ2 Kanal aufzuheben und somit Rückschlüsse auf die an der Bindung beteiligten Aminosäuren zu ziehen. In einem 2. Schritt wurden dann die entsprechenden Aminosäuren des KCNQ1 Kanals durch die gefundenen ersetzt und versucht, zumindest einen Teileffekt von Retigabin in KCNQ1 einzuführen. Um die Retigabin Sensitivität der Wildtypkanäle bzw. der Chimären und Mutanten zu quantifizieren, wurden sie heterolog in Xenopus laevis Oozyten exprimiert (siehe 2.3.2) und funktionell mit der Zwei-Mikroelektroden-Spannungs-Klemme (siehe 2.4.1) charakterisiert. Die Messungen wurden in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Retigabin (0 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) in der extrazellulären Badlösung unter Verwendung eines Perfusionssystems (siehe 2.4.2) durchgeführt.

3.1.1 Effekte von Retigabin auf die KCNQ1 (Kv7.1) und KCNQ2 (Kv7.2) WT Ionenkanäle

Die Effekte von Retigabin auf Ströme durch KCNQ1 und KCNQ2 Kanäle sind in Abbildung 9 dargestellt. Während die Substanz keine signifikante Wirkung auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskurve von KCNQ1 Kanälen (Abbildung 9C) hatte, kam es bei 100 µM zu einer leichten Reduktion der Stromamplitude (Abbildung 9A), was auch von Tatulian et al. (2001) beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu kam es zu einer starken konzentrationsabhängigen Verschiebung der Aktivierungskurve des KCNQ2 Kanals hin zu negativeren Membranpotentialen. Diese Linksverschiebung wurde als Konzentrations-Wirkungskurve semilogarithmisch aufgetragen (Abbildung 9D) und eine Hill Funktion angepasst (siehe 2.4.4.2). Für die EC_{50} wurde eine Konzentration von 4.1 µM berechnet. Der Hill Koeffizient betrug 0.88 (Abbildung 9D), was wir als einen Hinweis dafür werteten, dass ein Retigabin Molekül ausreichend war, um einen einzelnen KCNQ2 Kanal zu aktivieren. 100 µM RTG reduzierte die maximale KCNQ2 Stromamplitude in ähnlichem Maße wie für KCNQ1 (Abbildungen 9B und 9A). Dieser Effekt steht im Einklang mit anderen Arbeiten, in denen postuliert wurde, dass eine weitere Zunahme der Stromamplitude bei KCNQ2 durch Retigabin bei stark positiven Potentialen limitiert ist (Tatulian et al., 2001). Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen für die Coexpression von KCNQ2 und KCNQ3 Kanälen beschrieben (Main et al., 2000; Wickenden et al., 2000), verlangsamte Retigabin auch die Deaktivierungskinetik von KCNQ2 signifikant. An die Tail Ströme wurden für Potentiale zwischen -80 und -120 mV Exponentialfunktionen erster Ordnung angepasst (siehe 2.4.4.4). Für die Zeitkonstanten bei -110 mV ergaben sich Werte von 67 ± 5 ms vor und 219 ± 31 ms nach Applikation von 100 µM Retigabin ($p < 0.01$, $n = 4$).

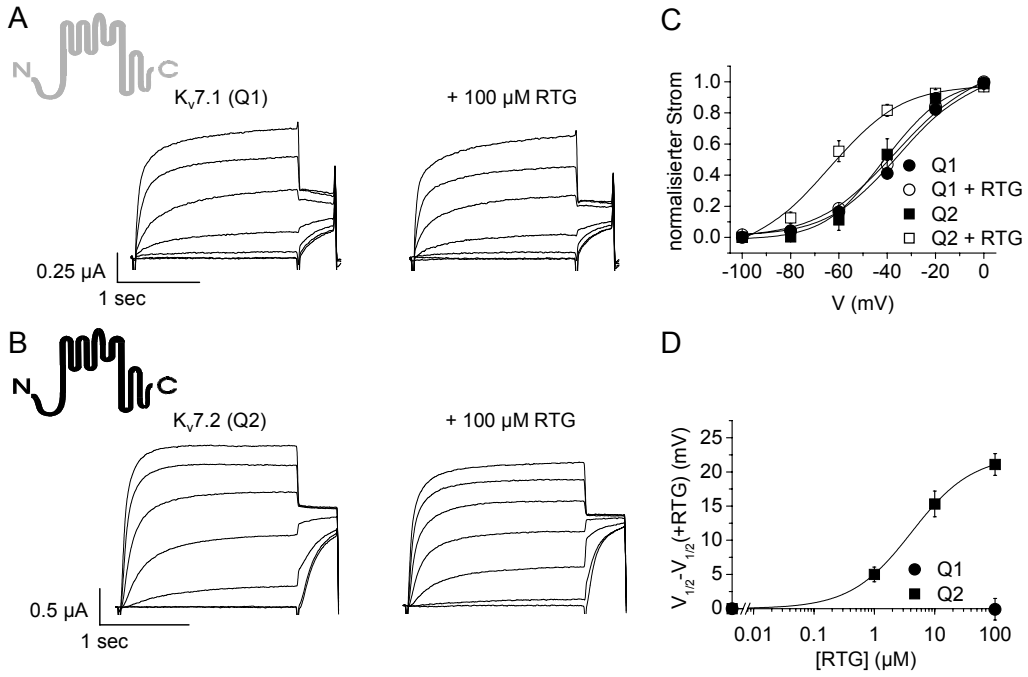

Abbildung 9. Wirkungen von Retigabin auf KCNQ1 (Q1, Kv7.1) WT und KCNQ2 (Q2, Kv7.2) WT Kanäle.

A und B, die Stromkurven wurden nach Depolarisation von -100 mV bis +20 mV in 20 mV Schritten von einem Haltepotential von -100 mV vor und nach Applikation von 100 µM Retigabin aufgezeichnet. Hierbei fiel eine leichte Abnahme der Stromamplitude beider WT Kanäle auf. C, zur Erstellung von Leitfähigkeits-Spannungskurven wurden normalisierte Tail Stromamplituden gegen das Membranpotential (V) aufgetragen und eine Boltzmann Funktion (siehe 2.4.4.1) an die Datenpunkte angepasst. Nach Applikation von 100 µM Retigabin kommt für KCNQ2 eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve zur Darstellung. Die entsprechende Kurve für KCNQ1 bleibt dagegen unverändert. D, Dosis-Wirkungskurve der Kanalaktivierung für Retigabin. Es wurde die relative Verschiebung der Spannungsabhängigkeit (Verschiebung der Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ gegen die Retigabin Konzentration ([RTG]) aufgetragen. Die Linie repräsentiert eine an die Datenpunkte angepasste Hill Funktion (siehe 2.4.4.2). RTG = Retigabin. Die Daten wurden als Mittelwert ± S.E.M. dargestellt, n = 5 bis 6.

3.1.2 Analyse der KCNQ2/KCNQ1 (Kv7.2/Kv7.1) Chimären und Mutanten

Um an der Bindung beteiligte Proteinregionen zu bestimmen, konstruierten wir Chimären (siehe 2.2.2.2), indem wir verschiedene Teile von KCNQ2 durch entsprechende Sequenzen von KCNQ1 ersetzten (Nomenklatur für diese Chimären: Q2[Kanalregion]Q1; Q2[Cterm]Q1 stünde beispielsweise für einen KCNQ2 Kanal, der den C-Terminus von KCNQ1 enthielt, Q2[Nterm-S4]Q1 für eine

Chimäre, die aus dem N-Terminus und den S1–S4 Segmenten von KCNQ1 sowie den S5–S6 Segmente und dem C-Terminus von KCNQ2 aufgebaut war). Alle Chimären, bei denen Teile der Segmente S1 bis S4 ausgetauscht wurden, waren nicht funktionell (Q2[Nterm-S4]Q1, Q2[Nterm-S2]Q1, Q2[S3-S4]Q1, und Q1[Nterm-S4]Q2). Der Austausch des C-Terminus (Q2[Cterm]Q1) hatte keine signifikanten Auswirkungen auf den Retigabin Effekt. Um die Relevanz der Porenregion zu beurteilen, tauschten wir diese komplett zwischen beiden Kanälen aus (Q2[S5–S6]Q1). Hierdurch konnte die Wirkung von Retigabin komplett aufgehoben werden (Abbildungen 11 und 12). Um die an der Bindung beteiligten Sequenzen weiter einzugrenzen, erstellten wir einen Sequenzvergleich für die Porenregion, der alle Kanäle der KCNQ Ionenkanalfamilie sowie den Shaker Kanal, den MthK Kanal und den KcsA Kanal einschloss.

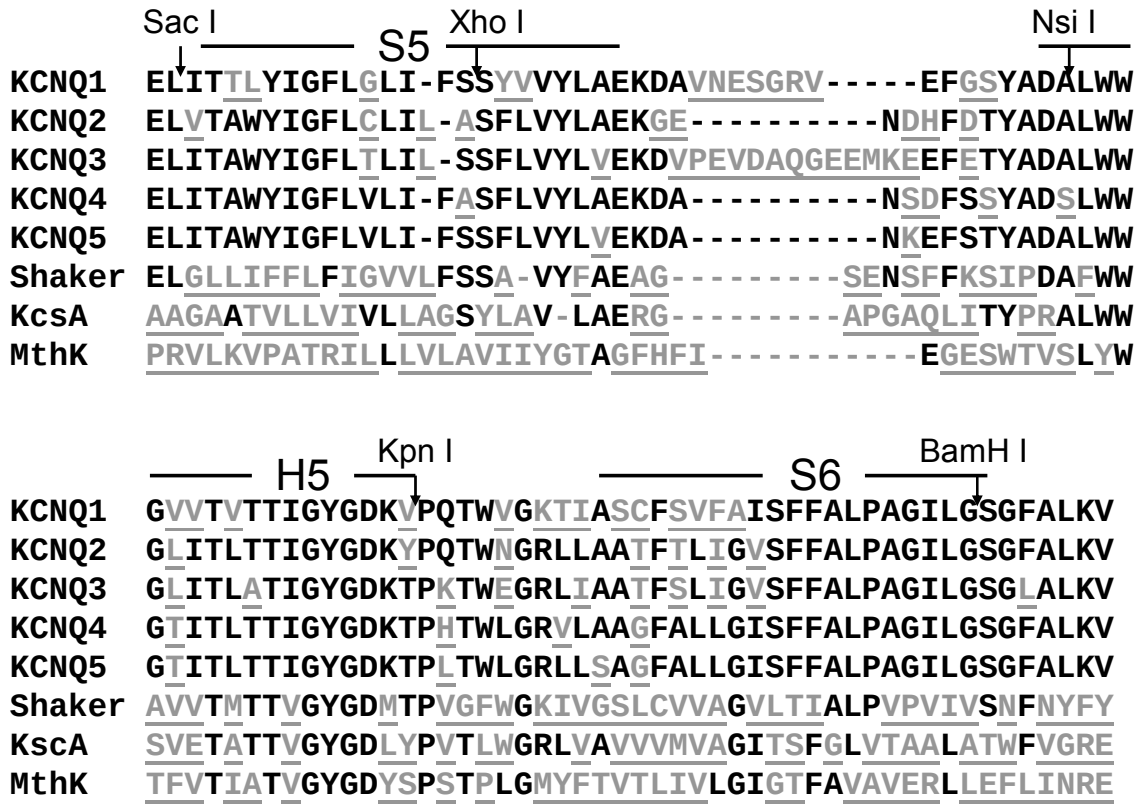

Abbildung 10. Sequenzvergleich der Porenregionen der KCNQ1 bis KCNQ5 (Kv7.1 bis Kv7.5), Shaker, KcsA, und MthK Kanäle.

Schwarze Buchstaben markieren konservierte Aminosäuren, graue Buchstaben zwischen den Kanalsequenzen divergierende Aminosäuren. S5 und S6 sind Transmembran Segmente, H5 eine Schleife, die den Selektivitätsfilter beinhaltet. Sac I, Xho I, Nsi I, Kpn I und BamH I sind Restriktionsstellen.

Wie in Abbildung 10 markiert, erzeugten wir durch Einführung stiller Mutationen mehrere unikale Restriktionsschnittstellen in der Porenregion (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2). Diese ermöglichten es uns, die Porenregion in fünf kleinere Teile zu zerlegen und diese zwischen beiden Kanälen auszutauschen.

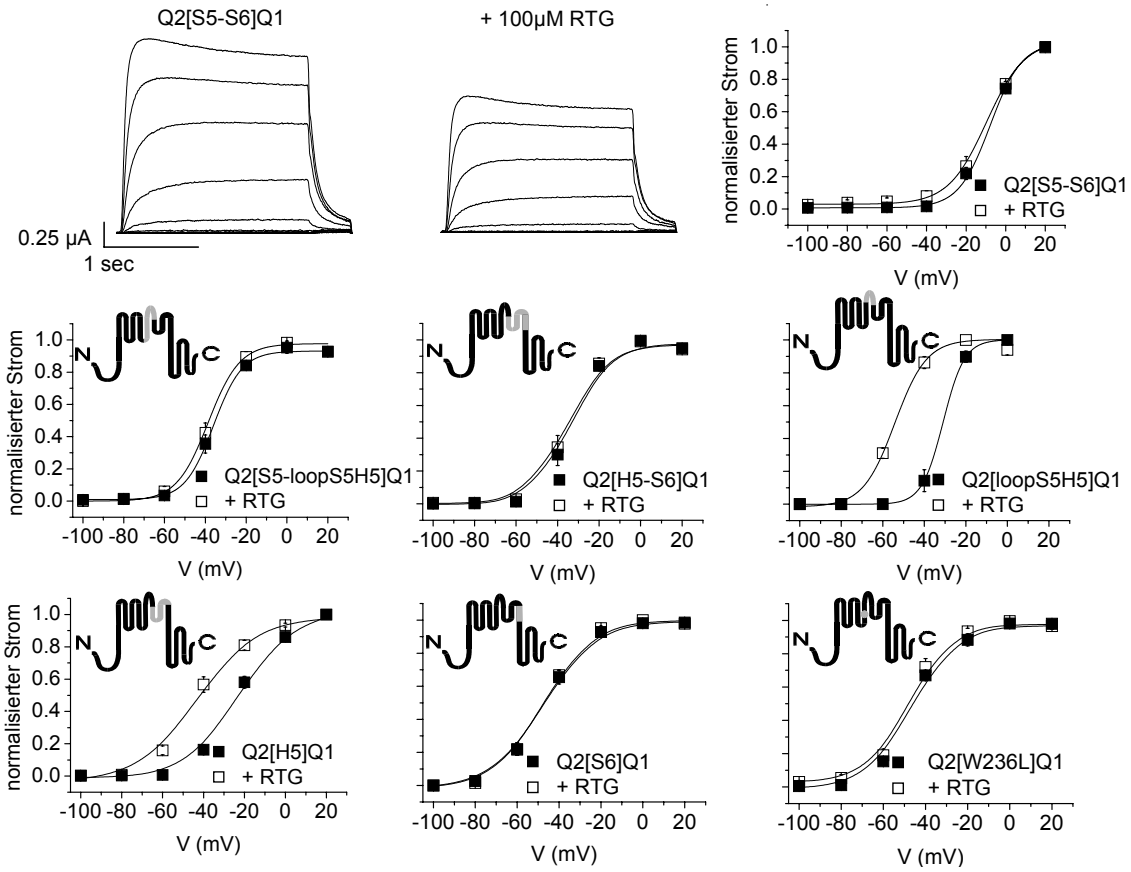

Abbildung 11. Aufheben des Retigabin Effekts in KCNQ2 (Kv7.2).

