

**Elektrophysiologische Charakterisierung von
Tryptophan-Mutanten im Porenmodul des
humanen KCNQ1- Kaliumkanals**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Roman Born

Institut für neurale Signalverarbeitung
am Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)

Direktor: Prof. Dr. O. Pongs

Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 24.08.2005

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. O.Pongs

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. J. R. Schwarz

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. R. Bähring

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Leitfähigkeiten im kardialen Aktionspotential	1
2	Das Lange QT-Syndrom	3
3	KCNQ1 Funktion und Pathophysiologie	6
4	Aufbau von Kaliumkanälen	7
5	Ziel der vorliegenden Arbeit	10
II	Material und Methoden	12
1	Homologie-Modellierung	12
2	Mutationen und RNA-Synthese	13
3	Zellbiologische Methoden	13
3.1	Präparation von <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	13
3.2	Mikroinjektion von cRNA	14
3.3	Oozyten-Lösungen	15
4	Elektrophysiologische Methoden	16
4.1	Versuchsaufbau und -ablauf	16
4.2	Registrierung der Messdaten	18
4.2.1	Zwei Elektroden Voltage-Clamp	19

4.3	Pulsprotokolle	20
4.4	Messlösungen	22
5	Datenanalyse	23
5.1	Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung	23
5.2	Boltzmann-Analyse der GV-Beziehungen	24
5.3	Thermodynamische Analyse	25
5.3.1	Berechnungsbeispiel	27
6	Chemikalien und Gebrauchsmaterialien	28
III	Ergebnisse	29
1	Die äußere Hülle der Porenmoduls von KCNQ1	29
2	KCNQ1-Mutationen ohne funktionelle Expression	32
3	Funktionell exprimierende KCNQ1-Kanal-Mutanten	33
3.1	Mutationen mit unveränderten Gatingeigenschaften	35
3.2	Mutationen mit spannungsabhängiger Inaktivierung	40
3.3	Mutationen mit veränderter Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	44
IV	Dikussion	49
1	Wilytp-ähnliche KCNQ1 Mutationen	51
2	Spannungsabhängig inaktivierende KCNQ1 Mutationen	53
3	KCNQ1-Konstrukte mit veränderten Gatingeigenschaften	55
4	Kanalkonstrukte ohne funktionelle Expression	57
5	Vergleich der <i>Shaker</i> - und KCNQ1-Scanning-Mutagenen	58
6	Möglichkeiten und Grenzen des Tryptophan-Mutanten-Scan	61
7	Ausblick	63
V	Zusammenfassung	64

VI Literaturverzeichnis 65

VII Anhang 74

1	Abkürzungsverzeichnis	74
2	Veröffentlichung	76
3	Lebenslauf	77
4	Danksagungen	78
5	Eidesstattliche Versicherung	79

I Einleitung

1 Leitfähigkeiten im kardialen Aktionspotential

In kardialen Myozyten existieren zahlreiche Leitfähigkeiten, die Form und Dauer des Herzaktionspotentials (AP) bestimmen (Abb. I.1). Ein Na^+ -Einstrom I_{Na} ist verantwortlich für die Generierung des Aktionspotentials und ist die wesentliche Leitfähigkeit in der so genannten Aufstrichphase (Phase 0). In der dem Maximalwert der Depolarisation folgenden Phase 1 wirken schnell inaktivierende Kalium-Auswärtsströme I_{to1} und I_{to2} und eine Chlorid-Leitfähigkeit I_{Cl} mit. Die Plateauphase (Phase 2) wird von einem lang anhaltenden, langsam inaktivierenden L-Typ Ca^{2+} -Strom I_{Ca} getragen (Wang et al., 1998a). Die Aktionspotential-Dauer (Phase 3) wird bestimmt von einem verzögerten, auswärts gerichteten Kaliumstrom I_{K} (Noble und Tsien, 1969).

I_{K} besteht aus mindestens drei verschiedenen Strömen, I_{Kur} , I_{Kr} und I_{KS} , die anhand ihrer pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften unterschieden werden können.

I_{Kur} aktiviert im Vergleich zu den anderen Komponenten sehr schnell (*ultrarapid*), nahezu instantan (Yue et al., 1996; Feng et al., 1997). Die Aktivierung von I_{Kr} (*rapid*) erfolgt schnell (150 ms). I_{Kr} weist eine Einwärtsrektilifizierung auf und wird selektiv durch Antiarrhythmika der Klasse III wie zum Beispiel Sotalol und E-4031 inhibiert (Mitcheson und Sanguinetti, 1999). Diese Kaliumleitfähigkeit ist ausgeprägt in der Plateauphase des AP und in der, dem Plateau unmittelbar folgenden, schnellen Repolarisationsphase (Phase 3). Der sehr langsam aktivierende Kaliumstrom I_{Ks} (*slow*) spielt eine wesentliche Rolle in Phase 2 des Aktionspotentials (Wang et al., 1998a). Aufgrund der langsamen Aktivierung (>3 s, 35° C) ist der Beitrag des I_{Ks} -Stroms zur Gesamtrepolarisierung in der späten Plateau-Phase am größten (Abb. I.1/B). Der Strom ist charakterisiert durch fehlende Inaktivierung und sehr langsame Deaktivierung.

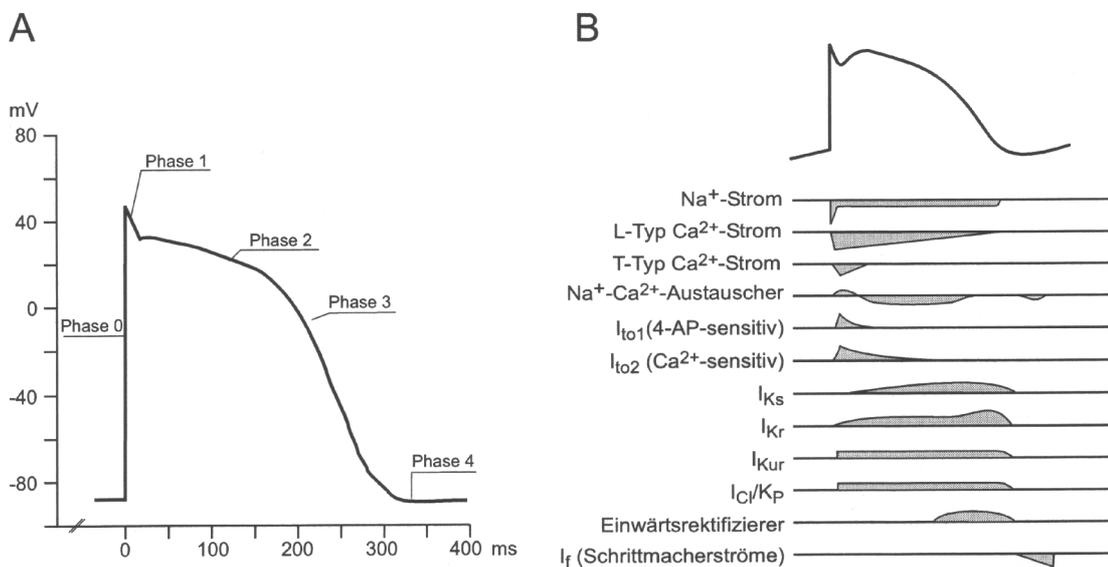


Abbildung I.1: Schematische Übersicht der am kardialen Aktionspotential beteiligten Ströme

(A) Der Zeitverlauf eines kardialen AP kann in fünf Phasen eingeteilt werden: Aufstrich der schnellen Depolarisierung (Phase 0), schnelle Repolarisierung nach dem Maximum (Phase 1), Plateau (Phase 2), schnelle Repolarisierung nach dem Plateau (Phase 3) und Zeit zwischen maximalem diastolischem Potenzial und dem Aufstrich des nächsten AP (Phase 4). (B) Simulationen des Zeitverlaufs der am kardialen AP beteiligten Ströme. Einwärtsströme sind unterhalb, Auswärtsströme oberhalb der Basislinie dargestellt. Erläuterungen im Text (modifiziert nach Roden et al., 1996 und Schulze-Bahr et al., 2000).

Es wird vermutet, dass aufgrund der langsamen Deaktivierung eine Akkumulation von offenen I_{Ks} -Kanälen bei hohen Stimulationsfrequenzen von (patho-) physiologischer Relevanz ist (Mitcheson und Sanguinetti, 1999).

Maßgeblich für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials (Phase 4) nach der Repolarisation sind die einwärtsrektifizierenden Kaliumströme I_{K1} , $I_{K(ACh)}$ und $I_{K(ATP)}$. Sie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Regulation (Acetylcholin, intrazelluläres ATP) und im Ausmaß der Einwärtsrektifizierung (Barry und Nerbonne, 1996).

Das kardiale Aktionspotential ist bestimmt von einem kontrollierten Zusammenwirken der erwähnten einwärts und auswärts gerichteten Ströme (I_{Na} , I_{Ca} bzw. I_{Kr} , I_{Ks}). Ein koordinierter und kontrollierter Herzrhythmus ist Voraussetzung für die Pumpleistung des Herzmuskels. Anhaltender Natrium-Einwärtsstrom in der Plateau-Phase oder verminderte K^+ -Auswärtsströme können die kardiale Repolarisation und somit das kardiale Aktionspotential verlängern. Hierdurch kann es zu einer Reaktivierung von Ca^{2+} - oder Na^+ -Kanälen kommen, was über so genannte frühe Nachdepolarisationen (*early after depolarization*, EAD) und episodische Arrhythmien vom Typ der *torsade de pointes* zu Kammerflimmern und funktionellem Herzstillstand führen kann (Abb. I.2, s. u., Wang et al., 1998a).

2 Das Lange QT-Syndrom

Es wurden mehrere Erkrankungen insbesondere des Herzens beschrieben, deren Ursachen in einer Fehlfunktion von Ionenkanälen liegen (Übersicht bei Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Von allen bekannten episodischen Erkrankungen, die auf einem Ionenkanaldefekt beruhen, wird das Lange QT-Syndrom (LQTS) als besonders schwere Erkrankung angesehen.

Die Bezeichnung Langes QT-Syndrom ist zurückzuführen auf eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Repolarisation des ventrikulären Myokards (Salen und Nadkarni, 1999), was sich in einer Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm (EKG) äußert

(Abb. I.2/A). Es ist somit gekoppelt an Fehlfunktionen der Leitfähigkeiten im kardialen Aktionspotential.

Das Lange QT-Syndrom kann ätiologisch in mehrere Kategorien eingeteilt werden. Man unterscheidet im Wesentlichen erbliche und erworbene QT-Syndrome. Daneben sind auch umweltbedingte, endokrinologische, metabolische und neurologische Ursachen postuliert worden (Wang et al., 1998a; Salen und Nadkarmi, 1999). Im Falle der erblichen QT-Syndrome, die 6 Patienten pro Million Menschen betreffen, tritt der Tod zumeist in der ersten Lebensdekade ein.

Der LQT1-*Locus* auf Chromosom 11p15.5, der für den hier untersuchten KCNQ1-Kalium-Kanal kodiert, ist dabei für die häufigste Form der erblichen LQT-Syndrome verantwortlich. Kopplungsanalysen zeigen, dass über 50 % der betroffenen Patienten Mutationen in dem korrespondierenden Gen aufweisen (Wang et al., 1996a,b). Man unterscheidet einen autosomal dominanten und einen autosomal rezessiven Erbgang. Die entsprechenden Syndrome sind nach ihren Erstbeschreibern Romano-Ward-Syndrom (RWS) (Romano, 1963; Ward, 1964) bzw. Jervell und Lange-Nielsen-Syndrom (JLNS) (Jervell und Lange-Nielsen, 1957) benannt. Zusätzlich zum kardialen Phänotyp tritt bei JLN-Patienten eine schwere, bilaterale Taubheit auf.

Des Weiteren wurden molekulare Korrelate für die LQT-*Loci* 2, 3, 5 und 6 gefunden, die für den Kalium-Kanal HERG, den Natrium-Kanal SCN5A, sowie die β -Untereinheiten KCNE1 und KCNE2 kodieren. Mutationen in diesen Proteinen können ebenfalls zu einem LQT-Syndrom führen, wobei Herg in 20-40 % der Fälle betroffen sein kann und die Gesamtheit der anderen nur einen Anteil von etwa 8 % ausmacht (Schulze-Bahr et al., 1999).

Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch wiederholte Synkopen und plötzlichen Tod nach ventrikulärer Arrhythmie, insbesondere vom Typ der *torsade de pointes* (Wang et al., 1998a). Kennzeichnend für diesen Typ der Arrhythmie ist ein Drehen des QRS-Komplexes um die isoelektrische Achse des EKGs (Abb. I.2/B). Vor allem bei ausgeprägter Sympathicus-Aktivität kommt es zu Anomalien des kardialen Aktionspotentials, die häufig bei jungen und ansonsten gesunden Patienten zum Tod führen (Jackman et al., 1988). Die Störungen treten demnach oftmals nach physischem oder emotionalem Stress auf.

Definiert ist die Krankheit über die im Oberflächen-EKG ermittelte Verlängerung des auf die Frequenz normierten QT-Intervalls (QT_c), sowie über weitere klinische und anamnes-

tische Kriterien. Im Normalfall wird das QT-Intervall (Abb. I.2/B^{***}) u. a. von Herzfrequenz, Alter und Geschlecht der untersuchten Person beeinflusst.

Zur diagnostischen Evaluierung wurde eine Wertetabelle entwickelt die Aussagen über das erwartete Risiko eines plötzlichen Herztodes zulässt (Schwartz et al., 1993; Haverkamp et al., 1997). Dabei werden verschiedenen Kriterien, wie die für die Herzfrequenz korrigierte Länge des QT-Intervalls (QTc), erlebte Synkopen oder Familienanamnese in die Bewertung miteinbezogen. Die Zahl der prädisponierten Personen ist unbekannt, Schätzungen gehen von einem Fall pro 10000-15000 Geburten aus (Wang et al., 1995a).

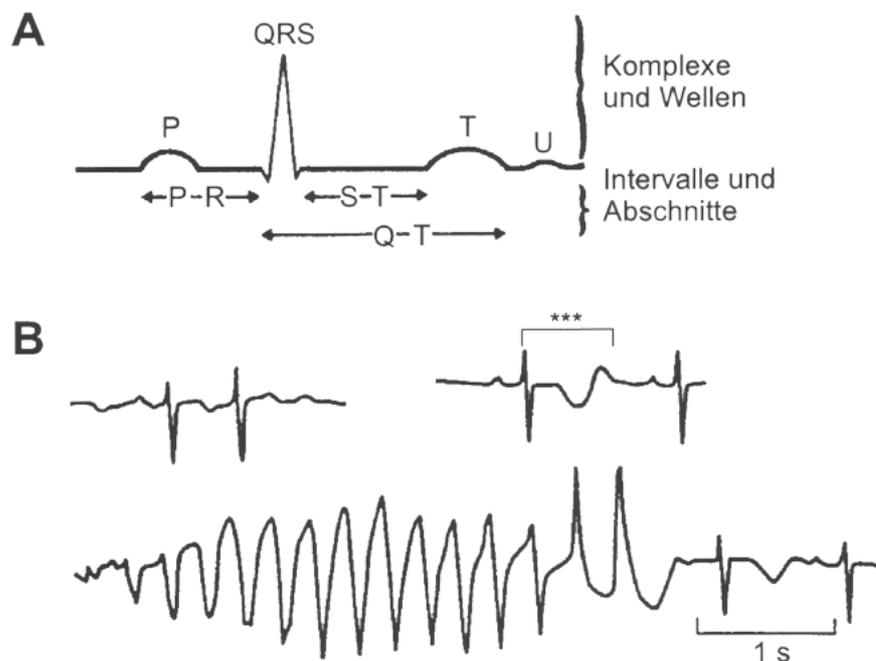


Abbildung I.2: Auswirkung der torsade de pointes auf das Elektrokardiogramm

(modifiziert nach Katz, 1992 und Viskin, 1999)

(A) Typisches EKG: P bezeichnet die atriale Depolarisation, P-R die atrioventrikuläre Weiterleitung, QRS die ventrikuläre Depolarisation, S-T das Plateau, T die ventrikuläre Repolarisation, U *uncertain* (ohne genaue Zuordnung). (B) Typische torsade de pointes: Sinusrhythmus mit normaler QT-Phase (oben links), verlängertes QT-Intervall (oben rechts, ***), Ausbruch der torsade de pointes (unten).

3 KCNQ1 Funktion und Pathophysiologie

KCNQ1 gehört zu einer Familie von bisher fünf isolierten und klonierten KCNQ-Kalium-Kanälen. Dazu gehören die KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ5, die als sog. „slow gating“ K^+ -Kanäle den neuronalen M-Strom leiten (Wang et al., 1998b; Selyanko et al., 1999). Diese werden vor allem durch Neurotransmitter wie z. B. Acetylcholin reguliert. KCNQ4 findet sich in den sensorischen Haarzellen des Innenohrs und wurde als molekulares Korrelat für den OHC-Strom (*outer haircell*) identifiziert (Kubisch et al., 1999).

Zur Bestimmung seiner Funktion wurde KCNQ1 heterolog in *Xenopus laevis*-Oozyten oder in Säugetierzelllinien wie CHO (*Chinese hamster ovary*), COS-7 (*CV1 Origin SV40*) oder HEK293 (*human embryonal kidney*) exprimiert (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). Der resultierende Kalium-Auswärtsstrom wies in seinen biophysikalischen Eigenschaften keine Ähnlichkeiten zu den nativen ventrikulären Strömen des Herzens auf (Attali, 1996).

Coexprimierte man jedoch KCNQ1 und die β -Untereinheit KCNE1, änderte sich die Kinetik. Es zeigte sich die I_{Ks} -typische, langsame Aktivierung und damit einhergehend eine deutlich höhere Stromamplitude. Passend dazu ist die 129 Aminosäuren große KCNE1-Untereinheit ebenfalls sehr stark im Herzen exprimiert (Barhanin et al., 1996). Erst kürzlich konnte eine direkte Interaktionsstelle zwischen KCNQ1 und KCNE1 im Bereich der Aminosäuren 338-340 mit den entsprechenden Partnern in KCNE1 nachgewiesen werden (Melman et al., 2004).

KCNQ1/KCNE1-Kanäle haben zusätzlich eine modulierende Funktion bei der Sekretion von H^+ in den Magen, der Chlorid-Sekretion in das Colon und die Sekretion von K^+ in die Stria media des Innenohrs (Neyroud et al., 1997; Mall et al., 1998; Grahammer et al., 2001; Warth et al., 2002). Auch andere β - Untereinheiten können mit KCNQ1 interagieren. So führt die Coexpression von KCNQ1 und KCNE3 zum Verlust des spannungsabhängigen Gatings und es entstehen dauerhaft offene Kanäle (Schroeder et al., 2000).

4 Aufbau von Kaliumkanälen

Kaliumkanäle bilden eine große Superfamilie integraler Membranproteine, die nach der Zahl der Transmembranbereiche (TM) und der Porenregionen (P) in verschiedene Strukturklassen unterteilt ist. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kaliumkanal gehört zur Klasse der 6TM/1P-Kanäle, die sich weiter in Familien von spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen (Kv), KCNQ-Kanälen, EAG-Kanälen, CNG-Kanälen und SK/IK-Kanälen untergliedern lässt (Übersichten bei Wei et al., 1996; Jan und Jan, 1997; Pongs, 1999). Wesentliche Erkenntnisse zur Aufklärung von Struktur und Funktion von Kaliumkanälen resultieren aus der Analyse der Familie der Kv-Kanäle, zu der die Familie der KCNQ-Kanäle die höchste Homologie aufweist (Wang et al., 1996a; Schmitt, 1996).

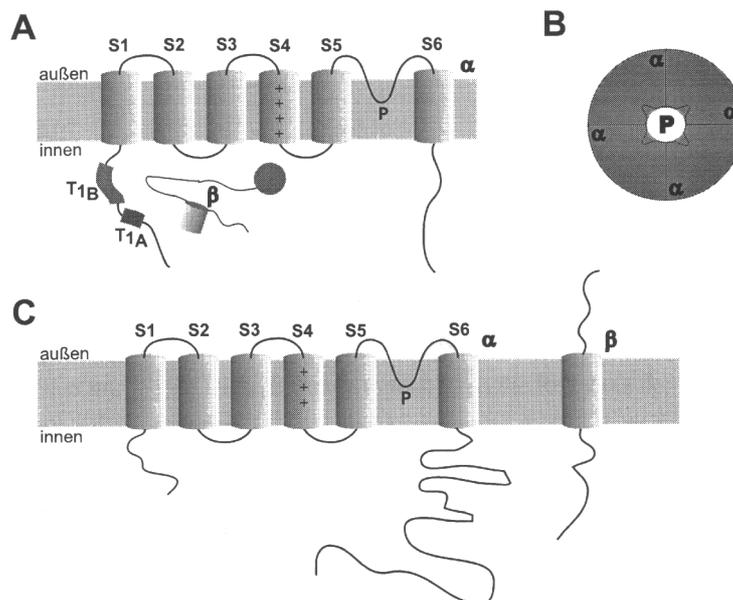


Abbildung I.3: Schematische Darstellung der Topologie von Kaliumkanaluntereinheiten

(A) Topologisches Modell von Kv-Kanal-Untereinheiten: Die zyttoplasmatischen amino- und carboxyterminalen Bereiche flankieren sechs Transmembransegmente (S1-S6). Die Tetramerisierung der α -Untereinheiten wird durch eine N-terminale Domäne (T1_{A,B}) vermittelt. Die Interaktion mit zyttoplasmatischen β -Untereinheiten wird mutmaßlich durch einen Teilbereich der Tetramerisierungsdomäne kontrolliert. (B) Eine Kaliumkanalpore wird aus vier P-Domänen gebildet. (C) Topologisches Modell des I_{Ks} -Komplexes: die β -Untereinheit liegt als Transmembranprotein vor.

Spannungsgesteuerte 6 TM-K⁺-Kanäle setzen sich aus einem homo- oder heterotetramären Satz von porenbildenden α -Untereinheiten zusammen (Abb. I.3/B). Die α -Untereinheiten bestehen aus sechs Transmembranhelices (S1-S6) und einem in die Membran eingelassenen, nicht durchgehenden Porensegment (Abb. I.3/C). Die vierte helikale Domäne, S4, enthält zahlreiche positiv geladene, gleichmäßig verteilte Aminosäuren und bildet den wohl wichtigsten Anteil des so genannten Spannungssensors. Dieser bewegt sich als Antwort auf Änderungen im transmembranären Spannungsgradient (Yellen, 2002; Jiang et al., 2003a/b).