Dargestellt sind Leitfähigkeits-Spannungs Kurven (siehe 2.4.4.1) für KCNQ2/KCNQ1 Chimären (n = 4–7), bei denen verschiedene Teile der Porenregion (S5–S6 Segmente) ausgetauscht wurden, vor und nach Applikation von 100 µM Retigabin (RTG). Der Austausch des gesamten S5–S6 Segments sowie der S5-loopS5H5, H5S6, S6 Segmente oder der Aminosäure W236 gegen L hob die Retigabin-induzierte Linksverschiebung der Aktivierungskurve auf. Allerdings blieb die Reduktion der Stromamplitude der Q2[S5–S6]Q1 Mutante durch Retigabin, wie auch schon für beide WT Kanäle (Abbildungen 9A und 9B) beobachtet, weiterhin erhalten. Die Linksverschiebung der Aktivierungskurven von Q2[H5]Q1 und Q2[loopS5H5]Q1 wurde verglichen mit KCNQ2 nicht signifikant reduziert.

Für die Chimären Q2[S5-loopS5H5]Q1 (hier wurden das S5 Segment und die extrazelluläre Schleife zwischen S5 und H5 (SacI-NsiI) ausgetauscht), Q2[H5-S6]Q1 (NsiI-BamHI) und Q2[S6]Q1 (KpnI-BamHI) konnte keine durch bis zu 100

µM Retigabin verursachte Kanalaktivierung mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wies die Reaktion der Chimären Q2[loopS5H5]Q1 (XhoI-NsiI) und Q2[H5]Q1(NsiI-KpnI) auf die Applikation von Retigabin keinen signifikanten Unterschied verglichen mit KCNQ2 WT Kanälen auf (Abbildungen 9C, 9D, 11 und 12). Diese Ergebnisse machen die Lokalisation einer Retigabin Bindungsstelle in den S5 und S6 Segmenten, ohne Beteiligung des Selektivitätsfilters oder der extrazellulären Porenschleifen, sehr wahrscheinlich.

3.1.3 Beeinflussung der Retigabin Sensitivität durch Punktmutationen im KCNQ2 (Kv7.2) Kanal

Die Porenregion ist weitgehend konserviert, und es gibt nur wenige Aminosäuren, in denen sich der KCNQ1 von den KCNQ2 bis KCNQ5 Kanälen unterscheidet (Abbildung 10). An diesen Positionen erzeugten wir Punktmutationen (siehe 2.2.2.1) und ersetzten die jeweilige Aminosäure durch die entsprechende des KCNQ1 Kanals.

Eine interessante Abweichung findet sich im Aminsäurenvergleich zwischen den KCNQ1-5 Kanälen im Bereich des S6 Segments des KCNQ1 Kanals in Form eines Alanins an Position 336. An korrespondierenden Positionen in KCNQ2 bis KCNQ5 befindet sich ein hochkonserviertes Glycin (gemäß KCNQ2 Nummerierung G301). Nach derzeitiger Meinung dient dieses Glycin als Gelenkstelle des Öffnungstores (= „gating hinge“) in einer Vielzahl von Ionenkanälen, darunter Shaker sowie die bakteriellen Kanäle KcsA, MthK, KvAP (Jiang et al., 2002) und sogar ein bakterieller Natriumkanal (Zhao et al., 2004). Mutiert man das G301 in KCNQ2 zum korrespondierenden Alanin in KCNQ1 (Q2[G301A]Q1), erhält man einen nichtfunktionellen Kanal, wodurch die Wichtigkeit dieser Aminosäure für den Öffnungsmechanismus des KCNQ2 Kanals bestätigt wird. Während die meisten anderen Mutationen in S6 keine Auswirkungen auf die Retigabin Bindung hatten, fanden sich für einige signifikante Veränderungen im Sinne einer verstärkten oder leicht abgeschwächten Sensitivität für Retigabin. Die Tripelmutante Q2[RLL291–3KTI]Q1 zeigte hierbei eine leicht reduzierte Linksverschiebung der Aktivierungskurve von 15.8 ± 0.9 mV im Vergleich zum KCNQ2 WT Kanal (21.1 ± 1.6 mV). Im Gegensatz dazu ließ sich für

Q2[I300F]Q1 (32.2 ± 0.7 mV) eine leicht verstärkte Retigabin Sensitivität nachweisen.

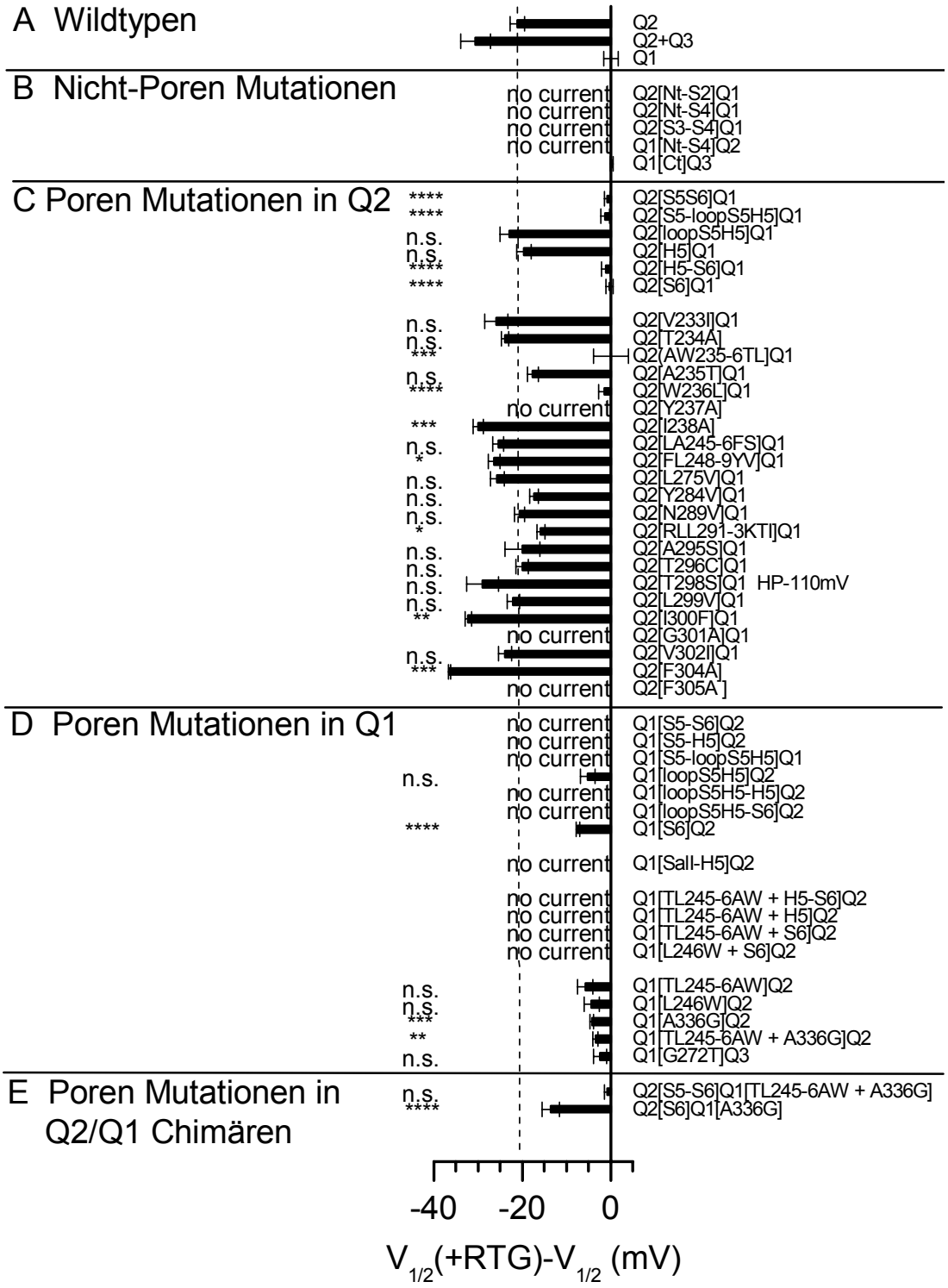

Abbildung 12. Zusammenfassung der Retigabin Effekte für alle untersuchten Mutanten.

Es wurde die Linksverschiebung der Aktivierungskurven (Verschiebung der Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$) nach Applikation von 100 µM Retigabin (RTG) als Mittelwert ±

S.E.M. (n = 3–12) aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert die Verschiebung für KCNQ2 (Q2). Zur Signifikanztestung der Reduktion (C) bzw. Einführung (D und E) der Verschiebung wurde der Student T-Test angewendet. Unterschiedliche Signifikanzniveaus sind gekennzeichnet durch: n.s., nicht signifikant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; no current, nichtfunktionelles Kanalkonstrukt; Q1, KCNQ1.

Im S5 Segment führte der Austausch des Tryptophans an Position 236 (Q2[W236L]Q1) allein bzw. in Kombination mit dem benachbarten Alanin an Position 235 (Q2[AW235–6TL]Q1) gegen die entsprechenden Aminosäuren Leucin bzw. Tyrosin zu einem vollständigen Wirkverlust von Retigabin. Für keine der anderen Aminosäuren ließ sich ein derart ausgeprägter Wirkverlust verzeichnen. Für die Doppelmutante Q2[FL248–9YV]Q1 konnten wir jedoch eine signifikante Zunahme der Retigabin Sensitivität nachweisen (26.4 ± 1.3 mV). Das W236 ist im zytoplasmatischen Anteil von S5 gelegen. Diese Tatsache in Verbindung mit dem beobachteten Wirkungsverlust infolge des Austauschs des W236 bzw. des ganzen S6 Segmentes wies aus sterischen Gründen daraufhin, dass Retigabin im zytoplasmatischen Anteil der S5 und S6 Segmente und damit unter Beteiligung der in diesem Bereich des S6 Segmentes gelegenen Gelenkstelle G301 und des nach aktueller Meinung distal davon gelegenen Kanal-Aktivierungstores bindet. Wie bereits oben beschrieben war ein direkter Nachweis der Bedeutung des G301 für die Bindung von Retigabin durch Mutation zum korrespondierenden Alanin nicht möglich, so dass wir uns vorerst darauf konzentrierten, weitere potentiell für die Bindung bedeutsame Aminosäuren in den S5 und S6 Segmenten zu identifizieren. Hierzu mutierten wir einige konservierte Aminosäuren im Bereich um das W236 in S5 zu Alaninen. Darüber hinaus wurden die hydrophoben Phenylalanine 304/305 in S6 jeweils gegen Alanine ausgetauscht, da Retigabin als sehr hydrophobe Substanz vorzugsweise mit lipophilen Aminosäuren in KCNQ Kanälen interagieren sollte. Die Aminosäure Alanin wurde verwendet, da sie die α-helikale Struktur der Domänen erhält. Die hierbei getestete Mutante Q2[T234A] hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Retigabin Bindung, jedoch konnte für Q2[I238A]Q1 (30.0 ± 1.1 mV) sowie Q2[F304A] (36.5 ± 0.2 mV) jeweils eine signifikante Zunahme der Retigabin Sensitivität beobachtet werden. Q2[Y237A] und Q2[F305A] waren nicht funktionell.

3.1.4 Einführen der Retigabin Bindungsstelle in KCNQ1 (Kv7.1) oder KCNQ1/KCNQ2 (Kv7.1/Kv7.2) Chimären

Um die Beteiligung des W236 an der Bindung von Retigabin zu bestätigen und die Bedeutung des G301 für die Retigabin Wirkung untersuchen zu können, führten wir diese Reste in den KCNQ1 Kanal ein und testeten ihren Einfluss auf die Retigabin Sensitivität.