Vereinfacht lassen sich funktionell ein Porenmodul, bestehend aus S5, Porenhelix und S6 und ein Sensormodul (S1-S4) unterscheiden. In den letzten Jahren ergaben röntgenkristallographische Untersuchungen an drei prokariotischen K⁺-Kanälen ein wesentlich genaueres Bild vom strukturellen Aufbau und den molekularen Mechanismen des hoch-selektiven Porenmoduls. Man geht davon aus, dass der topologische Aufbau des aus vier α -Untereinheiten bestehenden, pH-kontrollierten Zwei-Transmembran Kaliumkanals KcsA (*Streptomyces lividans*) etwa dem Porenmodul von 6 TM-Kv-Kanälen entspricht (Doyle et al., 1998, Abb. III.2). Der obere Bereich zeigt den Selektivitätsfilter, der die Signatursequenz TVGYG enthält. Unterhalb des Selektivitätsfilters erweitert sich der Durchgang zu einer wassergefüllten Höhle, die von vier inneren Membranhelices (TM 2) begrenzt wird. Die Kaliumionen verlieren bei Eintritt in den engen Ionenkonduktionsweg ihre Hydrathülle, werden aber durch die polaren Carbonyl-Sauerstoffatome der Hauptgruppen des Selektivitätsfilters stabilisiert, bevor sie in der Höhlung wieder in ein wässriges Milieu eintreten (Zhou et al., 2001; Morais-Cabral et al., 2001). Zusätzliche Stabilisierung der Kaliumionen innerhalb des Selektivitätsfilters, sowie eine Erhöhung der Kationen-Selektivität, vermittelt das Dipolmoment der Porenhelices, der mit dem negativen Pol direkt zum Zentrum der Pore deutet (Roux et al., 1999). Neben Homologien in der primären Aminosäuresequenz gibt es auch experimentelle Hinweise auf eine hohe Ähnlichkeit der KcsA-Struktur mit den Strukturen der Porendomänen von 6 TM-Kv-Kanälen der Eukaryoten. KcsA besitzt Sensitivität zu Skorpiontoxinen, deren Interaktionstellen innerhalb der äußeren Pore bei eukaryotischen Kv-Kanälen intensiv studiert wurden (MacKinnon et al., 1998). Toxinsensitivität konnte durch Austausch definierter Abschnitte der äußeren Pore zwischen KcsA und einem *Shaker* Kv-Kanal auf KcsA übertragen werden (Legros et al., 2000).

Der zweite prokariotische, calciumkontrollierte 2-TM-Kaliumkanal MthK (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) zeigt im Gegensatz zu KcsA die Konfiguration der offenen

Pore (Jiang et al., 2002a/b). Während in der Struktur von KcsA die inneren Helices (TM2) am intrazellulär gelegenen Aktivierungstor, „Gate“, (Liu et al., 1997; del Camino et al., 2001) ein sich kreuzendes Bündel formen, erscheinen diese in der MthK-Struktur weit gespreizt.

Als erster 6 TM-Kv-Kanal wurde KvAP (*Aeropyrum pernix*) röntgenkristallographisch dargestellt (Jiang et al., 2003a). Von besonderem Interesse war dabei, dass erstmals die Lage der Elemente S1-S4 zur Pore gezeigt werden konnten und KvAP hohe Sequenzhomologien zu den eukaryotischen Kv-Kanälen besitzt. Im Gegensatz zur bis dahin gewonnenen Vorstellung (Übersicht Cohen et al., 2003), die das positiv geladene Spannungselement S4 in einer Wasser-/Proteinumgebung des Kanals lokalisierte (Abb. I.3/C), wird hier der Spannungssensor als in der Membran frei bewegliches „Paddel“ beschrieben (Abb. I.4).

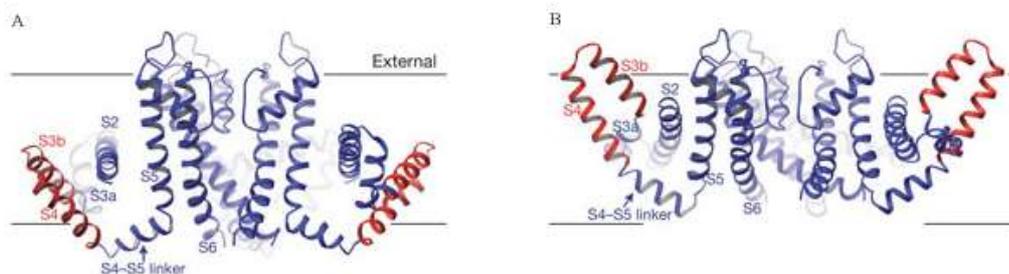


Abbildung I.4: Kristallstrukturmodell des geöffneten KvAP-K⁺-Kanal

A/ Modell des geschlossenen KvAP-Kanals, basierend auf der Tiefe und Orientierung des „paddels“ (rot) zur Porenregion. S5 und S6 Helices sind dabei an die Position in KcsA angeglichen. B/ Die offene KvAP-Struktur basiert auf der Tiefe und Orientierung des „paddels“ (rot) und der KvAP-Pore (Jiang et al., 2003b).

Eine Erhöhung der Diversität von Kv-Kanälen wird durch die Interaktion der porenbildenden α -Untereinheiten mit akzessorischen β -Untereinheiten erreicht, die wesentlichen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften des induzierten Stroms haben (Rettig et al., 1994). Die zytoplasmatischen β -Untereinheiten der Kv-Kanäle interagieren über eine

konservierte C-terminale Domäne mit einem Teilbereich der T1-Domäne der α -Untereinheiten (Sewing et al., 1996; Yu et al., 1996).

Die akzessorischen Untereinheiten der KCNQ-Kanalfamilie weisen eine Transmembrandomäne auf (Abb. I.3/C) und sind als KCNE-Untereinheiten klassifiziert (Barrhanin et al., 1997; Sanguinetti et al., 1997; Schroeder et al., 2000). Der Mechanismus der Interaktion ist bislang ungeklärt, die Bindungsstellen für KCNQ1 und KCNE1 konnten aber kürzlich auf ein Basentriplett eingegrenzt werden (Melman et al., 2004).

5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mittels einer Tryptophan-Mutanten-Scan-Analyse Protein-Protein und Protein-Lipid Interaktionen auf der äußeren, transmembranären Oberfläche des Porenmoduls von KCNQ1-Kanälen zu finden. In den Scan wurden Aminosäurereste aus den Bereichen der äußeren (S5/TM1), der Poren-(P) und der inneren (S6/TM2) Helix von KCNQ1 einbezogen. Die Aminosäuren wurden im Verlauf einzeln zu Tryptophan mutiert, die Kanäle in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert und anschließend elektrophysiologisch analysiert.

Besondere Beachtung wurde dem letzten Schritt des spannungsabhängigen Gating-Prozesses geschenkt, dem Öffnen der Pore. Bekannt ist, dass spannungsabhängige Kalium-Kanäle sehr sensitiv auf Punktmutationen einzelner Aminosäurereste reagieren (Schoppa and Sigworth, 1998b; Ledwell and Aldrich, 1999; Li-Smerin et al., 2000; Hong and Miller, 2000) und sich aus diesen Störungen wichtige Informationen über funktionell wichtige Strukturen in Kalium-Kanälen gewinnen lassen (Li-Smerin et al., 2000; Yifrach et al., 2002). Geht man davon aus, dass der Kanal im Geschlossen-Zustand eine bestimmte Ordnung besitzt, die sich während des Öffnungsvorgangs energieabhängig ändert, um im Offen-Zustand eine neue Konformation einzunehmen. Dann führt eine Punktmutation dazu, dass energetische Störungen entstehen. Diese energetischen Veränderungen lassen sich anhand von $V_{1/2}$ (Spannung der halb-maximalen Aktivierung) und z (Steigung in $V_{1/2}$) be-

stimmen (Material und Methoden). Dies erlaubt es, Positionen im Kanal ausfindig zu machen, die während der spannungsabhängigen Aktivierung gestört werden. Obwohl die physikalischen Mechanismen durch die Mutationen das Gating des Kanals stören noch nicht bekannt sind, lassen sich so doch Regionen finden, in denen das Umordnen der Aminosäuren während des Öffnens gestört wird.

Eine weitere Information liefert die Korrelation von $V_{1/2}$ - und z -Werten. Yifrach et al., 2002 konnten zeigen, dass, wenn sich der Mittelpunkt der Aktivierung zu positiveren Spannungen verschiebt und gleichzeitig die Steigung in diesem Punkt abnimmt, eine Störung in der späten Phase des Gatings, kurz vor Öffnung der Pore, beeinflusst wird. Ist keine Korrelation zu finden, sind vermutlich Protein-Protein-Interaktion im Kanal gestört.

Das Einführen einer sterisch großen, apolaren Aminosäure wie Tryptophan hat zu dem auf Grund des hydrophoben Charakters, keinen oder nur geringe Effekte auf Protein-Lipid-Interaktion (Choe et al., 1995; Sharp et al., 1995; Collins et al., 1997; Monks et al., 1999; Lismerin et al., 2000). Daher ist anzunehmen, dass der Tryptophanaustausch bei Aminosäuren im Transmembranbereich des KCNQ1-Porenmoduls, die keine Veränderung der spannungsabhängigen Aktivierung zeigen, entweder kaum bewegt werden während des Gatings oder aber so lokalisiert sind, dass sie mit der Lipiddoppelschicht interagieren.

Um eventuelle Verteilungsmuster besser visualisieren zu können und einen Eindruck über die räumliche Verteilung der Mutationen und dem daraus resultierenden Effekt zu erhalten, wurden die Ergebnisse auf das Kristallstrukturmodell von KcsA (Doyle et al., 1998) modelliert. Ein besonderes Augenmerk richtet sich dabei auf die Interaktionsflächen zwischen dem Porenmodul und dem Spannungssensormodul von KCNQ1, sowie der Porendomäne und der sie umgebenden Lipiddoppelschicht.

II Material und Methoden

1 Homologie -Modellierung

Mit Hilfe des Programms Insight II wurden solche Aminosäuren in der Röntgenkristallstruktur des KcsA-Kalium-Kanals (Doyle et al., 1998, Acc-Nr.: 1orq) identifiziert, die die Hülle des Porenmoduls bilden und innerhalb der Membran liegen (Abb. III.2, vergl. Li-Smerin et al., 2000). Die so identifizierten KcsA-Reste wurden dann mittels Sequenz-Alignment auf KCNQ1 übertragen (Abb. III.1).

Um eine Interpretation der gewonnenen Daten im strukturellen Kontext zu ermöglichen, wurden die Mutanten abhängig von ihren elektrophysiologischen Eigenschaften in fünf Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe wurde mit einer Farbe versehen und die homologen Aminosäurereste mit dem Programm Insight II in der KcsA-Kristall-Struktur markiert.

2 Mutationen und RNA-Synthese

Die in diese Arbeit verwendeten Mutanten-Klone wurden von Dr. Nicole Schmitt und Silke Jacob hergestellt. Es wurde dabei ein humaner KCNQ1-Klon (Yang et al., 1997, Genbank Acc# U86146) verwendet, der durch site-directed Mutagenese mittels PCR-overlap-Methode verändert wurde. Die mutierten Klone wurden alle in den Vektor pGEM kloniert, der die Herstellung von cRNA für die Injektion in Oozyten erlaubte. Nach der Linearisierung der DNA mit dem Enzym BclI erfolgte die in vitro Transkription mit dem T7 m-message machine kit (Ambion). Die cRNA wurde qualitativ im Gel und quantitativ mit dem RiboGreen-Kit (Molecular Probes, Eugene) analysiert. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die RNA aliquotiert und bei -70° Celsius gelagert.

3 Zellbiologische Methoden

3.1 Präparation von *Xenopus laevis*-Oozyten

Es wurden weibliche, HCG positiv getestete *Xenopus laevis* Frösche verwendet. Es wurden Tiere mit einer Scheitel-Steiß-Länge von mindestens 9 cm von den Firmen NASCO (USA) und Kähler (Deutschland) bezogen. Sämtliche Tiere wurden unter fachkundiger Pflege der Tierhaltung im UKE gehalten. Die Frösche wurden mit einer Mindestruhezeit von drei Monaten, bis zu 3 mal auf jeder Seite operiert und anschließend der Tierhaltung zur weiteren Verwendung überlassen.

Zur **chirurgischen Entnahme** der *Xenopus laevis*-Oozyten wurde der Frosch zunächst in 500 ml 0,12 % Tricain-Lösung (Sigma) anästhesiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurde dem Frosch in Rückenlage das Abdomen eröffnet und Teile des Ovars entnommen. Die Oozyten wurden sofort in Ca²⁺-freie OR2-Lösung (s. u.) gelegt und dort während der weiteren Versorgung des Frosches gelagert.

Zur Entfernung des Bindegewebes und der folliculären Zellen wurden die Oozyten mit Kollagenase A (4 mg/ml, Roche) in Ca^{2+} -freier OR2-Lösung inkubiert (Horizontalschüttler Stufe 1, RT, 3-6 h). Nach mehrmaligem Waschen in OR2-Lösung wurden die Oozyten in Gentamycin-Lösung (s. u.) überführt, selektiert (Stadium IV, \varnothing 0,6-1 mm und Stadium V, \varnothing 1-1,2 mm) und über Nacht bei $+18^{\circ}\text{C}$ in Gentamycin-Lösung inkubiert (Goldin, 1992).

3.2 Mikroinjektion von cRNA

Injektionsnadeln wurden mit einem vertikalen Pipettenziehgerät (PB-7, NARISHIGE) aus Glasskapillaren (Glass replacement 7.0 nanoltr, WPI) in zwei Schritten gezogen. Anschließend wurden sie unter dem Mikroskop (Micro Forge-900, NARISHIGE) auf einen Durchmesser von 10-15 μm gebrochen, bevor sie über 2 h bei 200°C sterilisiert wurden.

Die cRNA wurde zentrifugiert (15000 x g, 4°C , 5 min) und auf eine Konzentration von 40 ng/ μl verdünnt.

Stadium IV- und V-Oozyten wurden mit 50 nl cRNA (~ 2 ng/ Oozyte) injiziert. Hierzu wurden die hergestellten Injektionsnadeln mit sterilem Mineralöl (SIGMA) entlüftet, bevor sie auf die kalibrierte, volumetrische 10 μl Pipette (Drummond Scientific) aufgesetzt wurden. Unter mikroskopischer Kontrolle (WILD, M3C) wurde die Glassnadel mit cRNA befüllt. Die Injektion in die Oozyte fand ebenfalls unter mikroskopischer Kontrolle in Ca^{2+} -freier OR2-Lösung mittels 3-Achsenmanipulators und Pipettenhalterung statt (Stühmer, 1992).

Anschließend wurden die Oozyten in Gentamycin-Lösung über 3-6 Tage inkubiert, wobei die Lösung alle 2 Tage gewechselt wurde. In der Regel wurde am dritten bis sechsten Tag die Kanalexpression elektrophysiologisch analysiert.

3.3 Oozyten-Lösungen

Kollagenase- Lösung:	3 – 4 mg/ml	Collagenase A (<i>Clostridium histolyticum</i>)
	OR 2	(Roche)
Gentamycin- Lösung:	75.0 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	2 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	5 mM	Na-Pyruvat
	5 mM	HEPES, pH 7.5 (NaOH)
	50 µg/ml	Gentamycin (Sigma)
OR2-Lösung	82,5 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	5 mM	HEPES, pH 7,5 (NaOH)
Tricain-Lösung:	1,2 mg/ml	3-Aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma) in Leitungswasser

4 Elektrophysiologische Methoden

Die Messungen wurden an *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt. Untersucht wurden spannungsabhängige Ionenströme, die durch Überexpression von KCNQ1-Kalium-Kanälen zustande kamen.

4.1 Versuchsaufbau und –ablauf

Die **Elektrodenkanülen** wurden aus dünnwandigem Borosilicatglas mit Filament (TW150 F-4, WPI, USA) hergestellt und innerhalb weniger Stunden benutzt. Die Pipetten wurden in zwei Schritten mit Hilfe eines vertikalen Pipettenziehgerätes (PB-7, NARISHIGE, Japan) gezogen, wobei der erste Schritt maßgeblich die Form der Spitze, der zweite Schritt den Öffnungsdurchmesser bestimmte. Anschließend wurde die Spitze unter dem Mikroskop (Micro Forge-900, NARISHIGE, Japan) auf einen Öffnungsdurchmesser von ungefähr 10 μm gebrochen. Die Glaskanülen wurden dann mit 3 M Kaliumchlorid-Lösung befüllt und mittels Agarstopfen (0.02 g/ml Agar; 3 M KCl-Lösung) leitfähig verschlossen. Der Elektrodenwiderstand lag, abhängig vom Öffnungsdurchmesser, zwischen 0,5 und 1 $\text{M}\Omega$. Ein chlorierter Silberdraht diente als Verbindungselektrode. Der Silberdraht wurde zu Beginn jedes Versuchstages in Natriumhypochlorid rechloriert, um entstehende „Junction“-Potentiale zwischen der Kaliumchlorid-Lösung und dem Silberdraht zu minimieren.

Die Spannungselektrode wurde mit dem Elektrodenhalter an den Vorverstärker angeschlossen, der an einem drei Achsenmikromanipulator (Merzhäuser) fest montiert war. Die Stromelektrode wurde mit dem Elektrodenhalter am Mikromanipulator (Merzhäuser) befestigt und war direkt an den Hauptverstärker (Oocyte Clamp OC-725C, Warner Instruments, USA) angeschlossen.

Die beiden **Badelektroden** wurden über 3 M KCl Lösung und Agarbrücken mit der Messlösung in der Messkammer leitend verbunden. Hergestellt wurden diese Elektrodenbrücken aus

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (ca. 20° C) durchgeführt. Abb. II.1 zeigt schematisch die wichtigsten Bestandteile des Versuchsaufbaus. Die aus Plexiglas gefertigte, rechteckige Messkammer war so angelegt, dass ein Zu- und Abfluss der ND-Messlösung (s. u.) möglich war. Als Perfusionssystem diente ein 50 ml Spritzenkörper, der über einen Silikon-schlauch mit der Messkammer verbunden war. Den Antrieb für den Zulauf lieferte die Schwerkraft. Die Perfusionsgeschwindigkeit ließ sich mittels Tropfkammer kontrollieren und über eine nachgeschaltete Schraubklemme regulieren.

Um die Oozyten in Position zu halten, war eine kleine Vertiefung in die Kammer gefräst. Mit Hilfe eines binocularen Auflichtmikroskops (M3C, WILD) und einer Neonlampe (Kl 1500 electronic, Schott) war es möglich die Elektroden unter Sichtkontrolle an die Oozyten zu führen. Es wurden Objektive mit 6,4 facher bis 40facher Vergrößerung benutzt und zusätzlich Okulare mit 10facher Vergrößerung, was eine 400fache Gesamtvergrößerung ermöglichte.

Am Hauptverstärker ließ sich nach einstecken der Spannungselektrode in die Oozyte das Membranpotential ablesen, das, abhängig vom Kanalkonstrukt, zwischen -90 mV und -20 mV lag. Die Oozyte wurde auf ein **Haltepotential** von -100 mV geklemmt und der dabei im Anzeigefeld der Strom-Elektrode abzulesende Strom über die Membran protokolliert. Diese unspezifischen Ströme lagen in der Regel zwischen -300 nA und -50 nA und entsprachen einem Widerstand von 0.33 M Ω - 5 M Ω .

4.2 Registrierung der Messdaten

Die Messung von Membranströmen erfolgte unter Benutzung eines Oozyten-Klemm-Verstärkers (Oocyte Clamp OC-725C, Warner Instruments, USA) in der zwei Elektroden Voltage-Clamp Konfiguration.

Zur Datenaufnahme, Steuerung des Messverstärkers und Analyse der Daten diente ein Apple Macintosh G3-Computer. Über ein angeschlossenes Oszilloskop (TDS 210, Tektronix, USA) konnten sowohl die Strom- als auch die Spannungselektrode jederzeit überwacht werden. Das Programm Puls (Versionen 8.3-8.63, HEKA Elektronik) erlaubte über ein ITC-16 Interface

(Instrutech, USA) die Digitalisierung der Messdaten, die Kommunikation mit dem Verstärker und eine Sichtkontrolle der Stromspuren und Pulse im internen Oszilloskopfenster (Abb. II.1).

4.2.1 Zwei Elektroden Voltage-Clamp

Bei der Spannungs-Klemm-Technik mit zwei Elektroden lässt sich das Membranpotential der Oozyte bei einer gewünschten Spannung „klemmen“, um dann schrittweise die Spannung zu ändern (Stühmer, 1992). Der gemessene Strom setzt sich aus dem kapazitiven Strom (I_{cap}) und den durch spannungsabhängige Proteine verursachten Strom zusammen. Für Ionenkanäle lassen sich daraus Rückschlüsse auf das Gating-Verhalten gewinnen. Außerdem lassen sich Rückschlüsse auf den Ionenfluss durch die Pore ziehen. Beim zwei Elektroden Voltage-Clamp in Oozyten misst eine intrazelluläre Elektrode das Membranpotential (Spannungselektrode). Die zweite (Strom-) Elektrode liefert den Strom, der die geklemmte Spannung aufrecht hält. Dies funktioniert im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus. Abb. II.1 zeigt den vereinfachten Stromschaltkreis der Zellmembran mit intrazellulären Messelektroden und Badelektroden. Der Eintrittswiderstand R_a beinhaltet hauptsächlich den Widerstand der Elektrode ($1\text{ M}\Omega$). Der Membranwiderstand R_m ($1\text{ M}\Omega$) und die Membrankapazität C_m (100 nF) beziehen sich auf die für Oozyten gemessenen Durchschnittswerte. Der Serienwiderstand R_s befindet sich in Serie mit R_m und R_a zwischen Zellmembran und Badelektrode ($1\text{ K}\Omega$).

Der zu bestimmende Parameter ist dabei der Strom, der durch die Stromelektrode fließt. Bei der hier verwendeten Arbeitsvorrichtung wurde dazu der Strom gemessen, der zur Erdung durch die Strom-Erdungs-Elektrode fließt, da es sich um einen Verstärker mit einer virtuellen Erdung handelte.

Mit virtueller Erdung ist gemeint, dass Ströme, die zur Erdung hin fließen, zu einer geringen Polarisierung des Bades führen. Um dies zu kompensieren, benötigte man eine Spannungselektrode im Bad, mittels der dann das tatsächliche Membranpotential als Differenz aus Oozytenpotential und Badpotential bestimmt werden konnte.