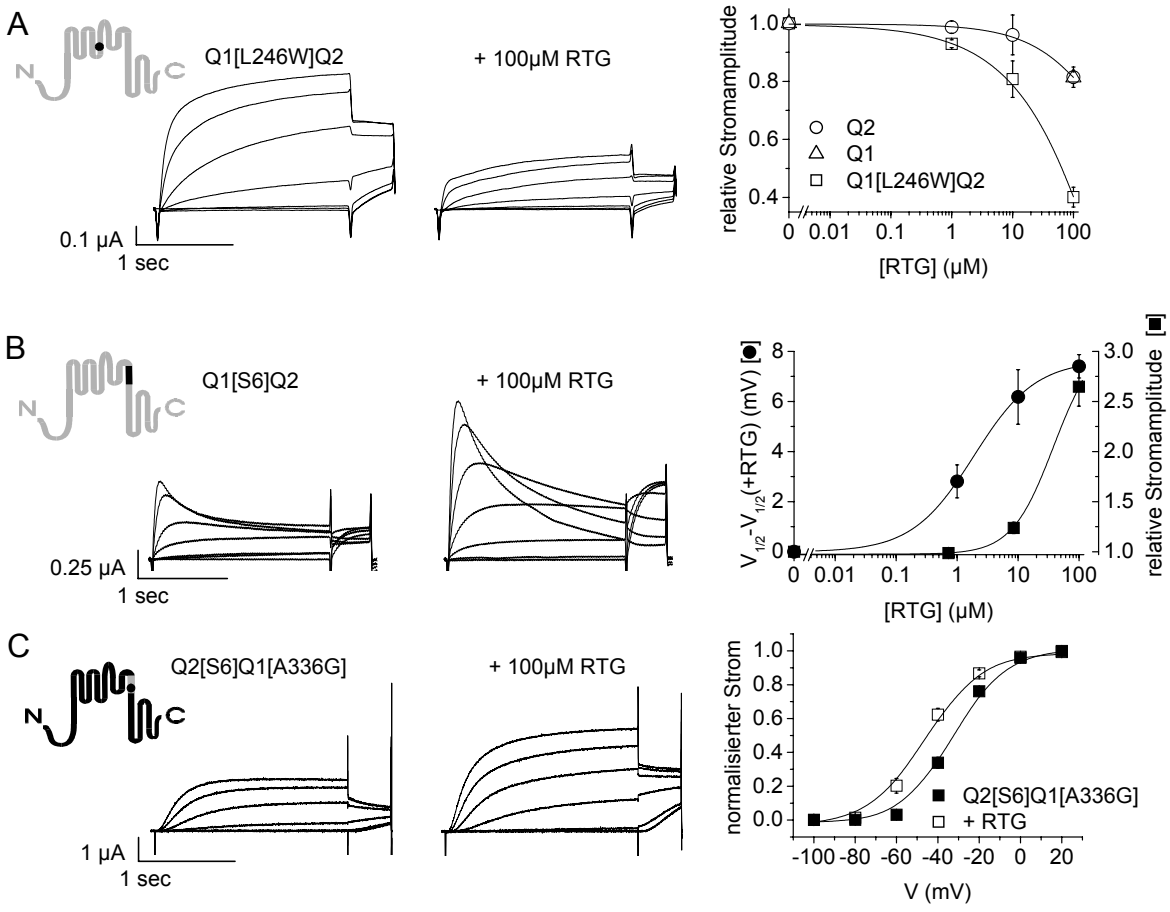

Abbildung 13. Einführen der Retigabin Wirkung in KCNQ1 (Kv7.1) oder KCNQ1/KCNQ2 (Kv7.1/Kv7.2) Chimären.

A, die Stromkurven zeigen eine starke Retigabin (RTG) induzierte Reduktion der Stromamplitude für Q1[L246W]Q2. Durch Auftragen der relativen Stromamplitude gegen die Retigabin Konzentration ([RTG]) in einem semilogarithmischen Diagramm zeigt sich klar, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist (n = 4–5). KCNQ1 wurde nur für 100 µM Retigabin gemessen. Die Linien repräsentieren Hill Gleichungen, die an die Datenpunkte angepasst wurden (siehe 2.4.4.2). B, die Stromkurven von Q1[S6]Q2 zeigen sowohl eine Zunahme der Stromamplitude als auch eine Linksverschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung (Verschiebung der Spannung der

halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$), induziert durch Retigabin (100 µM). Das rechte Diagramm verdeutlicht die klare Konzentrationsabhängigkeit beider Effekte (n = 5). Die Linien repräsentieren wiederum Hill Gleichungen, die an die Datenpunkte angepasst wurden (siehe 2.4.4.2). C, dargestellt sind Stromspuren und Leitfähigkeits-Spannungs Diagramme für Q2[S6]Q1[A336G]. Diese zeigen eine Retigabin-induzierte Linksverschiebung der Aktivierungskurve (n = 12) sowie einen Anstieg der Stromamplitude. Im Gegensatz dazu konnte für Q2[S6]Q1 keine Verschiebung der Aktivierungskurve beobachtet werden (vergleiche Abbildungen 11 und 12), so dass dieser Effekt durch das Einführen des Glycins zu erklären ist. Die Daten wurden als Mittelwert ± S.E.M. dargestellt.

Für Q1[TL245–6AW]Q2 und Q1[L246W]Q2 konnten wir nur eine maximale Linksverschiebung der Spannugsabhängigkeit der Aktivierung durch Retigabin von -5 mV (Abbildung 12) beobachten. Es ließ sich hier aber keine klare Konzentrationsabhängigkeit zeigen, so dass diese kleinen Veränderungen mit Vorsicht interpretiert werden müssen. Allerdings führte Retigabin zu einer starken konzentrationsabhängigen Amplitudenreduktion von Q1[L246W]Q2 (Abbildung 13A). Ein derartig starker blockierender Effekt konnte bisher nicht für KCNQ1 oder KCNQ2 (Abbildungen 9 und 13A) beobachtet werden, was darauf hinwies, dass die Einführung des Tryptophans an dieser Position die Substanzwirkung verstärkte.

Die Insertion des Glycins an korrespondierender Position in KCNQ1 (Q1[A336G]Q2) resultierte in größeren Strömen als für KCNQ1 WT Kanäle beobachtet. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Retigabin Effekt im Sinne einer Verschiebung der Aktivierung (Abbildung 12). Im nächsten Schritt fügten wir AW235-236 und G301 (KCNQ2 Nummerierung) simultan in den KCNQ1 Kanal (Q1[TL245-6AW + A336G]Q2) ein. Dies führte jedoch nicht zu einer Verstärkung der Wirkung von Retigabin (Abbildung 12). Da die Gesamtstrukturen der Poren der KCNQ1 und KCNQ2 Kanäle doch sehr unterschiedlich sein mögen, wäre es gut denkbar, dass die Einführung einzelner Aminosäuren nicht ausreicht, um einen Großteil der Retigabin Bindung in KCNQ1 zu erreichen. Daher tauschten wir das gesamte S6 Segment aus (Q1[S6]Q2). Diese Chimäre zeigte eine klare Retigabin Sensitivität; wies jedoch interessanterweise zusätzliche Retigabin-sensitive Änderungen des Schaltverhaltens auf, die von den bereits für KCNQ2 beobachteten abwichen. Die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskurve nach links betrug hier ca. 1/3 (-7.4 mV) des maximalen für den

WT Kanal KCNQ2 beobachteten Effekts (Abbildungen 12 und 13B). Darüber hinaus fiel ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Stromamplitude bis auf nahezu das 3-fache des Ausgangswertes auf (Abbildung 13B). Als nächstes kombinierten wir jeweils Q1[S6]Q2 mit Q1[L246W]Q2 oder Q1[TL245–6AW]Q2. Diese Chimären waren nichtfunktionell, was ein weiterer Hinweis dafür war, dass sich die beiden WT Kanäle KCNQ1 und KCNQ2 hinsichtlich ihrer Porenstrukturen sowie ihres Schaltverhaltens doch beträchtlich voneinander unterscheiden. Um nun dennoch die Bedeutung des G301 im Hinblick auf seine Rolle bei der Retigabin Bindung untersuchen zu können, konstruierten wir einen KCNQ2 Kanal, der das S6 Segment von KCNQ1 enthielt, in das wiederum ein Glycin an Position 336 (KCNQ1 Nummerierung) eingebaut wurde: Q2[S6]Q1[A336G]. Eine direkte Beurteilung der Bedeutung dieses Glycins war ja in KCNQ2 nicht möglich, da die Mutante Q2[G301A]Q1 nicht mehr funktionell war. Da der Austausch des S6 Segmentes in KCNQ2 zum kompletten Wirkverlust von Retigabin führte (Abbildungen 11 und 12), bot sich das Wiedereinführen des Glycins in diese Chimäre an. Dieses Konstrukt war funktionell und konnte im Hinblick auf seine Retigabin Sensitivität näher charakterisiert werden. Auf diese Weise ließ sich die Retigabin Wirkung tatsächlich zu mehr als 50% wiederherstellen (Verschiebung der Aktivierung um -13.6 mV) (Abbildungen 12 und 13C). Darüber hinaus kam es nach Applikation von 100 µM RTG zu einem signifikanten Anstieg der Stromamplitude (Abbildung 13C). Diese Ergebnisse zeigten, dass die angenommene Flexibilität des S6 Segmentes an der Position des G301 von großer Bedeutung für die Bindung und Wirkung von Retigabin am KCNQ2 Kanal ist.

3.1.5 Modell für die Retigabin Bindung am KCNQ2 (Kv7.2) Kanal

Basierend auf den Kristall Strukturen der Porendomänen des KcsA Kanals (geschlossene Konformation, Doyle et al., 1998) und des MthK Kanals (offene Konformation, Jiang et al., 2002) entwickelten wir ein Homologiemodell für den offenen und den geschlossenen Zustand des KCNQ2 Kanals. Bei Superposition beider Modelle fällt eine Beugung der S6 Helix an Position G301 nach lateral in Verbindung mit einer Konformationsänderung des S5 bei der Kanalöffnung auf (Abbildungen 14A, B und C).

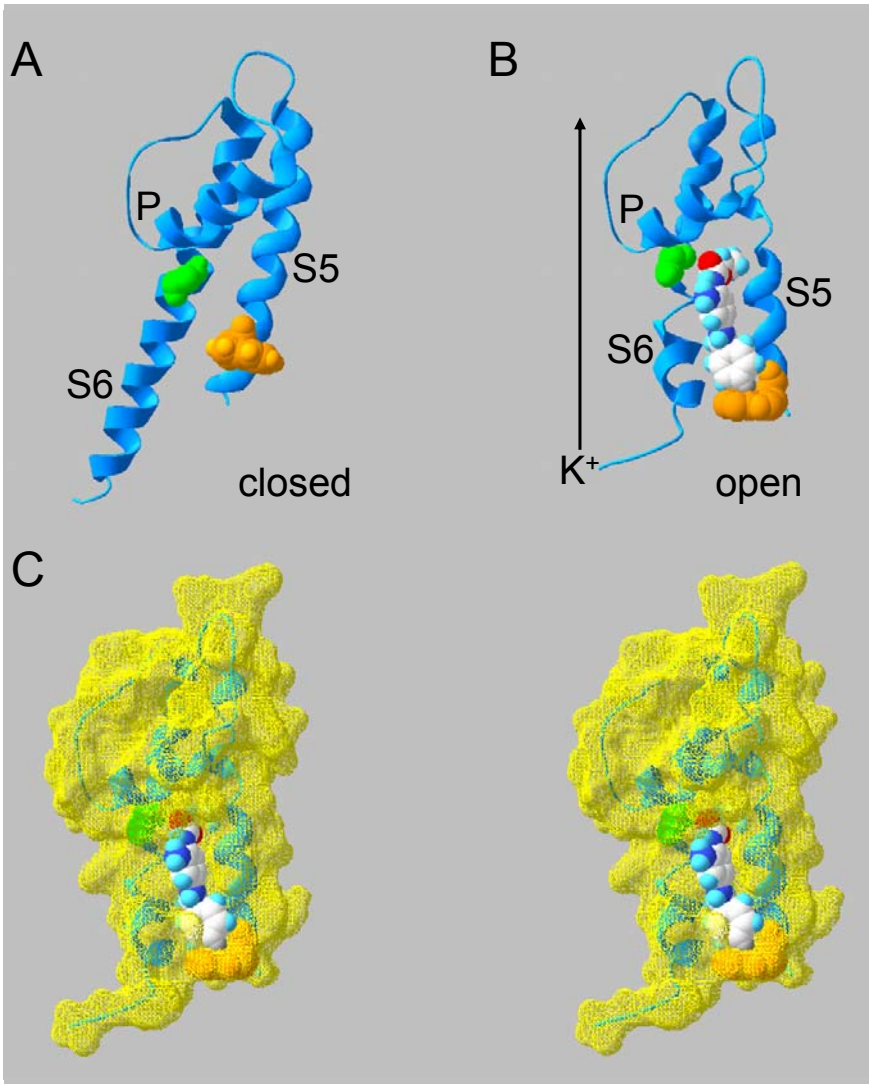

Abbildung 14. Computer Modell für die Bindung des Retigabin Moleküls in der Porenregion des KCNQ2 (Kv7.2) Kanals.

Gezeigt werden energieoptimierte Homologie Modelle für die KCNQ2 Porendomäne, abgeleitet von den Kristall Strukturen von KscA (A, geschlossene Konformation) und MthK (B, offene Konformation). In grün markiert das Glycin an Position 301, das derzeitiger Meinung nach als „Angelpunkt" für das Öffnungstor dient, in orange dargestellt das Tryptophan an Position 236. Das Retigabin (RTG) Molekül wurde manuell in den Kanal in der offenen Konformation eingepasst (B) (siehe 2.5). C, Stereobild von B, das ohne Fixierung eine dreidimensionale Darstellung erlaubt, mit einer Rekonstruktion der Proteinoberfläche (in gelb). S5 und S6 sind Transmembrandomänen. P ist die Porenschleife.

Darüber hinaus ergeben sich dabei Hinweise für die Ausbildung einer hydrophoben Tasche zwischen den intrazellulären Anteilen von S5 und S6. Das energieoptimierte Retigabin Molekül konnte manuell in diese Tasche eingepasst werden, unter Berücksichtigung der in unseren elektrophysiologischen

Untersuchungen gefundenen möglichen Interaktionen mit dem W236. Das Modell legt eine spezifische lipophile Interaktion zwischen dem Fluorophenylring des Retigabin Moleküls und dem aromatischen W236 nahe. Im geschlossenen Zustand würde die parallele Orientierung des S5 und S6 Segmentes eine Retigabin Bindung nicht erlauben (Abbildung 14A). Aufgrund der verschiedenen möglichen Konformationen des Retigabin Moleküls sowie seiner Flexibilität und der bei der Modellierung des KCNQ2 Kanals ausgehend vom KcsA und MthK Kanal aufgefallenen Variabilität insbesondere der zytoplasmatischen Regionen von KCNQ2 muss dieses Modell allerdings mit Vorsicht interpretiert werden.

3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung einer neuen KCNQ2 (Kv7.2) Mutation bei neonataler Epilepsie (BFNC)

Wir untersuchten die funktionellen Veränderungen einer neuen Mutation im KCNQ2 Kanal. Die Mutation wurde von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. K. Jurkat-Rott und Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. F. Lehmann-Horn in einer BFNC Familie identifiziert und führt zu einem einzelnen Aminosäureaustausch von Glutamat zu Glycin an Position 119 im Bereich der extrazellulären S1-S2 Schleife des KCNQ2 Kanals und damit zum Verlust einer negativen Ladung. Es ist die erste und einzige bekannte Mutation in einer S1-S2 Schleife eines spannungsgesteuerten Kanals, die mit einer Kanalkrankheit – hier mit BFNC – assoziiert ist. Die Mutation wurde in den KCNQ2 Kanal eingeführt (siehe 2.2.2.1). Zur Charakterisierung wurde die Mutation in Xenopus Oozyten exprimiert. Hierzu wurde die cDNA linearisiert, in RNA transkribiert und schließlich in Oozyten injiziert (siehe 2.2.1.5.4, 2.2.1.6, 2.3.2). Die Ströme wurden mit der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemme gemessen. Die Oozyten wurden auf ein Membranpotential von -80 mV geklemmt und dann in 10 mV Schritten bis auf + 40 mV depolarisiert. Um Tail-Ströme aufzeichnen zu können, schloss sich dieser Depolarisation ein Puls auf -30 mV an. Die absoluten Stromamplituden wurden am Ende eines 2-sekündigen Pulses auf 0 mV verglichen (siehe 2.4.4.3). Hierbei ergab sich für den KCNQ2 WT Kanal (Q2) und die Mutation Q2[E119G] (E119G) kein signifikanter Unterschied (Abbildung 15).

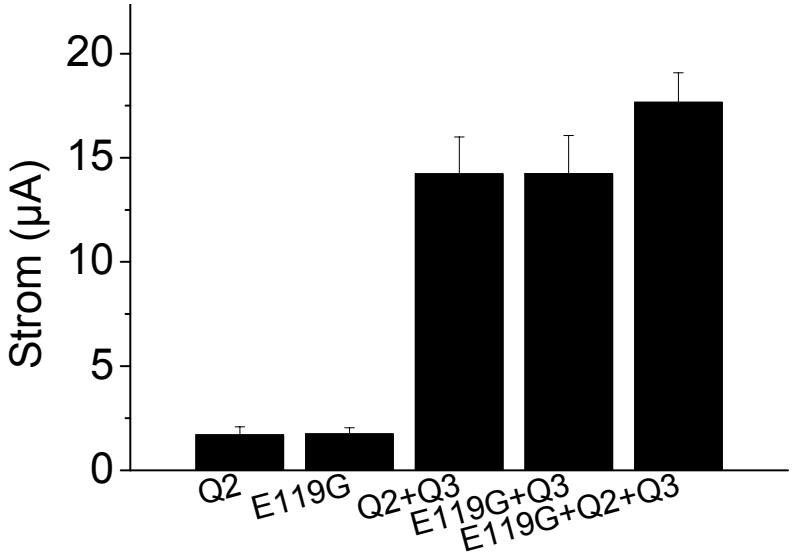

Abbildung 15. Absolute Stromamplituden von KCNQ2 (Kv7.2), Q2[E119G] und den Coexpressionen

Die absoluten Stromamplituden wurden nach einer 2-sekündigen Depolarisation von einem Haltepotential von -80 mV auf 0mV verglichen (siehe 2.4.4.3) (n=6). Die Coexpressionen wurden durch RNA Injektion in Xenopus Oozyten (siehe 2.3.2) im Verhältnis 1:1 bzw. 1:1:2 mit derselben Gesamtmenge an RNA durchgeführt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Amplituden für die Einzel- oder Coexpressionen im Vergleich zum KCNQ2 WT (Q2 WT) Kanal bzw. zum KCNQ2+KCNQ3 (Q2+Q3) Kanal.

Die Aktivierungskurven wurden aus den Tail-Strom-Amplituden für ein Potential von -30 mV konstruiert (siehe 2.4.4.4). Hierbei fiel eine signifikante Verschiebung der Aktivierungskurven um 3.7 mV in depolarisierender Richtung von $V_{0.5}$ = -39.3 mV ± 0.7 mV (KCNQ2) auf $V_{0.5}$ = -35.6mV ± 0.9 mV (Q2[E119G]) ($p < 0.05$) mit einem von -8.8 ± 0.2 auf -7.9 ± 0.7 leichtgradig vergrößerten, wenn auch nicht statistisch signifikanten, Steigungsfaktor auf. Dadurch ist die Verschiebung der Aktivierungskurve im Subschwellenbereich am größten (Abbildung 16A) und führte somit zu einer Reduktion der normalisierten Stromamplituden in diesem Bereich (siehe 2.4.4.3). Für -50 mV ergab sich hierbei eine statistisch signifikante Reduktion um 44% ($p < 0.01$, n=6) (Abbildung 16B). Weiterhin fand sich eine für die meisten Potentiale signifikante ($p < 0.05$) Parallelverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten um ca. 10 mV hin zu positiveren Potentialen, die im Falle der Mutation in einer Verlangsamung der Kanal-Aktivierung betont im Subschwellenbereich resultierte (Abbildung 16C).

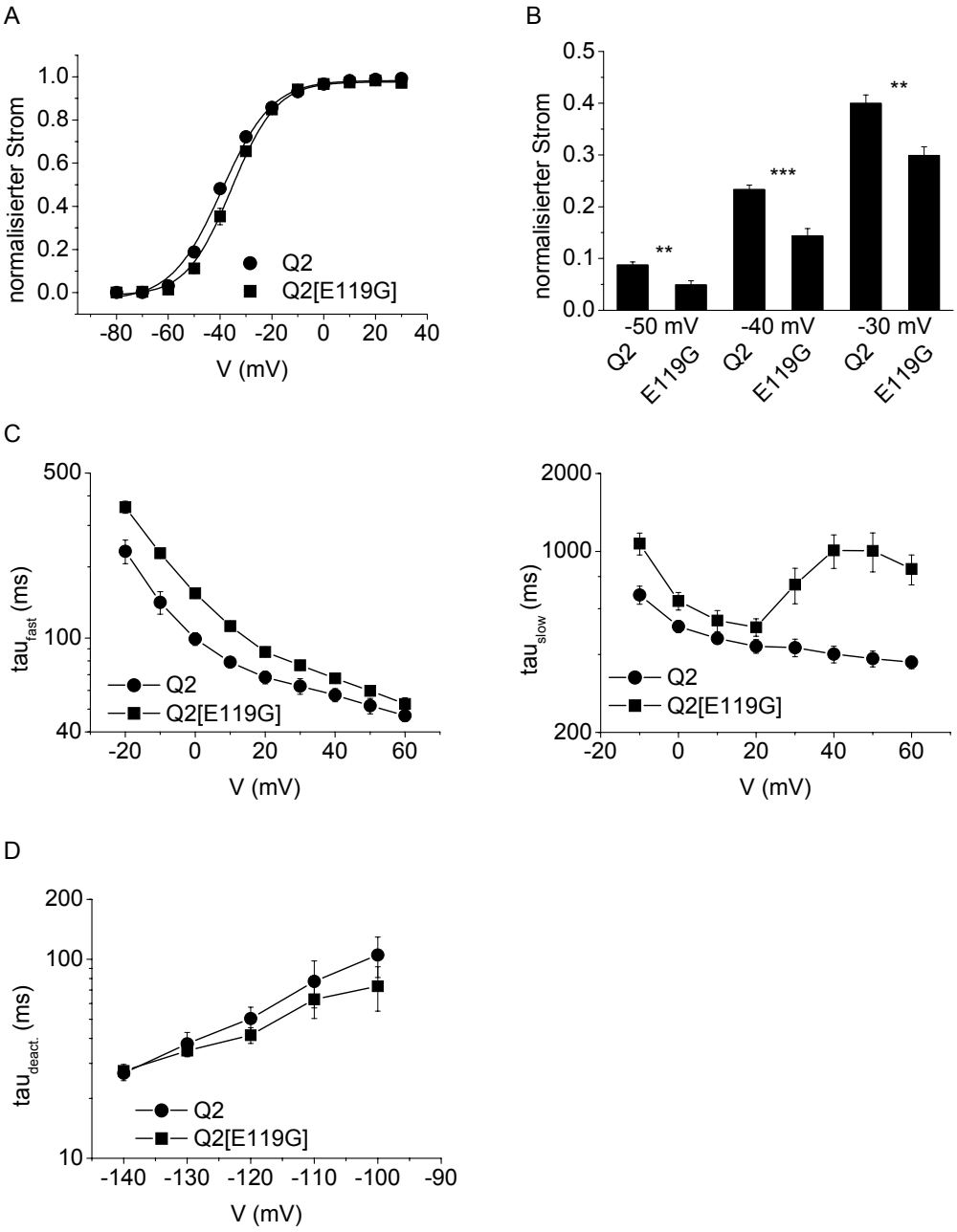

Abbildung 16. Heterologe Expression von homomeren KCNQ2 (Kv7.2) Kanälen, Wildtyp und Q2[E119G]

A, Dargestellt sind Leitfähigkeits-Spannungskurven für homomere KCNQ2 (Q2) und Q2[E119G] (E119G) Kanäle. Die Linien repräsentieren Standard Boltzmann Funktionen ($I/I_{max}(V)=1/(1+\exp[(V-V_{0.5})/k]$), die an die Datenpunkte angepasst wurden, wobei I/I_{max} den normalisierten Tail-Strom-Amplituden, $V_{0.5}$ der Spannung der halbmaximalen Aktivierung und k einem Steigungsfaktor entsprechen (siehe 2.4.4.1). Man sieht eine leichte signifikante Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve um 3.7 mV mit einem von -8.8 ± 0.2 auf -7.9 ± 0.7 leichtgradig vergrößerten, wenn auch nicht statistisch signifikanten, Steigungsfaktor (n=5-6, $p < 0.05$). B, Aufgetragen wurden die zum Strommaximum normalisierten Stromamplituden für den

KCNQ2 und den Q2[E119G] Kanal für Potentiale im Subschwellenbereich zwischen -50 mV und -30 mV (siehe 2.4.4.3). Hierbei sieht man eine signifikante Reduktion der Stromamplituden von bis zu 44% (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n=6). C, Die Zeitkonstanten (τ_{fast}, τ_{slow}) der Aktivierung wurden durch die Anpassung einer Exponentialfunktion zweiter Ordnung an den Zeitverlauf der Aktivierung ermittelt (siehe 2.4.4.4). Für die meisten Potentiale war τ_{fast} von Q2[E119G] statistisch signifikant langsamer als von KCNQ2 ($p < 0.05$, n=4-6), so dass eine Parallelverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten um ca. 10 mV hin zu positiveren Potentialen resultierte. Für τ_{slow} ergab sich im Wesentlichen für Potentiale zwischen -50 mV und -70 mV eine signifikante Verlangsamung für Q2[E119G] ($p < 0.05$, n=4-6). D, Aufgetragen wurde die Deaktivierungskinetik für die Kanäle KCNQ2 und Q2[E119G]. Die Deaktivierungszeitkonstante τ_{deact} wurde hierbei durch die Anpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung an den Tail-Strom für verschiedene Potentiale nach einer 1,5 s dauernden Depolarisation auf +50 mV ermittelt (siehe 2.4.4.4). Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kanälen (n=4-5).

Die Zeitkonstanten (τ_{fast}, τ_{slow}) der Aktivierung wurden hierbei durch die Anpassung einer Exponentialfunktion zweiter Ordnung an die ansteigende Phase des Kaliumstromes für verschiedene Potentiale ermittelt (siehe 2.4.4.4). Die Zeitkonstanten der Kinetik der Stromdeaktivierung wurden durch die Anpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung an die Tail-Ströme für verschiedene Potentiale, die einer 1,5 s dauernden Depolarisation auf +50 mV folgten, bestimmt (siehe 2.4.4.4). Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Mutation (Abbildung 16D).

Da angenommen wird, dass heteromere KCNQ2/KCNQ3 Kanäle das häufigste native Korrelat des M-Stroms im Gehirn repräsentieren (Jentsch, 2000, Wang et al., 1998), haben wir ebenfalls die funktionellen Auswirkungen der Q2[E119G] Mutation für die heteromeren Tetramere mit KCNQ3 untersucht. Um die beim heterozygoten BFNC Patienten vorhandene genetische Situation mit einem WT- und einem mutierten *KCNQ2* Allel sowie zwei WT *KCNQ3* Allelen zu simulieren, haben wir darüber hinaus KCNQ2, Q2[E119G] und KCNQ3 in einem 1:1:2 Verhältnis coexprimiert (siehe 2.3.2). Hierbei ließ sich analog zu den homomeren Kanalexpressionen 3-5 Tage nach RNA-Injektion in die Oozyten kein signifikanter Unterschied der absoluten Stromamplituden für eine Depolarisation auf 0 mV nachweisen (siehe 2.4.4.3) (Abbildung 15).