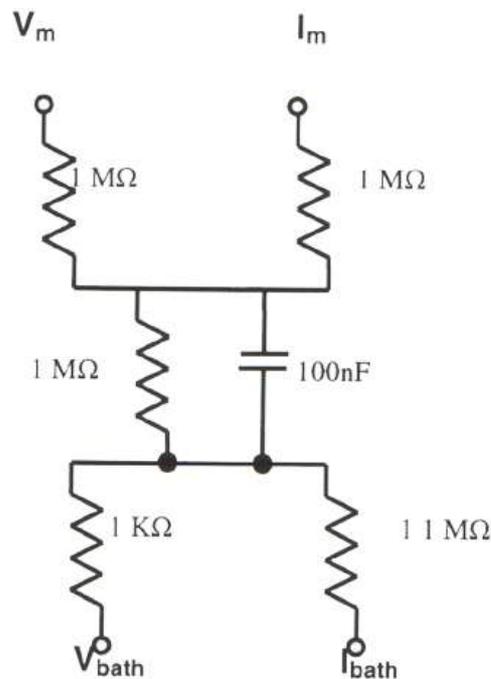


Abbildung II.2: Vereinfachter equivalenter Stromschaltkreis der Zellmembran mit intrazellulären Messelektroden und Badelektroden. Erläuterung im Text.

4.3 Pulsprotokolle

Spannungsabhängige Ionenkanäle aktivieren in einem bestimmten, für jeden Kanaltyp charakteristischen, Spannungsbereich. Gleichzeitig tritt, abhängig von der Höhe des Potentials und der Dauer der Depolarisierung, bei bestimmten Ionenkanälen eine Inaktivierung auf.

In dieser Arbeit lag das Augenmerk vor allem auf der Aktivierungskinetik, Inaktivierung und Deaktivierung, sowie vornehmlich auf der Analyse von Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen (GV).

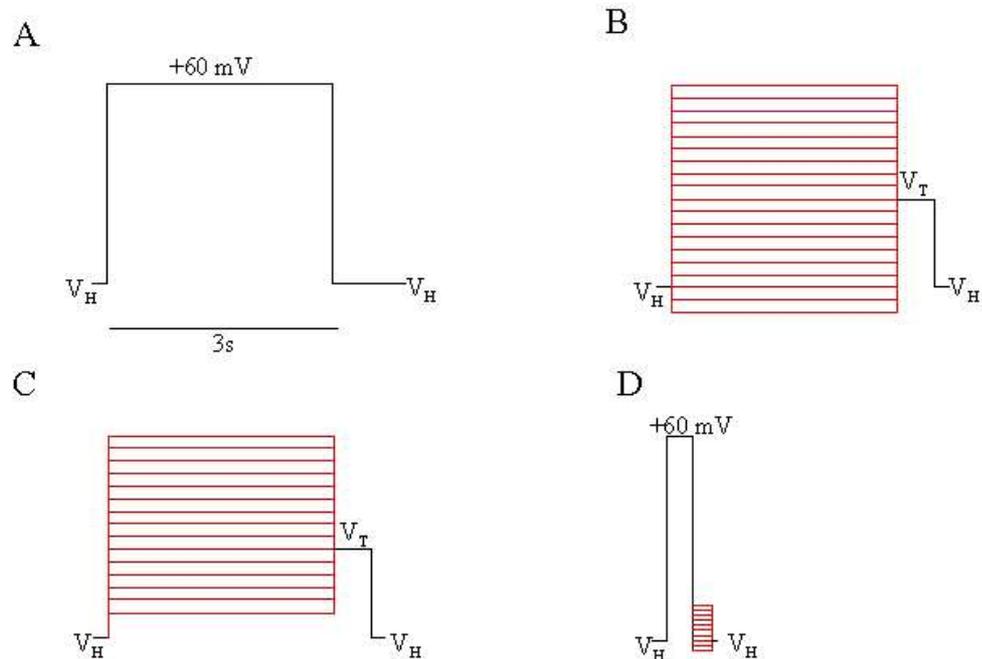


Abb. II.3: Pulsprotokolle

$V_H = -100$ mV. A/ Einfacher Puls auf $+60$ mV. B+C/ Beispiele für Protokolle zur Untersuchung der Aktivierung ($V_T = -30$ mV/ B. -120 mV bis $+60$ mV/ C. -80 mV bis $+60$ mV). D/ Protokoll zu Bestimmung des Umkehrpotentials

Die Aktivierungs-, Inaktivierungs- und Deaktivierungskinetiken wurden in den Experimenten ausgehend vom Haltepotential ($V_H = -100$ mV) durch einen depolarisierenden Rechteck-Spannungspuls auf $+60$ mV (Dauer: 3 s) ermittelt (Abb. II.3 /A).

Mit dem einfachen Rechteck-Spannungspuls auf **$+60$ mV** wurde auch die Expression des jeweiligen Konstrukts überprüft und die Stromamplitude gemessen. (Abb. II.3/A)

Für die **Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen** wurde eine Serie von depolarisierenden Spannungspulsen benutzt, die alle nach einer Dauer von 3 s auf eine Tailspannung (V_T) von -30 mV sprangen. Es wurden Stromfamilien aufgezeichnet, indem nacheinander Testspannungen in 10 mV Schritten im Bereich von -120 mV bis $+100$ mV angelegt wurden (Abb. II.3/C).

Zur Bestimmung des **Umkehrpotentials** wurden Protokolle verwendet, die nach einer 250 ms dauernden Depolarisation auf +60 mV in 5 mV Abstufungen auf den Bereich zwischen -120 mV und -70 mV zurück sprangen. (Abb. II.3/D)

Mit dem Pulsgenerator des „Pulse“-Programms (Versionen 8.3-8.63, HEKA Elektronik) wurden, in Abhängigkeit von der Fragestellung, die oben gezeigten Pulsprotokolle generiert. Dazu wurde die Klemmspannung sowie die zeitliche Abfolge, Dauer und Amplitude der Spannungssprünge festgelegt, mit denen die Zellmembran stimuliert wurde.

4.4 Messlösungen

ND-Lösung	79.5	mM	NaCl
	2	mM	KCl
	2	mM	MgCl ₂
	1.5	mM	CaCl ₂
	5	mM	HEPES, pH 7,5 (NaOH)

Für Blockexperimente wurde 100 µM Clofilium-tosylat (Alexis-Pharma) Lösung mit ND-Lösung hergestellt.

5 Datenanalyse

Mit dem Programm „Pulsefit“ (Versionen 8.3-8.63, HEKA Elektronik) war es möglich die Zeitkonstanten für Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken zu bestimmen. Zur graphischen Darstellung der Stromspuren wurde das Programm Igor Pro (Versionen 4.0-4.08, WaveMetrics, USA) verwendet. Für die Analyse der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen und statistischer Tests wurde Kaleidagraph (Synergy Software, USA) benutzt und diente außerdem der graphischen Darstellung ermittelter Messgrößen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

5.1 Leitfähigkeits-Spannungs Beziehung

Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von KCNQ1 zu beschreiben, wurden mittels der Pulsprotokolle die Konstrukte in 10 mV Schritten depolarisiert. Bei -30 mV wurden aus den Tail-Strömen die GV-Kurven bestimmt. Dabei wurden die Amplituden der Tail-Ströme am tiefsten Punkt gemessen, um auch Kanäle zu erfassen, die sich noch im inaktivierten Zustand befanden (Pusch et al. 2000). Die aus der Inaktivierung über den Offen-Zustand deaktivierenden Kanäle führen zu dem KCNQ1-typischen „Hook“. Die so gewonnenen Daten wurden in Abhängigkeit des variablen, aktivierenden Pulses in einem Koordinatensystem aufgetragen. Um die einzelnen Messungen unabhängig von der jeweiligen Expression miteinander vergleichen zu können, wurde auf die maximale Amplitude (I_{\max}) normiert (Gl. 1).

$$\text{Gl. 1} \quad I/I_{\max} = I_{\text{norm}}$$

Durch die konstante Verwendung von Tailpotentials bei -30 mV war der elektrochemische Gradient für K^+ -Ionen immer gleich. Daraus ergab sich:

$$\text{Gl. 2} \quad I_{\text{norm}} = G_{\text{norm}}$$

5.2 Boltzmann-Analyse der GV-Beziehung

Aus der so gewonnenen Leitfähigkeits-Spannungs-Kurve wurden mittels einer *Boltzmann*-Funktion (Gl. 3) mit zwei Zuständen die wichtigsten Parameter der spannungsabhängigen Aktivierung bestimmt.

$$\text{Gl. 3} \quad G_{\text{norm}} = \frac{1}{1 + e^{-zF(V-V_{1/2})/RT}}$$

R = allgemeine Gaskonstante (8.314 J K⁻¹ mol⁻¹)

F = Faraday-Konstante (96485 C mol⁻¹)

T = Temperatur [K]

Die das Gating-Verhalten charakterisierenden Parameter waren dabei der *z*-Wert, als Äquivalent der bewegten Ladung in der spannungssensitiven Region des Kanals und der *V*_{1/2}-Wert. *V*_{1/2} ist die Spannung, bei der die Offenwahrscheinlichkeit für den Kanal halbmaximal ist. Die *Boltzmann*-Funktion beschreibt somit die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.

Offener Boltzmann-Fit: Da die Messungen von KCNQ1-Mutationen mit zu positiveren Potentialen verschobenem Aktivierungsmittelpunkt durch die Klemmbarkeit der Oozyte limitiert wurde, war es notwendig einen offenen *Boltzmann*-Fit (Gl. 4) anzuwenden. Dieser Fit ermöglichte es in Annäherung den Sättigungspunkt einer IV-Kurve zu bestimmen und außerdem für solche Mutanten *V*_{1/2}- und *z*-Wert zu bestimmen.

$$\text{Gl. 4} \quad G_{\text{norm}} = \frac{G_{\text{max}}}{1 + e^{-zF(V-V_{1/2})/RT}}$$

Wobei *G*_{max} die durch den Fit berechnete, maximale relative Leitfähigkeit ist.

Boltzmann-Fit mit Offset: Um bei Mutationen mit spannungsunabhängigen Stromanteilen den spannungsabhängigen Teil auswerten zu können oder solche Mutationen charakterisieren zu können, die bei Potentialen unter -120 mV noch nicht vollständig im geschlossenen Zustand vorlagen, benutzte ich einen *Boltzmann*-Fit mit Offset (Gl. 5).

$$\text{Gl. 5} \quad G_{\text{norm}} = \frac{1 - G_{\text{offset}}}{1 + \left(e^{-zF(V - V_{1/2})/RT} \right)} + G_{\text{offset}}$$

Dabei war G_{offset} der relative, durch die Funktion berechnete Anteil des Stroms, der spannungsunabhängig bzw. durch permanent offene Kaliumkanäle hervorgerufen wurde.

5.3 Thermodynamische Analyse

Aus den gewonnenen Parametern wurde die **Gibb's freie Energie** berechnet (Gl. 6), die zur halbmaximalen Aktivierung der Ionen-Kanäle bei 0 mV notwendig war. Daraus folgte, dass ein $\Delta G_0 < 0$ kcal/mol den Offenzustand bei 0 mV favorisiert, während bei einem $\Delta G_0 = 0$ kcal/mol ein Gleichgewicht zwischen offenem und geschlossenem Zustand herrschen würde.

$$\text{Gl. 6} \quad \Delta G_0 = 0.2389 * zFV_{1/2}$$

F = Faraday-Konstante (96485 C mol⁻¹)

Um Veränderungen der freien Energie zwischen KCNQ1 Wildtyp (ΔG_0^{wt}) und Mutation (ΔG_0^{mut}) darzustellen, wurde der $\Delta \Delta G_0$ -Wert berechnet (Gl. 7).

$$\text{Gl. 7} \quad \Delta \Delta G_0 = \Delta G_0^{\text{mut}} - \Delta G_0^{\text{wt}}$$

Ein positiver $\Delta\Delta G_0$ -Wert bedeutet, dass die entsprechende KCNQ1-Mutante gegenüber dem Wildtyp die Energiebilanz der spannungsabhängigen Aktivierung negativ beeinflusst. Es wird gegenüber dem Wildtyp mehr Energie benötigt um den Kanal zu öffnen. Um eventuelle Unterschiede in den Oozytenchargen zu auszugleichen, wurde an jedem Messtag KCNQ1 Wildtyp mit mindestens $n=3$ gemessen und ΔG_0 bestimmt.