Wie bereits beim Vergleich der monomeren WT und Q2[E119G] Kanäle beobachtet, fand sich auch für die Coexpressionen von Q2[E119G] mit dem

KCNQ3 Kanal bzw. dem KCNQ2 und dem KCNQ3 Kanal im Vergleich zum heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanal eine signifikante Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung um 5.1 mV bzw. 3.8 mV in depolarisierender Richtung von $V_{0.5}$ = -40.2 ± 1.0 mV auf $V_{0.5}$ = -35.1 ± 0.9 mV bzw. $V_{0.5}$ = -36.3 ± 0.6 mV ($p < 0.01$ bzw. $p < 0.05$, n=5-6) (Abbildung 17A). Der Steigungsfaktor der Aktivierungskurven war im Gegensatz zu den Beobachtungen für die homomeren Kanäle nicht vergrößert. Wie bereits für die homomeren Kanäle beschrieben, ließ sich auch für die Coexpressionen eine statistisch signifikante Amplitudenreduktion der normalisierten Ströme im Subschwellenbereich beispielsweise bei – 50 mV für Q2[E119G] + KCNQ3 um ca. 46 % und für Q2[E119G] + KCNQ2 + KCNQ3 um ca. 42 % ($p < 0.001$ bzw. $p < 0.0001$, n=6) nachweisen (Abbildung 17B). Eine signifikante Verlangsamung der Aktivierungskinetik oder Alteration der Deaktivierungskinetik fand sich nicht (Abbildungen 17 C und D).

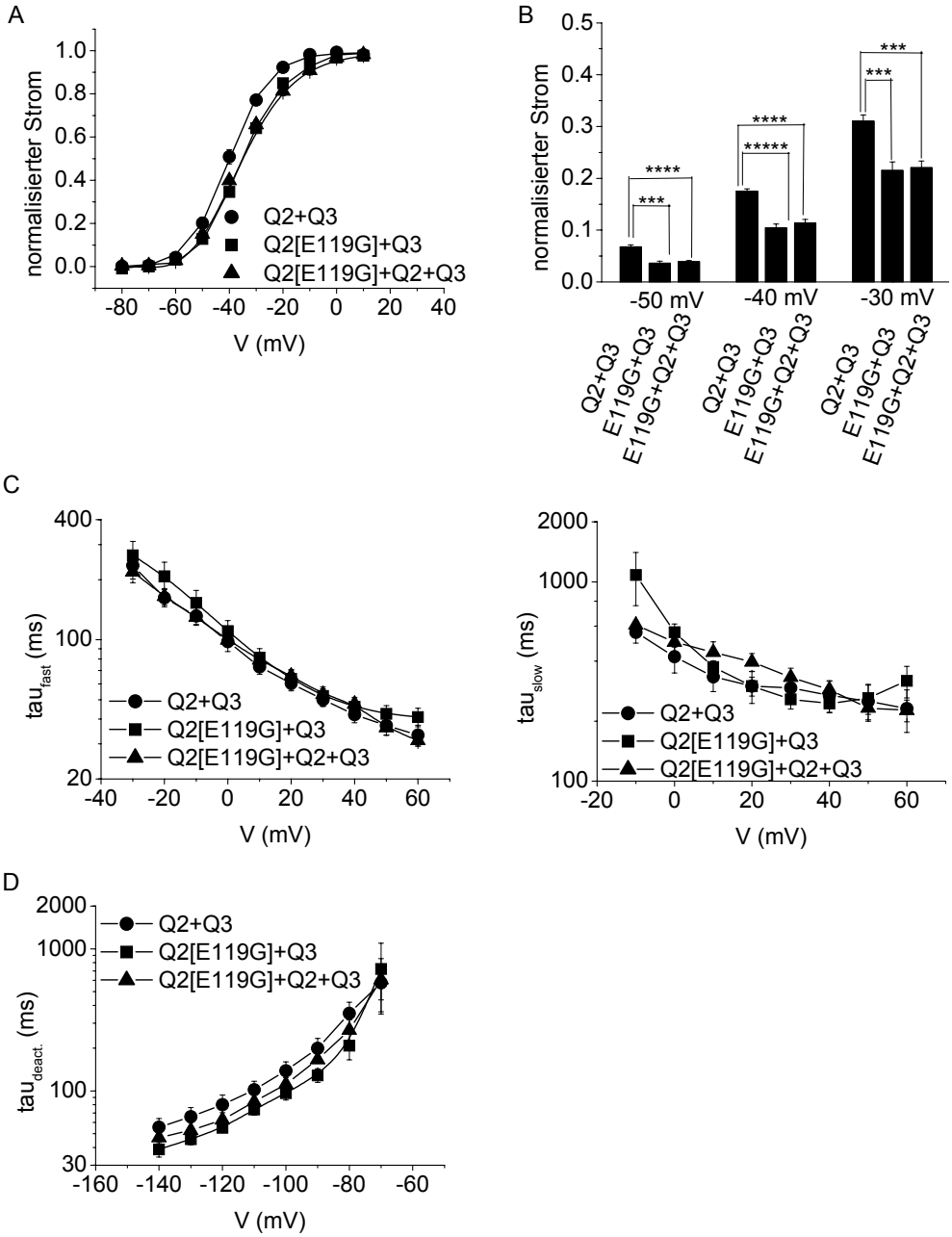

Abbildung 17. Funktionelle Analyse von heteromeren KCNQ2+KCNQ3 (Kv7.2+Kv7.3), Q2[E119G]+KCNQ3 und Q2[E119G]+KCNQ2+KCNQ3 Kanälen

A, Dargestellt sind Leitfähigkeits-Spannungskurven für heteromere KCNQ2+KCNQ3 (Q2+Q3), Q2[E119G]+KCNQ3 (E119G+Q3) und Q2[E119G]+KCNQ2+KCNQ3 (E119G+Q2+Q3) Kanäle. Die Linien repräsentieren Standard Boltzmann Funktionen ($I/Imax(V)=1/(1+\exp[(V-V_{0.5})/k]$), die an die Datenpunkte angepasst wurden, wobei I/Imax den normalisierten Tail-Strom-Amplituden, $V_{0.5}$ der Spannung der halbmaximalen Aktivierung und k einem Steigungsfaktor entsprechen (siehe 2.4.4.1). Man sieht eine signifikante Rechtsverschiebung der Aktivierungskurven für die Coexpressionen von KCNQ3 (Q3) oder KCNQ2+KCNQ3 (Q2+Q3) mit der Mutation Q2[E119G] um 5.1 mV bzw. 3.8 mV im Vergleich zur Coexpression der WT-Kanäle KCNQ2+KCNQ3 (Q2+Q3) (n=5-6, $p < 0.01$ bzw. $p < 0.05$). B, Aufgetragen wurden die Stromamplituden für KCNQ2+KCNQ3

(Q2+Q3), Q2[E119G]+KCNQ3 (E119G+Q3) und Q2[E119G]+KCNQ2+KCNQ3 (E119G+Q2+Q3) für Potentiale im Subschwellenbereich zwischen -50 mV und -30 mV (siehe 2.4.4.3) (n=6). Es fällt eine signifikante Reduktion der zum Strommaximum normalisierten Stromamplituden von bis zu 46 % bzw. 42 % auf (*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ***** $p < 0.00001$, n=6). C, Die Zeitkonstanten (τ_{fast}, τ_{slow}) der Aktivierung wurden mit einer Exponentialfunktion zweiter Ordnung, die an den Zeitverlauf der Aktivierung angepasst wurde, ermittelt (siehe 2.4.4.4). Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Coexpressionen (n=5-6). D, Aufgetragen wurde die Deaktivierungskinetik für die Kanäle KCNQ2+KCNQ3 (Q2+Q3), Q2[E119G]+KCNQ3 (E119G+Q3) und Q2[E119G]+KCNQ2+KCNQ3 (E119G+Q2+Q3). Die Deaktivierungszeitkonstante $\tau_{deact.}$ wurde hierbei durch die Anpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung an den Tail-Strom für verschiedene Potentiale nach einer 1,5 s dauernden Depolarisation auf +50 mV ermittelt (siehe 2.4.4.4). Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Coexpressionen (n=5-6).

Zusammengefaßt demonstrieren diese Ergebnisse zum einen, dass bereits sehr geringe Veränderungen im Subschwellenbereich des Aktionspotentials krankheitsverursachend sein können und dass der Subschwellenbereich der relevante Potentialbereich für den KCNQ2 Kanal ist. Ferner wird die Wichtigkeit einer negativen Ladung in der S1-S2 Schleife für das spannungsabhängige Schaltverhalten gezeigt, in einer Region, die bisher als wenig funktionell bedeutsam für spannungsgesteuerte Ionenkanäle im allgemeinen eingeschätzt wurde.

4 DISKUSSION

4.1 Charakterisierung der Bindungsstelle von Retigabin am KCNQ2 (Kv7.2) Ionenkanal

4.1.1 Lokalisierung der Bindungsstelle

Zwei zentrale Ergebnisse unserer Versuche weisen darauf hin, dass die zytoplasmatischen Anteile der S5 und S6 Segmente die Bindungsstelle von Retigabin bilden. Erstens ergaben unsere Arbeiten, dass zwei Aminosäuren, die in diesen beiden Helices lokalisiert sind, eine ausschlaggebende Rolle bei der Aktivierung von KCNQ2 durch Retigabin spielen: das Tryptophan W236 im zytoplasmatischen Anteil von S5, und das Glycin G301, das der Gelenkstelle für das Aktivierungstor im zytoplasmatischen Anteil von S6 entspricht. Um diese funktionellen Ergebnisse mit der möglichen Struktur des Kanals zu korrelieren, entwickelten wir Homologiemodelle für die S5-S6 Region von KCNQ2 sowohl für den geschlossenen als auch für den offenen Zustand. Diese wurden von den Kristallstrukturen des KcsA (geschlossene Konformation, Doyle et al., 1998) und MthK (offene Konformation, Jiang et al., 2002) Kanals (siehe 2.5) abgeleitet. Wie in Abbildung 14 dargestellt, wies der Vergleich beider Kanalkonformationen auf die Ausbildung einer hydrophoben Tasche zwischen den zytoplasmatischen Teilen von S5 und S6 während der Öffnung des Kanals hin. In diese konnte das energie-optimierte Retigabin Molekül manuell eingepasst werden. Die Tasche wurde durch eine Beugung der S6 Helix an der Position der Gelenkstelle des Aktivierungstors und eine simultane Konformationsänderung von S5 (Abbildungen 14A, B und C) induziert. Im Gegensatz dazu würde die parallele Orientierung der S5 und S6 Helices im Falle des geschlossenen Kanals die Retigabin Bindung verhindern (Abbildung 14A). Das Modell gibt Anhalt für eine spezifische lipophile Interaktion zwischen dem Fluorophenylring von Retigabin und dem aromatischen W236 (Abbildung 14B). Dies lässt sich sehr gut mit unseren elektrophysiologischen Experimenten, in denen die Wirkung von Retigabin am KCNQ2 Kanal durch die Punktmutation Q2[W236L]Q1 aufgehoben wurde, in Einklang bringen. Des weiteren illustriert das Modell, dass die Flexibilität der S6 Helix an Position des Angelpunkts (G301) essentiell für die Ausbildung der Bindungstasche ist, was

auch funktionell von unseren elektrophysiologischen Ergebnissen gestützt wurde. Hierbei zeigten wir, dass 1) durch Einführung des kompletten S6 Segments von KCNQ2 in KCNQ1 und insbesondere 2) durch Einführen eines Glycins an Position der Gelenkstelle in die Q2[S6]Q1 Chimäre eine Retigabin Wirkung erzielt werden kann. Darüber hinaus unterstreicht die relativ gesteigerte Retigabin Sensitivität von Q2[F304A] die Wichtigkeit der Helix distal des G301. Aufgrund der Flexibilität des Retigabinmoleküls und der Tatsache, dass die Ableitung der Kanalstruktur für KCNQ2 von MthK und KcsA mit Ungenauigkeiten insbesondere in den zytoplasmatischen Anteilen verbunden ist, muss dieses Modell jedoch mit Vorsicht interpretiert werden.

4.1.2 Biophysikalischer Mechanismus der Kanalaktivierung durch Retigabin

Zum zweiten stützt der biophysikalische Mechanismus der Aktivierung von KCNQ2 unsere Hypothese, dass die Retigabin Bindungsstelle zwischen den zytoplasmatischen Anteilen der S5 und S6 Segmente lokalisiert ist. Die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskurve in hyperpolarisierender Richtung lässt sich sehr gut durch eine Stabilisierung der offenen Konformation infolge der Bindung von Retigabin in dieser Region erklären. Solch eine Verschiebung der Aktivierungskurve wird im Allgemeinen entweder durch eine direkte Beeinflussung des Spannungssensors oder alternativ seiner Kopplung mit der Porenöffnung (z.B. Beeinflussung des Aktivierungstors) hervorgerufen. Ein Beispiel für letzteres wurde in einer kürzlich von Zhao et al. (2004) veröffentlichten Studie gegeben, die für einen bakteriellen Kanal zeigte, dass eine Unterbrechung der helikalen Struktur und Reduktion der Flexibilität in S6 durch Ersetzen des Angelpunkt Glycins durch ein Prolin zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung um -51 mV führt. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für den Shaker Kaliumkanal gemacht werden, bei dem große Verschiebungen der spannungsabhängigen Kanalaktivierung durch Mutationen im Bereich des Aktivierungstores hervorgerufen werden konnten (Hackos et al., 2002). Somit kann die durch Retigabin induzierte hyperpolarisierende Verschiebung gut durch eine Bindung von Retigabin zwischen den S5 und S6 Segmenten, eine direkte Beeinflussung des Aktivierungstores und

eine daraus resultierende Stabilisierung der offenen Kanalkonformation erklärt werden. Auch die Verlangsamung der Deaktivierungs-Zeitkonstante durch Retigabin wird dadurch gut erklärt. Den für einige Mutanten beobachteten Veränderungen der Stromamplituden könnten Verringerungen oder Erhöhungen der Einzelkanalleitfähigkeit zugrunde liegen, was wiederum unsere Hypothese einer Bindung Retigabins im Porenbereich stützen würde. Die von uns beobachtete Verstärkung der Inaktivierung von Q1[S6]Q2 wurde bereits von Seebohm et al. (2001) beschrieben. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen für Shaker-ähnliche Kaliumkanäle, für die gezeigt werden konnte, dass Mutationen in der P-Region H5 als auch in S6 Veränderungen der Zeitabhängigkeit der Inaktivierung hervorrufen können (Hoshi et al., 1991).