Um die durch Punktmutationen verursachten, unterschiedlichen Volumenänderungen der Aminosäureseitenketten zu berücksichtigen, wurden die $\Delta\Delta G_0$ -Werte auf die Volumenänderungen normalisiert (Gl. 8).

$$\text{Gl. 8} \quad \Delta\Delta G_0^w = \Delta\Delta G_0 * \left(\frac{|\Delta Vol^{ave}|}{|\Delta Vol|} \right)$$

Der $\Delta\Delta G_0^w$ -Wert berücksichtigt damit die durchschnittliche Volumenänderung ($\Delta Vol^{ave} = 68 \text{ \AA}^3$) und die Volumendifferenz für die jeweilige Punktmutation (ΔVol) (Creighton, T., 1993)

5.3.1 Berechnungsbeispiel für KCNQ1 Wt und KCNQ1 R259W

$$\text{KCNQ1 Wt: } V_{1/2} = -22.6 \text{ mV} \quad z = 2.1$$

$$\text{R259W: } V_{1/2} = 12.5 \text{ mV} \quad z = 1.7$$

$$\text{Schritt 1: } \Delta G_0 = 0.2389 * 2.1 * 96485 \text{ C mol}^{-1} * (-22.6 \text{ mV})$$

$$\text{Wt: } \Delta G_0 = -1.1 \text{ kcal/mol}$$

$$\text{R259W: } \Delta G_0 = 0.5 \text{ kcal/mol}$$

$$\text{Schritt 2: } \Delta \Delta G_0(\text{R259W}) = 0.5 - (-1.1) = +1.6$$

$$\text{Arginin(R) Vol} = 148 \text{ \AA}^3$$

$$\text{Tryptophan(W) Vol} = 163 \text{ \AA}^3$$

$$\text{Schritt 3: } \Delta \text{Vol} = |163 \text{ \AA}^3 - 148 \text{ \AA}^3| = 15 \text{ \AA}^3$$

$$\text{Schritt 4: } \Delta \Delta G_0^w(\text{R259W}) = 1.6 * \left(\frac{|68|}{|15|} \right) = 7.25$$

6 Chemikalien und Gebrauchsmaterialien

Falls nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Baker, Difco, Fluka, GibcoBRL, Macherey-Nagel, Merck, Riedel-de-Haen, Roth, Serva und Sigma-Aldrich in p.A.- oder Reinstqualität bezogen.

Verbrauchsmaterialien und Reaktionsgefäße wurden von Braun, Eppendorf, Ethicon, Greiner, Kimberly-Clark, Millipore, Nunc, Sarstedt, Schott, Volac und WPI bestellt.

Die Bezugsquelle wird im Folgenden gesondert erwähnt, wenn ein Einfluss auf die Versuchsdurchführung denkbar ist.

III Ergebnisse

1 Die äußere Hülle des Porenmoduls von KCNQ1

Die Sequenzen von prokaryotischen und eukaryotischen Kaliumkanälen besitzen Regionen, die sich durch große Homologien auszeichnen (Doyle et al., 1998; Lu et al., 2001; Ruta et al., 2003). Im Sequenzvergleich wurden die Region zwischen S5 und S6 des humanen KCNQ1-Kalium-Kanals (Aminosäuren 259 bis 351) mit den homologen Regionen der Kaliumkanäle *Shaker* und *KcsA* verglichen (Abb. III.1). Mit Hilfe dieses Alignments wurden solche Aminosäurereste identifiziert, die von der Primärstruktur der drei Kanäle ausgehend, an homologen Positionen im Kanal liegen. Als Leitstruktur für das Alignment diente die Filtersequenz TxGYG, die in allen Kaliumkanälen identisch ist. Wichtige, konservierte Aminosäuren in K^+ -Kanälen wie das „Glycin-Hinge“ (Abb. III.1 rot hinterlegt, *KcsA* 99, *Shaker* 466) und das darauf folgende Alanin (Abb. III.1 grün hinterlegt) wurden ebenfalls bei dem Vergleich berücksichtigt. In der KCNQ1-Sequenz fehlt das Glycin an dieser Stelle und ist durch ein Alanin besetzt.

Im der *KcsA*-Kristallstruktur wurden in der Vergangenheit 37 Aminosäuren pro Unter-einheit identifiziert, bei denen die Seitenketten aus dem Protein zeigen und vermutlich mit Membranlipiden in kontakt sind (Abb. III.2; Li-Smerin et al., 2000). Im Sequenzvergleich mit *KcsA*- und *Shaker*-Kalium-Kanälen wurden die entsprechenden 37 Aminosäuren in der KCNQ1-Kanalstruktur identifiziert (Abb. III.1 gelb hinterlegt).

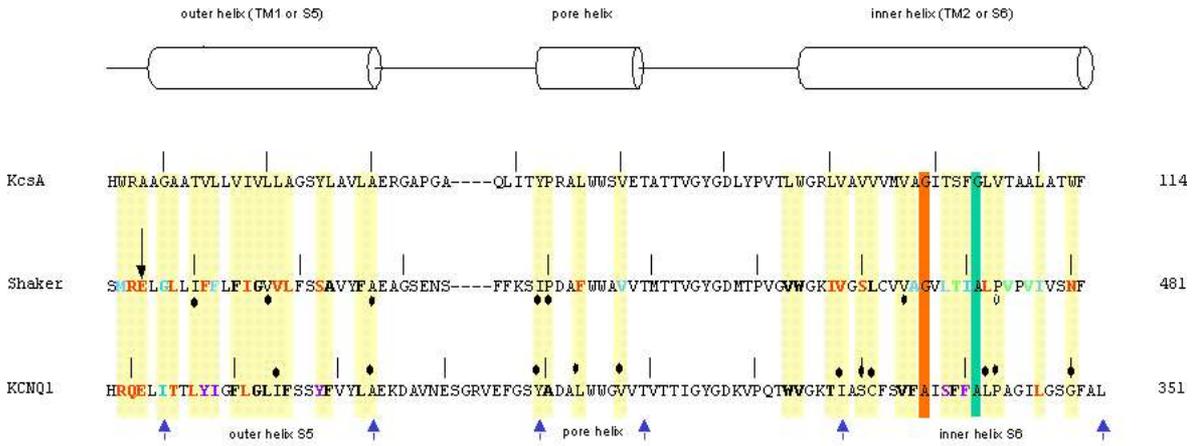


Abbildung III.1: Sequenz-Vergleich KcsA, Shaker und KCNQ1
 Über dem Alignment befindet sich ein Modell der Sekundärstruktur des KcsA-Kanals. TM1 und TM2 entsprechen S5 und S6 in spannungsabhängigen K⁺-Kanälen. Die gelb unterlegten Aminosäuren entsprechen denen, die im KcsA-Kristallstrukturmodell die Hülle der Porendomäne bilden.

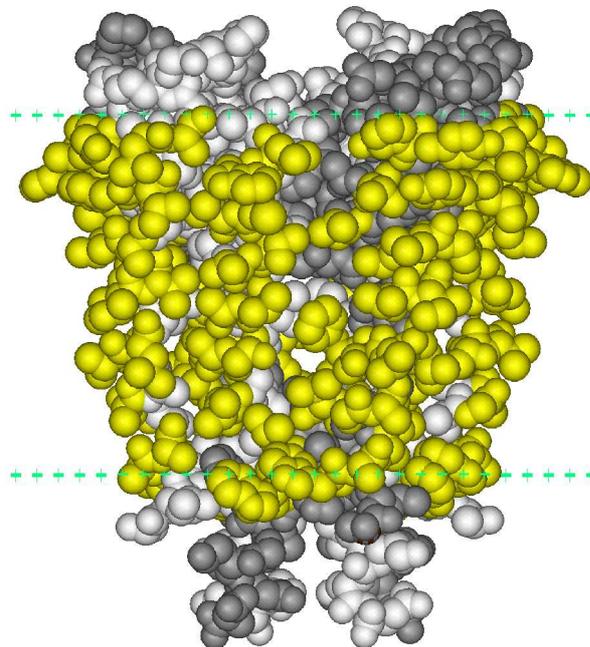


Abbildung III.2: Die Hülle des Porenmoduls von KcsA
 CPK-Kristallstrukturmodell des KcsA-Kaliumkanals. Gelb markiert sind Aminosäuren, die die Hülle des Porenmoduls bilden. Grüne Linien deuten die Grenzen der Lipidmembran an.

Alle so identifizierten KCNQ1-Aminosäurereste wurden, mit Hilfe der PCR-Overlap-Methode zu Tryptophan mutiert. Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Aminosäurereste wurden zu Alanin mutiert (Tabelle I).

S5	Poren-Bereich	S6
R259W	Y299A	W323A
Q260W	A300W	V324W
E261W	L303W	T327W
I263W	V307W	I328W
T264W		S330W
L266W		C331W
Y267A		V334W
I268W		F335A
F270A		S338W
L271W		F339A
G272W		F340A
L273W		L342W
I274W		P343W
F275A		L347W
Y278A		G350W
F279A		
L282W		
A283W		

Tabelle I: 37 im Sequenzvergleich identifizierte KCNQ1-Aminosäurereste

Im Alignment identifizierte, 37 KCNQ1-Aminosäuren, die die Hülle des Porenmoduls von KCNQ1-Kalium-Kanälen bilden (Abb. III.1). Erster Buchstabe bezeichnet den Aminosäurerest in KCNQ1, die dazugehörige Sequenznummer, gefolgt von der Aminosäure zu der mutiert wurde.

2 KCNQ1-Mutationen ohne funktionelle Expression

Zehn Mutanten produzierten keine messbaren Auswärtsströme bei Testspannungen zwischen -80 und +120 mV. Zwei dieser Mutationen fanden sich im S5-Segment (A283W, Y299A), zwei weitere in der Porendomäne (L303W, V307W) und die restlichen sechs Mutationen lagen im Transmembranbereich S6 (I328W, S330W, C331W, L342W, P343W, G350W). Die Daten zeigten, dass insbesondere das S6 Transmembransegment von KCNQ1, was der inneren Helix von KcsA entspricht, sensibel auf Mutagenese reagiert.