4.1.3 Das Retigabinmolekül wird nicht kooperativ gebunden

In einer parallelen Studie untersuchten Schenzer et al. (2005) die Bindung von Retigabin am KCNQ Kanal unter Verwendung von KCNQ3/KCNQ1 Chimären statt KCNQ2/KCNQ1, die wir verwendeten. Auch diese Untersuchungen bestätigten die Schlüsselrolle des Tryptophans in S5. Die Mutation von Tryptophan an dieser Stelle zum korrespondierenden Leucin in KCNQ1 führte zu einer deutlichen Reduktion der Retigabinsensitivität des Kanals. Bereits 2001 berechneten Tatulian et al. für die Dosis-Wirkungskurven von KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ2/KCNQ3 einen Hill-Koeffizienten von ca. 1 und postulierten somit eine nicht-kooperative Bindung des Retigabin Moleküls an diesen Kanälen. Da jede der vier Kanaluntereinheiten in einem Tetramer jedoch eine Bindungsstelle besitzt, spekulierten Schenzer et al. (2005), dass es sich bei der Bindung um einen Alles-oder-Nichts-Effekt handeln könnte und somit alle vier Untereinheiten Retigabin gebunden haben müssen, um eine Konformationsänderung des Kanals zu induzieren. Um diese Theorie zu stützen, erzeugten Schenzer et al. KCNQ1 Untereinheiten, die die C-terminale Interaktionsdomaine von KCNQ3 enthielten (KCNQ1-sid$_{Q3}$) und somit mit KCNQ2 Untereinheiten interagieren konnten. Nach Coexpression dieser mit KCNQ2 konnte ein nicht Retigabin-sensitiver Strom gemessen werden. Da diese Tetramere in unterschiedlicher Stöchiometrie vorliegen dürften, liegt nahe, dass bereits eine Retigabin-insensitive Untereinheit ausreicht, um die Retigabinwirkung zu reduzieren oder gar aufzuheben. Durch

Wiedereinführen des Tryptophans in die KCNQ1-sid$_{Q3}$ Untereinheit und Coexpression mit KCNQ2 ließ sich wieder eine Retigabin-Sensitivität der Heteromere erzeugen, wodurch die Theorie des Alles-oder-Nichts-Effekts gestützt wird. Auch unsere Messungen ergaben einen Hill Koeffizient von ca. 1 für die Retigabinbindung am KCNQ2 Kanal und sind somit mit diesen Ergebnissen vereinbar. Allerdings wäre darauf basierend und bei weiterhin bestehender Unklarheit über die genaue stöchiometrische Zusammensetzung der Heteromere auch weiterhin zu diskutieren, dass die Bindung eines einzigen Retigabinmoleküls im tetramerischen KCNQ2 Kanal ausreichen könnte, um die postulierte Konformationsänderung des Kanals zu induzieren und somit zu einer Kanalöffnung zu führen. Zur schlussendlichen Klärung könnten Experimente mit Tandem-Konstrukten, bestehend aus einer KCNQ2 und einer KCNQ1-sid$_{Q3}$ Untereinheit, beitragen.

4.1.4 Kaliumkanalaktivierung als neuer antikonvulsiver Mechanismus

Die Aktivierung eines Kaliumkanals im Bereich des Ruhemembranpotential, wie für Retigabin gezeigt (Main et al., 2000; Rundfeldt und Netzer, 2000; Wickenden et al., 2000 und diese Studie), ist ein sehr potenter antikonvulsiver Mechanismus, da das Ruhepotential in Richtung des Kaliumgleichgewichtpotentials stabilisiert wird. Keines der sich aktuell in klinischer Anwendung befindenden Antikonvulsiva wirkt über diesen Mechanismus. Die antikonvulsive Wirksamkeit Retigabins konnte in verschiedensten Anfallsmodellen gezeigt werden (Rostock et al., 1996; Tober et al., 1996; Armand et al., 1999, 2000; Dost und Rundfeldt, 2000). Daher könnten Retigabin, seine Derivate oder andere Substanzen mit ähnlichen Effekten auf neuronale Kaliumkanäle der KCNQ Familie in Zukunft als eine wirkungsvolle Medikation zur Behandlung der Epilepsie eingesetzt werden. Auch für die Behandlung anderer Erkrankungen, die mit einer Membrandepolarisation und Hyperexzitabilität des Nervensystems wie z.B Migräne, neuropathischer Schmerz und Schlaganfall einhergehen, wäre Retigabin eine viel versprechende Substanz. Die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus solcher Substanzen, wie hier für Retigabin gezeigt, trägt zum besseren Verständnis von Medikamenten-Rezeptor-Interaktionen bei und leistet einen wichtigen Beitrag bei der Entwicklung

noch spezifischerer und wirkungsvollerer Substanzen mit weniger Nebenwirkungen.

4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung einer neuen KCNQ2 (Kv7.2) Mutation bei neonataler Epilepsie (BFNC)

4.2.1 Pathophysiologischer Mechanismus der Q2[E119G] Mutation

Wir identifizierten eine neue Mutation in der extrazellulären S1-S2 Schleife des KCNQ2 Kanals in einer Familie mit neonataler Epilepsie. Die funktionelle Expression in Xenopus Oozyten ergab Hinweise auf Veränderungen im Schaltverhalten des Kanals, die sowohl zu einer Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve bei leichtgradig vergrößertem Steigungsfaktor und somit zu einer Reduktion der Stromamplitude vor allem im Subschwellenbereich als auch zu einer Parallelverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstanten hin zu positiveren Potentialen führt. Unsere Untersuchungen zeigen zum einen, dass bereits sehr geringe Veränderungen im Subschwellenbereich des Aktionspotentials krankheitsverursachend sein können und dass dies der relevante Potentialbereich für den KCNQ2 Kanal ist. Ferner wird die Wichtigkeit einer negativen Ladung in der S1-S2 Schleife für das spannungsabhängige Schaltverhalten gezeigt, in einer Region, die bisher als wenig funktionell bedeutsam für spannungsgesteuerte Ionenkanäle im allgemeinen eingeschätzt wurde.

In der Vergangenheit wurden mehrere BFNC Mutationen beschrieben, die das spannungsabhängige Schaltverhalten von KCNQ2 Kanälen verändern. Die beiden Punktmutationen R207W und R214W, die im S4 Transmembransegment lokalisiert sind und zu einem Aminosäureaustausch führen, resultieren in deutlichen depolarisierenden Verschiebungen der Aktivierungskurven um +30 mV bzw. +15 mV. Diese Effekte sind von einer ausgeprägten Verlangsamung der Aktivierungskinetik begleitet (Dedek et al., 2001, Castaldo et al., 2002), die mit der Funktion des S4 Segments als Spannungssensor konsistent ist. Eine weitere BFNC Mutation, die die Spannungsabhängigkeit des KCNQ2 Kanals beeinflusst und zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve um ca. 10 mV führt, ist im C-Terminus der Kanaluntereinheiten lokalisiert. Dieser Effekt könnte möglicherweise

durch Auswirkungen der Mutation auf die regulatorische Proteinbindung am KCNQ2 C-Terminus erklärt sein (Borgatti et al., 2004). Einige Mutationen, die von Singh et al. (2003) beschrieben wurden, zeigten ähnliche, aber weniger ausgeprägte Effekte auf das Schaltverhalten der Kanäle. Diese Mutationen induzierten eine Parallelverschiebung der Aktivierungskurve über die gesamte Potentialspanne der Kanalaktivität hinweg. Im Gegensatz dazu zeigten KCNQ2 Kanäle mit der Mutation Q2[E119G] betont Veränderungen der Aktivierungskinetik für Potentiale zwischen -50 und -30 mV, wobei andere Parameter wie z.B. die maximalen Stromaplituden sowohl der homomeren KCNQ2 als auch der heteromereren KCNQ2/KCNQ3 Kanäle unbeeinflusst blieben. Hieraus lässt sich ableiten, dass die funktionelle Expression der Kanalproteine in der Zellmembran nicht modifiziert wird. In der Vergangenheit wurde bereits postuliert, dass der M-Strom eine wichtige Rolle bei der Regulation neuronaler Exzitabilität und Antwortmustern des Neurons im Subschwellenbereich spielt, also in einem Membranpotentialbereich, in dem nur wenige andere Ionenkanäle aktiv sind (Jentsch, 2000, Brown und Adams, 1980, Rogawski, 2000, Delmas und Brown, 2005). Die pathophysiologischen Ergebnisse, die hier beschrieben wurden, untermauern diese Hypothese, indem sie die pathogenetische Rolle dieses nicht-inaktivierenden Kaliumkanals als einen Regulator neuronalen Feuerns im unterschwelligen Spannungsbereich aufzeigen.

KCNQ2 Untereinheiten interagieren mit KCNQ3 Untereinheiten über ihre C-Termini, was in einem starken Zuwachs der Stromamplitude in in-vitro Systemen resultiert (Yang et al., 1998, Schwake et al., 2003, Maljevic et al., 2003, Selyanko et al., 2000) und nahe legt, dass diese Interaktion eine wichtige Rolle in vivo bei der Regulation der Exzitabilität des Gehirns spielt. Die neuronalen Expressionsmuster von KCNQ2 und KCNQ3 Kanälen sind jedoch nicht vollständig geklärt und Ergebnisse bereits publizierter Studien weisen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf (Cooper et al., 2000, Roche et al., 2002, Devaux et al., 2004, Weber et al., 2006, Geiger et al., 2006). Nach Coexpression der mutierten und der WT KCNQ2 Kanäle mit KCNQ3 in Oozyten im Verhältnis 1:1 oder 1:1:2, um die Situation eines heterozygot betroffenen Individuums zu simulieren, waren die Effekte der Mutation nur noch in abgeschwächter Form vorhanden. Aufgrund dieser Tatsache könnte man spekulieren, dass die durch die Mutation hervorgerufenen Veränderungen des

Schaltverhaltens der Kanäle im Falle der Coexpression zu gering wären, um die Genese der Anfälle zu erklären. Es ist aber möglich, dass die Messungen in Oozyten und die daraus resultierenden Ergebnisse nicht genau die neuronale Umgebung in der in-vivo Situation reflektieren und insbesondere die Coexpression beider Kanaluntereinheiten im Gehirn variabel sein könnte, möglicherweise im Sinne eines größeren Anteils von KCNQ2 als KCNQ3 Untereinheiten in Neuronen. Dies könnte eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Entstehung von Anfallsaktivität spielen. Darüber hinaus wären funktionelle Veränderungen in Neuronen, die ausschließlich KCNQ2 Kanäle exprimieren, möglicherweise bereits ausreichend, um BFNC zu verursachen. Allerdings spricht hier die Tatsache dagegen, dass auch seltene Mutationen in KCNQ3 Kanälen dieselbe Erkrankung auslösen können.

4.2.2 Die Q2[E119G] Mutation führt zum Verlust einer negativen Ladung

Die Q2[E119G] Mutation liegt in der extrazellulären S1-S2 Schleife des KCNQ2 Kanals und führt durch den Austausch des in KCNQ2 und KCNQ3 Kanälen konservierten Glutamats an Position 119 gegen ein Glycin zu einem Ladungsverlust in dieser Region. In spannungsgesteuerten Kalium-Shaker Kanälen konnte in der Vergangenheit bereits überzeugend eine Interaktion zwischen negativen Ladungen im S2 Segment und den positiven Ladungen des Spannungssensors im S4 Segment gezeigt werden. Diese negativen Ladungen leisten einen erheblichen Beitrag zur Ladungsbewegung, die die Kanalöffnung begleitet (Papazian et al., 1995). Andere funktionelle Studien (Monks et al., 1999) und die Kristallstruktur eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals (Long et al., 2005) bestätigten eine Interaktion des S2 und S4 Segments bei der Kanalöffnung bzw. -schließung.

4.2.3 Die benachbarte Mutation Q2[S122L] führt zu weitgehend parallelen Veränderungen des Schaltverhaltens des KCNQ2 Kanals

Vor kurzem wurde in unserem Labor eine weitere Mutation Q2[S122L] (S122L) elektrophysiologisch charakterisiert, die sich nur 3 Aminosäuren entfernt von der hier untersuchten Mutation nahe des extrazellulären Endes des S2 Segments

befindet. Die hierzu durchgeführten Experimente ergaben in weiten Strecken parallele Ergebnisse. Insbesondere konnte auch für Q2[S122L] eine Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve bei vergrößertem Steigungsfaktor sowie eine Verlangsamung der Aktivierungskinetik gezeigt werden, die im Wesentlichen zu einer Verringerung der Stromamplitude im Subschwellenbereich führten (Hunter et al., 2006, Neurobiol, in revision).

4.2.4 Der Subschwellenbereich als relevanter Potentialbereich für den KCNQ2 Kanal

Unsere Ergebnisse demonstrieren die Wichtigkeit einer negativen Ladung, die in einer bisher funktionell für wenig bedeutsam gehaltenen Region, der S1-S2 Schleife, gelegen ist, für das spannungsabhängige Schaltverhalten des Kanals. Die negativ geladene Aminosäure E119 könnte eine ähnliche Rolle spielen, wie Glutaminsäuren im S2 Segment des Shaker Kaliumkanals. Eine Veränderung der Ladung, wie sie hier durch die Punktmutation Q2[E119G] hervorgerufen wird, könnte durch eine daraus resultierende beinträchtigte Interaktion zwischen S1-S2 und dem S4 Segment die Spannungsabhängigkeit des KCNQ2 Kanals beeinflussen und so zu dem beobachteten veränderten Schaltverhalten des mutierten Kanals führen. Im Vergleich zu anderen Mutationen, die z.B. zu einem verkürzten Kanalprotein und zu einer starken Reduktion des Maximalstroms führen, handelt es sich hier um eher diskrete Veränderungen, die vor allem den Subschwellenbereich des Aktionspotentials betreffen. Dennoch scheinen diese bereits krankheitsverursachend zu sein, so dass postuliert werden kann, dass gerade der Subschwellenbereich den relevanten Potentialbereich für den KCNQ2 Kanal repräsentiert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen und betrifft etwa 0.5 bis 1 % der Bevölkerung. Während 60 bis 80 % der Epilepsiepatienten gut mit derzeit auf dem Markt verfügbaren Antikonvulsiva behandelt werden können, sind ca. 30% pharmakoresistent. Daher ist es notwendig, neue Antikonvulsiva mit innovativen Wirkmechanismen zu entwickeln. Retigabin, eine neue antikonvulsive Substanz, erfüllt als Kaliumkanalöffner diese Kriterien sehr gut. Diese Arbeit hatte zum Ziel: (i) den molekularen Wirkmechanismus von Retigabin am KCNQ2 Kaliumkanal aufzuklären, und (ii) eine elektrophysiologische Charakterisierung einer neuen Mutation in einer bisher nicht betroffenen Region des KCNQ2 Kanals vorzunehmen, die in einer Familie mit benignen familiären neonatalen Konvulsionen gefunden wurde.

(i) Retigabin ist eine neue antikonvulsive Substanz, die im Vergleich zu den derzeit in klinischem Gebrauch befindlichen Antikonvulsiva über einen neuartigen Wirkmechanismus verfügt. Retigabin bindet an neuronale KCNQ Kanäle und aktiviert diese durch Induktion einer ausgeprägten Verschiebung ihrer Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskurve in hyperpolarisierender Richtung. Die Bindungsstelle und der molekulare Wirkmechanismus waren bisher unbekannt. Um die strukturellen Determinanten der KCNQ2 Aktivierung durch Retigabin zu identifizieren, konstruierten wir eine Vielzahl chimärer Kanäle unter Verwendung des neuronalen, Retigabin-sensitiven KCNQ2 Kanals, und des kardialen, Retigabin-insensitiven KCNQ1 Kanals. Diese wurden heterolog in Xenopus Oozyten exprimiert und mittels der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme elektrophysiologisch charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass der Ersatz des S5 oder des S6 Segments des KCNQ2 Kanals durch das entsprechende Stück des KCNQ1 Kanals zum kompletten Wirkverlust von Retigabin führt. Um die Bindungsstelle weiter einzugrenzen wurden in der Folge kleinere Stücke und einzelne Aminosäuren in diesen Bereichen ausgetauscht. Hierbei fand sich, dass das Tryptophan236 im zytoplasmatischen Anteil des S5 Segments des KCNQ2 Kanals sowie das in KCNQ2 bis KCNQ5 konservierte Glycin301 im S6 Segment des KCNQ2 Kanals eine Schlüsselrolle bei der Bindung und Wirkung von Retigabin spielen. Das Glycin301 wird derzeit als Gelenkstelle für das Tor des Ionenkanals gesehen, dem eine elementare Funktion bei der

Kanalöffnung zukommt. Die Mutation dieser beiden Aminosäuren zu den jeweils korrespondierenden Aminosäuren konnte entweder die Wirkung von Retigabin auf den KCNQ2 Kanal ausschalten oder sie wieder in chimären KCNQ2/KCNQ1 Kanälen einführen. In Zusammenschau der elektrophysiologischen Ergebnisse mit einem von uns entwickelten Homologie-Strukturmodell des KCNQ2 Kanals in der offenen und geschlossenen Konformation postulieren wir die Ausbildung einer hydrophoben Tasche zwischen den intrazellulären Anteilen der S5 und S6 Segmente während der Kanalöffnung. In diese Tasche konnte das Retigabinmolekül unter Berücksichtigung der möglichen Interaktion mit dem Tryptophan236 im Computermodell manuell eingepasst werden. Durch eine derartige Bindung ist eine Stabilisierung der Offenkonformation mit einer Linksverschiebung der Aktivierungskurve des Kanals gut erklärt.

(ii) Benigne familiäre neonatale Konvulsionen (BFNC) ist eine seltene autosomal dominante Form der Epilepsie des Neugeborenen. Sie wird durch Mutationen in Genen hervorgerufen, die für die Untereinheiten der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle KCNQ2 und KCNQ3 kodieren. Eine neue BFNC auslösende Mutation (Q2[E119G]), die zum Verlust einer negativen Ladung in einer bisher nicht durch Mutationen betroffenen Region des KCNQ2 Kanals führt, der extrazellulären S1-S2 Schleife, war Gegenstand dieser Studie. Elektrophysiologisch fand sich eine Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve bei leichtgradig vergrößertem Steigungsfaktor, die zu einer signifikanten Reduktion der normalisierten Stromamplituden im Subschwellenbereich zwischen -50 und -30 mV um bis zu 44% führte. Zudem war die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten um ca. 10 mV in depolarisierender Richtung verschoben, was zu einer Verlangsamung der Kanal-Aktivierung führte. Im Gegensatz zu anderen Mutationen handelt es sich hier um diskrete Veränderungen. Unsere Untersuchungen demonstrieren jedoch zum einen, dass offenbar bereits sehr geringe Veränderungen im Subschwellenbereich des Aktionspotentials krankheitsverursachend sein können und zum anderen, dass dies der relevante Potentialbereich für den KCNQ2 Kanal ist. Ferner wird die Wichtigkeit einer negativen Ladung in der S1-S2 Schleife für das spannungsabhängige Schaltverhalten des Kanals gezeigt, in einer Region, die bisher als wenig funktionell bedeutsam für spannungsgesteuerte Ionenkanäle im allgemeinen eingeschätzt wurde.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aiken Sp, Lampe Bj, Murphy Pa, Brown Bs: Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer. Br J Pharmacol 115: 1163-8 (1995)

Armand V, Rundfeldt C, Heinemann U: Effects of Retigabin (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat entorhinal cortex hippocampal slices. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 359: 33-9 (1999)

Armand V, Rundfeldt C, Heinemann U: Effects of Retigabin (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by low magnesium in rat entorhinal cortex hippocampal slices. Epilepsia 41: 28-33 (2000)

Bezanilla F: The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. Physiol Rev 80: 555-92 (2000)

Biervert C, Schroeder Bc, Kubisch C, Berkovic Sf, Propping P, Jentsch Tj, Steinlein Ok: A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. Science 279: 403-6 (1998)

Biervert C, Steinlein Ok: Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. Hum Genet 104: 234-40 (1999)

Bleich M, Warth R: The very small-conductance K+ channel KvLQT1 and epithelial function. Pflugers Arch 440: 202-6 (2000)

Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, Soldovieri Mv, Baschirotto C, Bresolin N, Dalla Bernardina B, Taglialatela M, Bassi Mt: A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. Neurology 63: 57-65 (2004)

Brown Bs, Yu Sp: Modulation and genetic identification of the M channel. Prog Biophys Mol Biol 73: 135-66 (2000)

Brown Da, Adams Pr: Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K^+ current in a vertebrate neurone. Nature 283: 673-6 (1980)

Cannon Sc: Spectrum of sodium channel disturbances in the nondystrophic myotonias and periodic paralyses. Kidney Int 57: 772-9 (2000)

Castaldo P, Del Giudice Em, Coppola G, Pascotto A, Annunziato L, Taglialatela M: Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. J Neurosci 22: RC199 1-6 (2002)

Catterall Wa: From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron 26: 13-25 (2000)

Charlier C, Singh Na, Ryan Sg, Lewis Tb, Reus Be, Leach Rj, Leppert M: A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. Nat Genet 18: 53-5 (1998)

Cole K: Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. Arch Sci Physiol 3, 253-8 (1949)

Cooper Ec, Aldape Kd, Abosch A, Barbaro Nm, Berger Ms, Peacock Ws, Jan Yn, Jan Ly: Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 4914-9 (2000)

Dascal N: The use of Xenopus oocytes for the study of ion channels CRC Crit Rev Biochem. 22: 317-87 (1987)

Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch Tj, Steinlein Ok: Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K^+ channel. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 12272-7 (2001)

Delmas P, Brown Da: Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. Nat Rev Neurosci 6: 850-62 (2005)

Devaux Jj, Kleopa Ka, Cooper Ec, Scherer Ss: KCNQ2 is a nodal K^+ channel. J Neurosci 24: 1236-44 (2004)

Dost R, Rundfeldt C: The anticonvulsant Retigabin potently suppresses epileptiform discharges in the low Ca^{++} and low Mg^{++} model in the hippocampal slice preparation. Epilepsy Res 38: 53-66 (2000)

Doyle Da, Morais Cabral J, Pfuetzner Ra, Kuo A, Gulbis Jm, Cohen Sl, Chait Bt, Mackinnon R: The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. Science 280: 69-77 (1998)

Gamper N, Shapiro Ms: Calmodulin mediates Ca^{2+}-dependent modulation of M-type K^+ channels. J Gen Physiol 122: 17-31 (2003)

Geiger J, Weber YG, Landwehrmeyer B, Sommer C, Lerche H: Immunohistochemical analysis of KCNQ3 potassium channels in mouse brain. Neurosci Lett 400: 101-4 (2006)

Guex N, Peitsch Mc: SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18: 2714-23 (1997)

Gurdon Jb, Lane Cd, Woodland Hr, Marbaix G: Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature 233: 177-82 (1971)

Gutman Ga, Chandy Kg, Adelman Jp, Aiyar J, Bayliss Da, Clapham De, Covarriubias M, Desir Gv, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia Ml, Grissmer S, Jan Ly, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester Ha, Mckinnon D, Nichols Cg, O'kelly I, Robbins J, Robertson Ga, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun Mm, Vandenberg Ca, Wei A, Wulff H, Wymore Rs: International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. Pharmacol Rev 55: 583-6 (2003)

Hackos Dh, Chang Th, Swartz Kj: Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K^+ channel. J Gen Physiol 119: 521-32 (2002)

Hauser Wa, Annegers Jf, Rocca Wa: Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. Mayo Clin Proc 71: 576-86 (1996)

Heginbotham L, Abramson T, Mackinnon R: A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K^+ channels. Science 258: 1152-5 (1992)

Hille B: Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. Third Edition (2001)

Hirose S, Zenri F, Akiyoshi H, Fukuma G, Iwata H, Inoue T, Yonetani M, Tsutsumi M, Muranaka H, Kurokawa T, Hanai T, Wada K, Kaneko S, Mitsudome A: A novel mutation of KCNQ3 (c.925T-->C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. Ann Neurol 47: 822-6 (2000)

Hodgkin A, Huxley A, Katz B: Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J Physiol 116: 424-48 (1952)

Hoshi T, Zagotta Wn, Aldrich Rw: Two types of inactivation in Shaker K^+ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. Neuron 7: 547-56 (1991)

Hunter J, Maljevic S, Shankar A, Siegel A, Weissman B, Holt P, Olson L, Lerche H, Escayg A: Subthreshold changes of voltage-dependent activation of the KV7.2 channel in neonatal epilepsy. Neurobiol, in revision (2006)

Jentsch Tj: Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. Nat Rev Neurosci/ 1: 21-30 (2000)

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait Bt, Mackinnon R: The open pore conformation of potassium channels. Nature 417: 523-6 (2002)

Kharkovets T, Hardelin Jp, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, Jentsch Tj: KCNQ4, a K^+ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 4333-8 (2000)

Krieg Pa, Melton Da: Formation of the 3' end of histone mRNA by post-transcriptional processing. Nature 308: 203-6 (1984)

Kubisch C, Schroeder Bc, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch Tj: KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. Cell 96: 437-46 (1999)

Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K: Voltage-gated ion channels and hereditary disease. Physiol Rev 79: 1317-72 (1999)

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

Lerche H, Biervert C, Alekov Ak, Schleithoff L, Lindner M, Klinger W, Bretschneider F, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Bode H, Lehmann-Horn F, Steinlein Ok: A reduced K^+ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. Ann Neurol 46: 305-12 (1999)

Liman Er, Tytgat J, Hess P: Subunit stoichiometry of a mammalian K+ channel determined by construction of multimeric cDNAs. Neuron 9: 861-71 (1992)

Long Sb, Campbell Eb, Mackinnon R: Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel. Science 309: 897-903 (2005)

Lorenz C, Pusch M, Jentsch Tj: Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 13362-6 (1996)

Loscher W: New visions in the pharmacology of anticonvulsion. Eur J Pharmacol 342: 1-13 (1998)

Mackinnon R: Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. Nature 350: 232-5 (1991)

Main Mj, Cryan Je, Dupere Jr, Cox B, Clare Jj, Burbidge Sa: Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant Retigabin. Mol Pharmacol 58: 253-62 (2000)

Maljevic S, Lerche C, Seebohm G, Alekov Ak, Busch Ae, Lerche H: C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K^+ channels. J Physiol 548: 353-60 (2003)

Marrion Nv: Does r-EAG contribute to the M-current? Trends Neurosci 20: 243-4 (1997)

Miledi R, Parker I, Sumikawa K: Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in Xenopus oocytes. Proc R Soc Lond B Biol Sci 218: 481-4 (1983)

Monks Sa, Needleman Dj, Miller C: Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the Shaker K^+ channel. J Gen Physiol 113: 415-23 (1999)

Mullis Kb, Faloona Fa: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-50 (1987)

Otto Jf, Kimball Mm, Wilcox Ks: Effects of the anticonvulsant Retigabin on cultured cortical neurons: changes in electroresponsive properties and synaptic transmission. Mol Pharmacol 61: 921-7 (2002)

Papazian Dm, Shao Xm, Seoh Sa, Mock Af, Huang Y, Wainstock Dh: Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K^+ channel. Neuron 14: 1293-301 (1995)

Ptacek Lj: Ion channel diseases: episodic disorders of the nervous system. Semin Neurol 19: 363-9 (1999)

Roche Jp, Westenbroek R, Sorom Aj, Hille B, Mackie K, Shapiro Ms: Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K^+ channels. Br J Pharmacol 137: 1173-86 (2002)

Rogawski Ma: KCNQ2/KCNQ3 K^+ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. Trends Neurosci 23: 393-8 (2000)

Rostock A, Tober C, Rundfeldt C, Bartsch R, Engel J, Polymeropoulos Ee, Kutscher B, Loscher W, Honack D, White Hs, Wolf Hh: D-23129: a new

anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. Epilepsy Res 23: 211-23 (1996)

Rundfeldt C: Characterization of the K^+ channel opening effect of the anticonvulsant Retigabin in PC12 cells. Epilepsy Res 35: 99-107 (1999)

Rundfeldt C, Netzer R: The novel anticonvulsant Retigabin activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells tranfected with human KCNQ2/3 subunits. Neurosci Lett 282: 73-6 (2000)

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: Molecular Cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. Second Edition (1989).