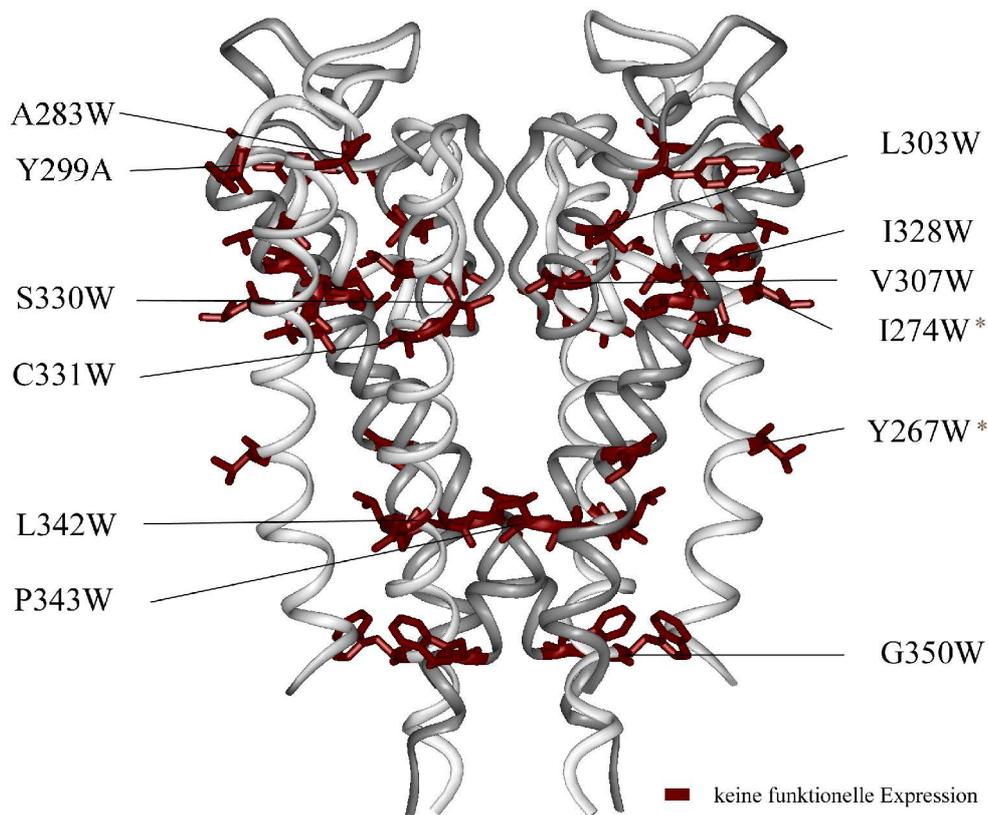


Abbildung III.3: Mutationen ohne funktionelle Expression

Mit magenta sind die KcsA-Reste markiert, deren entsprechende KCNQ1-Mutationen keinen Strom im gemessenen Bereich zeigten. Alle Reste besitzen die KcsA-Seitenketten, sind aber mit den KCNQ1-Sequenznummern beschriftet. Die extrazelluläre Seite ist oben. Für die mit * markierten Aminosäuren I274W und Y267W konnte an anderer Stelle Strom gemessen werden.

Die Markierung der entsprechenden Mutationen im KcsA-Modell (Abb. III.3) zeigte, dass sich ein Teil der Mutationen im extrazellulären Bereich befanden, wo die Innen-(S6), Poren- und Außen-(S5)-helices dicht zusammen liegen (I274W, A283W, L303W, V307W, I328W, S330W, C331W). Eine zweite Gruppe zeigte sich in der zytosolischen Hälfte der Lipiddoppelschicht (L342W, P343W, G350W), wo die innen gelegenen Helices (S6) ein rechtsdrehendes Bündel formen. Es ist durchaus möglich, dass diese Mutationen das korrekte Falten der KCNQ1-Untereinheiten behinderten oder das Zusammenlagern zu einem funktionsfähigen Kanal störten. Es ist außerdem möglich, dass durch diese Mutationen die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Bereiche verschoben wurde, die hier nicht untersucht wurden. Die Expression wurde nicht überprüft.

3 Funktionell exprimierende KCNQ1-Kanal-Mutanten

Ungefähr zwei Drittel der 37 Mutationen ergaben funktionsfähige Kaliumkanäle. Der größte Teil der Mutationen führte zu keiner drastischen Änderung der Quartärstruktur des Kanals, ähnlich wie es auch schon im Tryptophan-Scan der Transmembranhülle der Shaker-Porendomäne (Li-Smerin et al., 2000) gezeigt wurde. 23 von 25 Mutationen ergaben spannungsabhängige KCNQ1-Kanäle, die bei negativen Membranpotentialen schlossen und durch depolarisierende Testpulse aktiviert werden konnten. Die übrigen beiden Kanäle schlossen im gemessenen Bereich nicht vollständig. Es wurden Tail-Strom-Protokolle benutzt, um die Leitfähigkeits-Spannungs-(GV) Beziehung für jede dieser exprimierten KCNQ1-Mutationen zu untersuchen.

Energetische Änderungen durch die KCNQ1-Mutagenese auf die spannungsabhängige Aktivierung wurden analysiert, indem die Aktivierung als ein einziger Schritt zwischen dem Geschlossen- und Offen-Zustand des Kanals angenommen wurde. Dies ermöglichte es, eine Boltzmann-Funktion mit zwei Zuständen über die gewonnenen Strom-Spannungswerte zu legen. Daraus lies sich der $V_{1/2}$ -Wert, die Spannung, bei der die Hälfte aller Kanäle geöffnet vorliegen und das Ladungsäquivalent z , welches proportional zur Steigung im Punkt der halbmaximalen Aktivierung ist, bestimmen. Aus $V_{1/2}$ - und z -Werten wurde die freie Energie zwischen dem Offen- und Geschlossen-Zustand bei 0 mV (ΔG_0) berechnet.

	n	$V_{1/2}$ [mV]	z	ΔG_0 [Kcal/mol]	$\Delta\Delta G_0$ [Kcal/mol]	$\Delta\Delta G_0^w$
WT	83	-22.6 ± 0.45	2.1 ± 0.04	-1.1 ± 0.04		
R259W	5	12.5 ± 0.99	1.7 ± 0.03	0.5 ± 0.05	+1.5	+6.1
Q260W	5	6.0 ± 0.87	2.1 ± 0.13	0.3 ± 0.03	+1.3	+1.6
E261W	5	93.1 ± 1.7	1.3 ± 0.05	2.8 ± 0.12	+3.8	+4.3
I263W	6	-40.7 ± 0.83	2.6 ± 0.11	-2.4 ± 0.1	-1.2	-1.8
T264W	5	36.1 ± 0.78	0.8 ± 0.01	0.7 ± 0.06	+1.6	+1.3
L266W	3	-20.5 ± 0.95	2.7 ± 0.07	-1.0 ± 0.05	+0.3	+0.5
Y267W		Kein Strom*				
Y267A	5	-18.2 ± 1.4	1.0 ± 0.03	-0.4 ± 0.04	+0.9	+0.7
I268W	5	-19.9 ± 1.0	1.6 ± 0.03	-0.7 ± 0.04	+0.7	+1.1
F270A	4	-21.1 ± 1.7	2.1 ± 0.03	-1.1 ± 0.1	-0.1	-0.1
L271W	5	-4.3 ± 0.6	1.9 ± 0.09	-0.2 ± 0.04	+1.2	+1.9
G272W	4	-21.0 ± 0.4	2.2 ± 0.03	-1.1 ± 0.04	+0.3	+0.2
L273W	3	-22.1 ± 0.6	2.2 ± 0.02	-1.1 ± 0.04	+0.1	+0.1
I274W		Kein Strom*				
F275W	4	+5.2 ± 1.1	2.4 ± 0.05	0.3 ± 0.05	+1.3	+2.8
F275A	4	-38.7 ± 0.5	1.6 ± 0.04	-1.4 ± 0.05	-0.4	-0.4
Y278W	4	-16.8 ± 0.5	2.5 ± 0.1	-1.0 ± 0.03	+0.1	+0.3
Y278A	6	-2.3 ± 1.1	1.5 ± 0.09	-0.1 ± 0.03	+1.0	+0.8
F279W	4	-17.8 ± 0.4	3.0 ± 0.2	-1.2 ± 0.08	+0.2	+0.4
F279A	4	-22.4 ± 0.9	2.1 ± 0.1	-1.1 ± 0.1	-0.1	-0.1
L282W	4	-9.1 ± 1.9	2.3 ± 0.1	-0.3 ± 0.08	+0.9	+1.5
A283W		Kein Strom				
Y299A		Kein Strom				
A300W	5	-7.8 ± 0.2	2.2 ± 0.03	-0.4 ± 0.01	+0.6	+0.4
L303W		Kein Strom				
V307W		Kein Strom				
W323A	5	-11.1 ± 1.3	2.0 ± 0.06	-0.5 ± 0.07	+0.5	+0.3
V324W	5	-28.2 ± 1.2	2.6 ± 0.05	-1.7 ± 0.09	-0.7	-0.7
T327W	5	-14.5 ± 0.7	1.8 ± 0.07	-0.2 ± 0.07	+0.8	+0.7
I328W		Kein Strom				
S330W		Kein Strom				
C331W		Kein Strom				
V334W	5	-21.3 ± 0.59	2.2 ± 0.04	-1.1 ± 0.04	-0.05	-0.1
F335A	4	-13.5 ± 0.6	1.9 ± 0.06	-0.6 ± 0.02	+0.5	+0.5
S338W	7	-4.2 ± 1.1	1.2 ± 0.03	-0.1 ± 0.03	+1.5	+1.1
F339A	5	-27.0 ± 0.81	2.7 ± 0.08	-1.5 ± 0.09	-0.5	-0.5
F340A	5	-45.3 ± 1.8	2.1 ± 0.2	-2.3 ± 0.35	-1.2	-1.1
L342W		Kein Strom				
P343W		Kein Strom				
L347W	6	62.8 ± 1.0	1.8 ± 0.03	2.6 ± 0.07	+3.6	+5.6
G350W		Kein Strom				

Tabelle II: Gatingparameter der mutierten KCNQ1-Kanäle

Liste der mittels Boltzmann-Fit ermittelten $V_{1/2}$ und z-Werte für die 37 mutierten KCNQ1-K⁺-Kanäle, sowie die daraus errechneten ΔG_0 , $\Delta\Delta G_0$ und $\Delta\Delta G_0^w$ mit dazugehörigem Standardfehler (siehe Material und Methoden). Für die beiden mit * bezeichneten Mutationen (Y267W, L274W) zeigte eine andere Arbeit Wildtyp-ähnliche Ströme. n ist die Anzahl der gemessenen Oozyten.

Die ΔG_0 -Werte wurden mit denen von Wildtyp KCNQ1-Kanälen verglichen. Die mutationsinduzierten Störungen der freien Energie während des Öffnungsvorgangs wurde durch die Berechnung von $\Delta\Delta G_0$ -Werten analysiert (siehe Tabelle II).

Bei den 27 funktionell exprimierenden KCNQ1-Mutanten variierte das Seitenkettenvolumen im Bereich von 15 bis 115 Å³. Daher wurde ein auf das Seitenkettenvolumen normierter $\Delta\Delta G_0$ -Wert ($\Delta\Delta G_0^W$) berechnet, um die unterschiedlichen Änderungen im Seitenkettenvolumen zu berücksichtigen (siehe Materialien und Methoden; Li-Smerin et al., 2000). Die Ergebnisse der $\Delta\Delta G_0^W$ -Berechnungen für die 27 Mutationen, für die eine G-V Analyse möglich war, sind in Tabelle II zusammengefasst.

3.1 Mutationen mit unveränderten Gatingeigenschaften

Elf von 25 mutierten KCNQ1-Kalium-Kanälen (L266W, F270A, G272W, L273W, Y278W, F279W, A300W, W323A, V324W, T327W und F335A) zeigten im Vergleich zum Wildtyp-Kanal nur geringe Änderungen der spannungsabhängigen Aktivierung. Zu Beginn jeder Messung wurden die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik während eines einfachen, depolarisierenden Testpulses nach +60 mV untersucht (Stromkurven nicht gezeigt, Werte Tabelle III). Dabei zeigten sich gegenüber dem Wildtypkanal nur geringe Abweichungen, die nicht weiter untersucht wurden. Als Ausnahme in dieser Gruppe zeigte sich L273W mit einer vergleichsweise schnellen ersten Aktivierungsphase, $\tau_{akt\ 1} = 32$ ms, und einer deutlich langsameren zweiten Phase, $\tau_{akt\ 2} = 5900$ ms. Darauf folgte eine gegenüber dem Wildtyp etwa dreifach langsamere Deaktivierung, $\tau_{deakt} = 371$ ms.