Sanger F, Nicklen S, Coulson Ar: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology 24: 104-8 (1992)

Schenzer A, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch Tj, Grotzinger J, Schwake M: Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K^+ channel sensitivity to the anticonvulsant Retigabin. J Neurosci 25: 5051-60 (2005)

Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O: A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. Embo J 19: 332-40 (2000)

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

Schroeder Bc, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch Tj: KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. J Biol Chem 275: 24089-95 (2000)

Schwake M, Jentsch Tj, Friedrich T: A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K^+ channel assembly. EMBO Rep 4: 76-81 (2003)

Seebohm G, Scherer Cr, Busch Ae, Lerche C: Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome. J Biol Chem 276: 13600-5 (2001)

Selyanko Aa, Hadley Jk, Wood Ic, Abogadie Fc, Jentsch Tj, Brown Da: Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M1 muscarinic acetylcholine receptors. J Physiol 522: 349-55 (2000)

Shapiro Ms, Roche Jp, Kaftan Ej, Cruzblanca H, Mackie K, Hille B: Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K^+ channels that underlie the neuronal M current. J Neurosci 20: 1710-21 (2000)

Singh Na, Charlier C, Stauffer D, Dupont Br, Leach Rj, Melis R, Ronen Gm, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy Jv, Mcharg Ml, Gagnon D, Rosales To, Peiffer A, Anderson Ve, Leppert M: A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. Nat Genet 18: 25-9 (1998)

Singh Na, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson Ve, Sanguinetti Mc, Leppert Mf: KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. Brain 126: 2726-37 (2003)

Straub H, Kohling R, Hohling J, Rundfeldt C, Tuxhorn I, Ebner A, Wolf P, Pannek H, Speckmann E: Effects of Retigabin on rhythmic synchronous activity of human neocortical slices. Epilepsy Res 44: 155-65 (2001)

Tatulian L, Delmas P, Abogadie Fc, Brown Da: Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug Retigabin. J Neurosci 21: 5535-45 (2001)

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

Tober C, Rostock A, Rundfeldt C, Bartsch R: D-23129: a potent anticonvulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. Eur J Pharmacol 303: 163-9 (1996)

Wang Hs, Pan Z, Shi W, Brown Bs, Wymore Rs, Cohen Is, Dixon Je, Mckinnon D: KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. Science 282: 1890-3 (1998)

Wang Q, Curran Me, Splawski I, Burn Tc, Millholland Jm, Vanraay Tj, Shen J, Timothy Kw, Vincent Gm, De Jager T, Schwartz Pj, Toubin Ja, Moss Aj, Atkinson Dl, Landes Gm, Connors Td, Keating Mt: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. Nat Genet 12: 17-23 (1996)

Weber YG, Geiger J, Kämpchen K, Landwehrmeyer B, Sommer C, Lerche H: Immunohistochemical analysis of KCNQ2 potassium channels in adult and developing mouse brain. Brain Res 1077: 1-6 (2006).

Wickenden Ad, Yu W, Zou A, Jegla T, Wagoner Pk: Retigabin, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. Mol Pharmacol 58: 591-600 (2000)

Yang Wp, Levesque Pc, Little Wa, Conder Ml, Ramakrishnan P, Neubauer Mg, Blanar Ma: Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. J Biol Chem 273: 19419-23 (1998)

Yellen G: The voltage-gated potassium channels and their relatives. Nature 419: 35-42 (2002)

Zaczek R, Chorvat Rj, Saye Ja, Pierdomenico Me, Maciag Cm, Logue Ar, Fisher Bn, Rominger Dh, Earl Ra: Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone and 10,10-bis(2-fluoro-4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone: comparison to linopirdine. J Pharmacol Exp Ther 285: 724-30 (1998)

Zhao Y, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T, Catterall Wa: A gating hinge in Na+ channels; a molecular switch for electrical signaling. Neuron 41: 859-65 (2004)

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1.Benigne familiäre Neugeborenenkonvulsionen (BFNC) auslösende Mutationen in den KCNQ2/KCNQ3 Untereinheiten. 10
Abbildung 2. Strukturformel von Retigabin. 12
Abbildung 3. Einführung einer Punktmutation mittels Poymerase Kettenreaktion (PCR)..28
Abbildung 4. Einführung einer Punktmutation mittels Overlap Polymerase Kettenreaktion (PCR). 30
Abbildung 5. Multistep Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Konstruktion von Chimären. 32
Abbildung 6. Weiblicher Xenopus laevis Frosch. 34
Abbildung 7. Oozyten im Stadium VI. 34
Abbildung 8. Diagramm der Zwei-Mikroelektroden-Spannungs-Klemm Methode (TEVC). 36
Abbildung 9. Wirkungen von Retigabin auf KCNQ1 (Q1, Kv7.1) WT und KCNQ2 (Q2, Kv7.2) WT Kanäle. 44
Abbildung 10. Sequenzvergleich der Porenregionen der KCNQ1 bis KCNQ5 (Kv7.1 bis Kv7.5), Shaker, KcsA, und MthK Kanäle. 45
Abbildung 11. Aufheben des Retigabin Effekts in KCNQ2 (Kv7.2). 46
Abbildung 12. Zusammenfassung der Retigabin Effekte für alle untersuchten Mutanten. 48
Abbildung 13. Einführen der Retigabin Wirkung in KCNQ1 (Kv7.1) oder KCNQ1/KCNQ2 (Kv7.1/Kv7.2) Chimären. 50
Abbildung 14. Computer Modell für die Bindung des Retigabin Moleküls in der Porenregion des KCNQ2 (Kv7.2) Kanals. 53
Abbildung 15. Absolute Stromamplituden von KCNQ2 (Kv7.2), Q2[E119G] und den Coexpressionen 56
Abbildung 16. Heterologe Expression von homomeren KCNQ2 (Kv7.2) Kanälen, Wildtyp und Q2[E119G] 57
Abbildung 17. Funktionelle Analyse von heteromeren KCNQ2+KCNQ3 (Kv7.2+Kv7.3), Q2[E119G]+KCNQ3 und Q2[E119G]+KCNQ2+KCNQ3 Kanälen 60

Tabelle 1. Strukturelle Klassifikation der spannungsgesteuerten Kaliumionenkanal α-Untereinheiten. 3
Tabelle 2. KCNQ Ionenkanalfamilie: Expressionsmuster und assoziierte Krankheiten. 5
Tabelle 3. Bekannte Gene, die bei idiopathischen Epilepsien Mutationen aufweisen. 8

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in den Abteilungen Angewandte Physiologie und Neurologie der Universität Ulm unter der Betreuung von PD Dr. Holger Lerche durchgeführt, dem ich allen voran für seine Unterstützung und Hilfe danken will.
Des weiteren möchte ich den beiden Leitern der Abteilungen Angewandte Physiologie und Neurologie, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. F. Lehmann-Horn und Herrn Prof. Dr. A.C. Ludolph, für ihre Anregungen und Unterstützung danken.
Mein besonderer Dank gilt auch insbesondere Dr. Snezana Maljevic und Dr. Alexi Alekov für ihre Hilfe und Geduld beim Erlernen der elektrophysiologischen und molekularbiologischen Methoden sowie ihre immer offenen Ohren bei all den Fragen und Problemen, mit denen ich während der Arbeit im Labor immer wieder konfrontiert wurde und zu kämpfen hatte. Meinen Dank möchte ich auch Sigrid Bail und Astrid Bellan-Koch aussprechen, die mir über die gesamte Zeit hinweg tatkräftig insbesondere bei der Mutagenese zur Seite gestanden sind. Weiterhin sei allen anderen Mitarbeitern aus der Lerche Arbeitsgruppe und aus der Abteilung für ihre Anregungen und Zusammenarbeit gedankt.
Dr. Guiscard Seebohm (Abteilung Physiologie, Universität Tübingen) möchte ich für sein Engagement beim Modeling der Bindungstasche, Dr. Christian Lerche (Sanofi Syntelabo, Deutschland) für das zur Verfügung stellen einiger der verwendeten Mutanten sowie Prof. Dr. Thomas Jentsch (Institut für Molekulare Neuropathobiologie, Universität Hamburg) für das zur Verfügung stellen der cDNA des humanen KCNQ2 und KCNQ3 Kanals danken. Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Karin Jurkat-Rott bedanken, von der wir die cDNA für die KCNQ2[E119G] Mutation erhalten haben.
Nicht zuletzt möchte ich Viatris GmbH und Co. KG, Radebeul, Deutschland, Xcel Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA sowie Valeant, Costa Mesa, CA, USA dankend erwähnen, von denen wir Retigabin erhalten haben.
Insbesondere danken möchte ich auch Dr. Michael Schiebe und dem Graduierten Kolleg 460 für die finanzielle Unterstützung sowie allen Mitgliedern des Graduierten Kollegs 460 für all die hilfreichen Diskussionen.
Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld aussprechen.

LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name:	Thomas Volkmar Wuttke
Geburtsdatum:	24.11.1977
Geburtsort:	München

Ausbildung:

1984 – 1997:	Schule
1997:	Abitur
1997 – 1998	Zivildienst im Rettungsdienst beim DRK in Biberach an der Riss und Ausbildung zum Rettungssanitäter
1998 – 2005:	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
08/2000:	Physikum
08/2001:	Erstes Staatsexamen
03/2004:	Zweites Staatsexamen
PJ (04/04-03/05):	- Unfallchirurgie (Universität Ulm)
	- Innere Medizin (NEMC, Tufts University, Boston)
	- Neurologie (Universität Ulm)

Lebenslauf

06/2005:	Drittes Staatsexamen und Approbation
seit 01.08.2005:	Assistenzarzt in der Abteilung für Neurologie, Uni Ulm

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit 06/2001:	Abteilungen Neurologie und Angewandte Physiologie AG: PD Dr. Holger Lerche
seit 12/2001:	Mitglied und Stipendiat des Graduierten Kollegs "Diagnostic and therapeutic concepts in molecular medicine", GRK 460 der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
08/2004:	4-wöchiger Laboraufenthalt am Harvard Children's Hospital Boston, Labor David Clapham, MD, PhD
01.04.2006:	Antritt des Ausbildungsstipendiums Baustein 3.4 und Beginn des Projektes "Synaptogenesis and functional intergration of neuronal progenitor cells" (P.918)

Preise:

05/2005:	Dr.-Volker-Helbig-Preis für Epilepsieforschung, verliehen durch das Interdisziplinäre Epilepsie-Zentrum am Klinikum der Philipps-Universität Marburg
05/2005:	Young Investigators Bursary Award, verliehen durch das "Scientific Advisory Committee" zur Posterpräsentation und Teilnahme am 26. Internationalen Epilepsie Kongress in Paris
09/2006	Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Neurologie

Original Veröffentlichungen:

Wuttke TV, Seebohm G, Bail S, Maljevic S,Lerche H. The new anticonvulsant Retigabin favors voltage-dependend opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. Mol Pharmacol. 67(4):1009-17 (2005)

Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Ureche ON, Baltaev R, Lampert A, Kornichuk G, Kamiya K, **Wuttke TV**, Lerche H, Sanguinetti MC, Lang F. Differential roles of S6 domain hinges in the gating of KCNQ potassium channels. Biophys J. 90(6):2235-44 (2006)

Wuttke TV, Paulus W, Lehmann-Horn F, Lerche H, Jurkat-Rott K. A novel voltage sensor mutation in the Kv7.2 (*KCNQ2*) channel associated with myokymia and epilepsy. In Vorbereitung.

Wuttke TV, Lehmann-Horn F, Lerche H, Jurkat-Rott K. A new mutation in the extracellular S1-S2 loop of the Kv7.2 (KCNQ2) channel in a family with neonatal epilepsy changes the voltage-dependency of the activation. In Vorbereitung.

Übersichtsartikel:

Thomas V. Wuttke and Holger Lerche. Novel anticonvulsant drugs targeting voltage-dependent ion channels. Expert Opinion on Investigational Drugs. Eingereicht.

Abstracts:

Wuttke TV, Seebohm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H. The new anticonvulsant Retigabin favors voltage-dependend opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its gate. 49th Meeting of the Biophysical Society Long Beach, CA 2005

Wuttke TV, Seebohm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H. Das neue Antikonvulsivum Retigabin öffnet den Kv7.2- (KCNQ2) Kanal durch Bindung an das Aktivierungstor. Z Epileptol 18: 126 (2005). 4. Gemeinsame Jahrestragung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Sektion der Internationalen Liga gegen Epilepsie, Innsbruck 2005

Wuttke TV, Seebohm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H. Das neue Antikonvulsivum Retigabin öffnet den Kv7.2 (KCNQ2) Kanal durch Bindung an das Aktivierungstor. Akt Neurologie 32 Supplement 4): 178 (2005). 78. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Wiesbaden 2005

Wuttke TV, Seebohm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H. The new anticonvulsant Retigabin favors voltage-dependend opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to the activation gate. Epilepsia 46 (Supplement 6):282 (2005). 8th International Congress on Epileptology, Paris 2005

Wuttke TV, Lehmann-Horn F, Lerche H, Jurkat-Rott K. Eine Mutation in der extrazellulären S1-S2 Schleife des Kv7.2 (KCNQ2) Kanals in einer Familie mit neonataler Epilepsie verändert die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Eingereicht für den 79. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Mannheim 2006.

Maljevic S, **Wuttke TV**, Hunter J, Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K, Escayg A, Lerche H. Subthreshold changes of voltage-dependent activation of the K_V7.2 channel in neonatal epilepsy. Eingereicht für das 36. Neuroscience Meeting, Atlanta, GA 2006.