Es wurden Pulsprotokolle verwendet, um Veränderungen des spannungsabhängigen Aktivierung der KCNQ1-Kanalmutanten zu analysieren. Dazu wurden für jede Kanalmutante Stromfamilien mit Depolarisationpotentialen zwischen -80 und +70 mV aufgezeichnet. Die Tailströme wurden bei einem Tailpotential von -30 mV gemessen (Abb. III.4). KCNQ1-Kanäle besitzen den bereits beschriebenen "Hook" im Tail, der als Ausdruck einer Erholung inaktivierter Kanäle über den Offen-Zustand anzusehen ist, wurden die Tailströme im

tiefsten Punkt des Tailstroms gemessen. Da bei -30 mV bereits einige Kanäle wieder aktivieren, bleibt eine geringe Messunschärfe, vor allem bei einer Mutante wie A300W, bei der die Aktivierung im Tail besonders auffiel. Die Betrachtung der Stromfamilien dieser Gruppe zeigte keine auffälligen Änderungen der Aktivierungskinetik gegenüber dem Wildtypkanal. Die gewonnen Messwerte für die Aktivierung lagen alle im Bereich des Wildtyps. Dabei zeigte sich eine schnelle, initiale Aktivierung im Bereich von Millisekunden und eine zweite, langsamere Komponente, die im Bereich zwischen einer halben und einer Sekunde lag.

	$\tau_{akt 1}$ [ms]	$\tau_{akt 2}$ [ms]	% $\tau_{akt 1}$	τ_{deakt} [ms]
wt	40 ± 1.0	820 ± 30	77.8 ± 0.9	138 ± 3.7
L266W	37 ± 3.1	910 ± 40	54.4 ± 1.5	175 ± 12.1
F270A	51 ± 2.9	810 ± 60	47.3 ± 2.6	116 ± 8.4
G272W	53 ± 2.1	1060 ± 110	73.0 ± 1.5	169 ± 7.9
L273W	32 ± 1.5	5900 ± 1000	72.8 ± 1.7	371 ± 31
Y278W	52 ± 3.0	890 ± 30	55.5 ± 1.1	121 ± 6.9
F279W	81 ± 5.8	680 ± 50	69.2 ± 0.7	109 ± 4.3
A300W	65 ± 0.4	410 ± 50	54.1 ± 2.1	83 ± 4.6
W323A	38 ± 2.1	1060 ± 40	56.8 ± 3.4	80 ± 5.0
V324W	37 ± 1.2	1040 ± 160	89.6 ± 1.3	144 ± 4.8
T327W	91 ± 2.4	860 ± 40	57.9 ± 1.2	139 ± 5.3
F335A	38 ± 2.0	700 ± 160	83.6 ± 3.7	106 ± 1.7

Tabelle III: Aktivierungs- und Deaktivierungsparameter für KCNQ1-Tryptophan-Mutationen mit $|\Delta\Delta G_0^w| < 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$

Die für KCNQ1 Kanäle typische zwei-phasige Aktivierung, schnelle initiale Aktivierung, die auch den größten Teil der Stromamplitude ausmacht. Gefolgt von einem langsameren Anteil, der in den meisten Fällen zwischen 30 und 40 % der Amplitude stellte. Sämtliche Kanäle lagen im Bereich von $\tau_{akt 1}$ = 37-91 ms und $\tau_{akt 2}$ = 410-1060 ms. Ausnahme: L273W mit $\tau_{akt 1}$ = 32 ms und $\tau_{akt 2}$ = 5900 ms, der auch vergleichsweise langsam deaktiviert τ_{deakt} = 371 ms. Alle Werte sind jeweils mit dem Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Anzahl der Messungen n lag bei 130 für Wildtyp und zwischen 8 und 12 für die Mutationen.

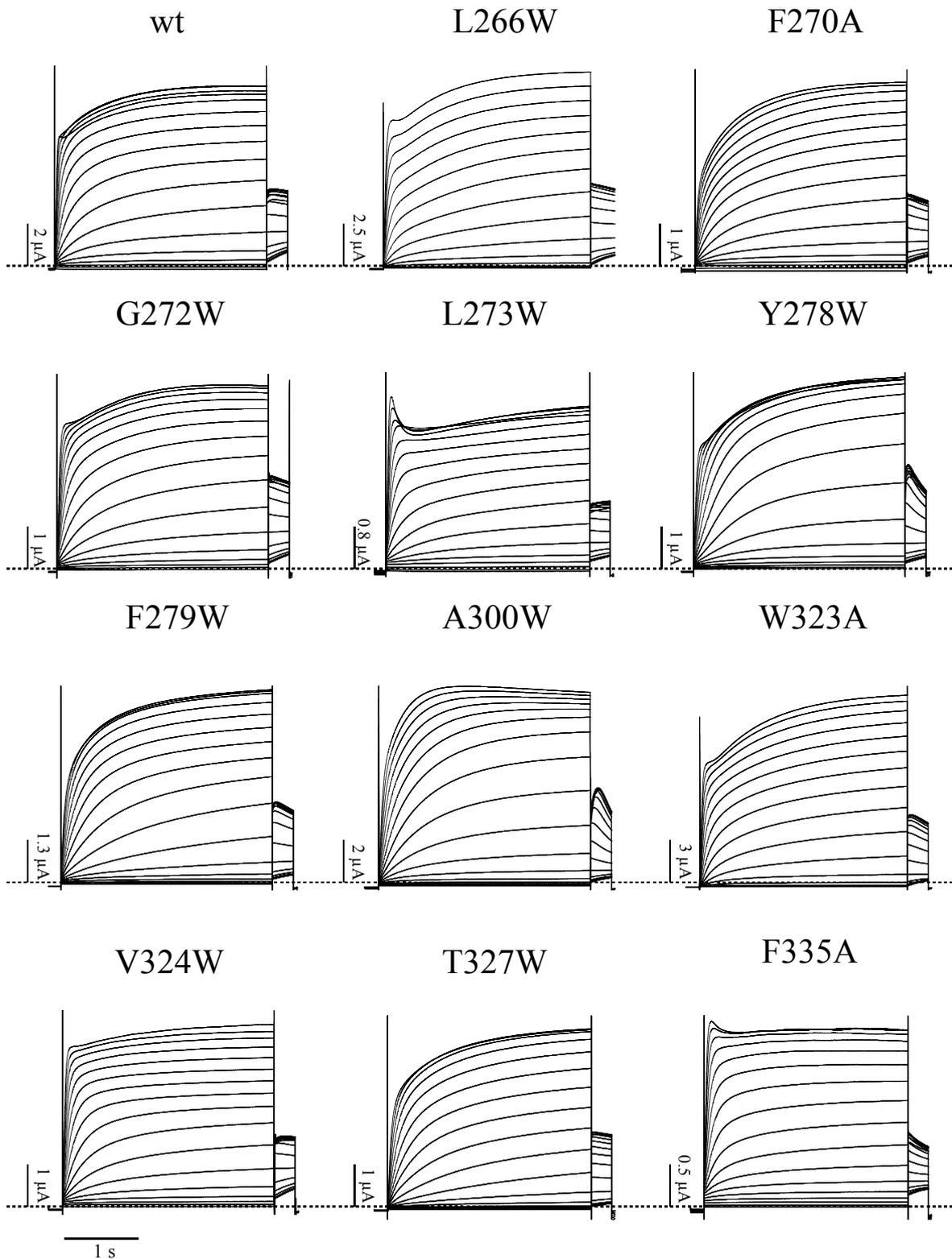


Abbildung III.4 : KCNQ1-Tryptophan-Mutanten ohne relevante Veränderungen des spannungsabhängigen Gating

Stromfamilien für Wildtyp und elf mutierte KCNQ1-Kanäle. Das Haltepotential lag bei -100 mV. Depolarisierungen fanden im Bereich von -80 bis +70 mV in 10 mV Schritten statt. Tailströme wurden bei -30 mV gemessen. Der vertikale Balken zeigt die Stromamplitude, der horizontale Balken die Testpulsdauer.

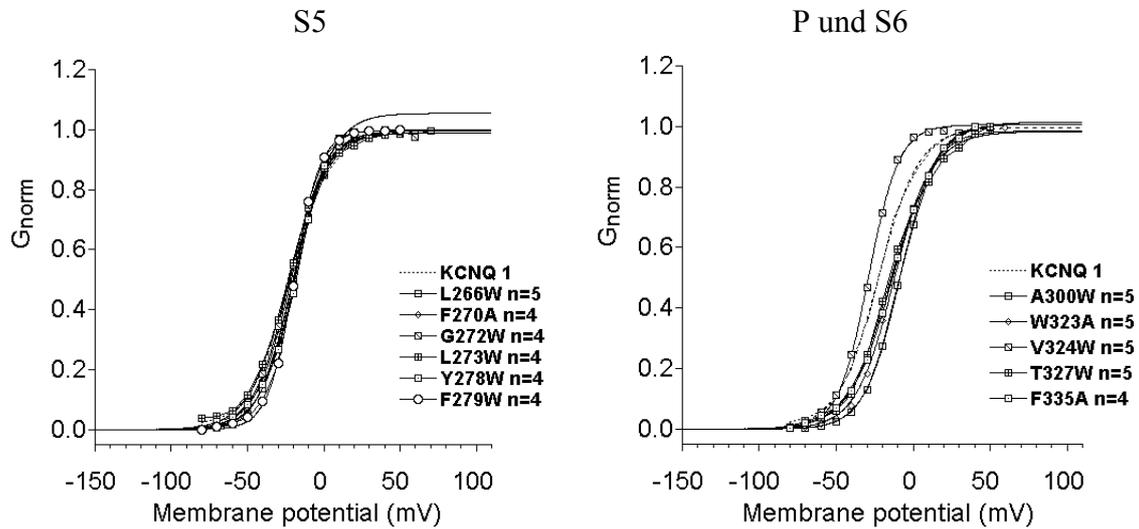


Abbildung III.5: G-V-Beziehungen für KCNQ1-Mutanten mit einem $|\Delta\Delta G_0^W| < 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$. Elf Mutanten zeigten nur geringe Abweichungen der ΔG_0 -Werte vom Wildtyp. Gezeigt sind die gemittelten, normierten Leitfähigkeiten der einzelnen Mutationen. n gibt die Anzahl der gemittelten Messungen an. Die Standardabweichung vom Mittelwert wurde aus Darstellungsgründen nicht gezeigt.

Spannungsabhängige Inaktivierung wurde in dieser Gruppe für die KCNQ1-Mutationen L273W und F335A beobachtet, kam aber erst nach Erreichen der maximalen Leitfähigkeit des Kanals zustande. Die gemessenen Tail-Ströme wurden gegen die Testpotentiale aufgetragen. Die spannungsabhängige Aktivierung lies sich mittels einer Boltzmann-Funktion mit zwei Stadien beschreiben. Anhand der Funktion wurden $V_{1/2}$ - und z -Werte für jeden Kanal bestimmt, mit denen dann die Berechnung von $\Delta\Delta G_0^W$ -Werten möglich war (Tabelle II).

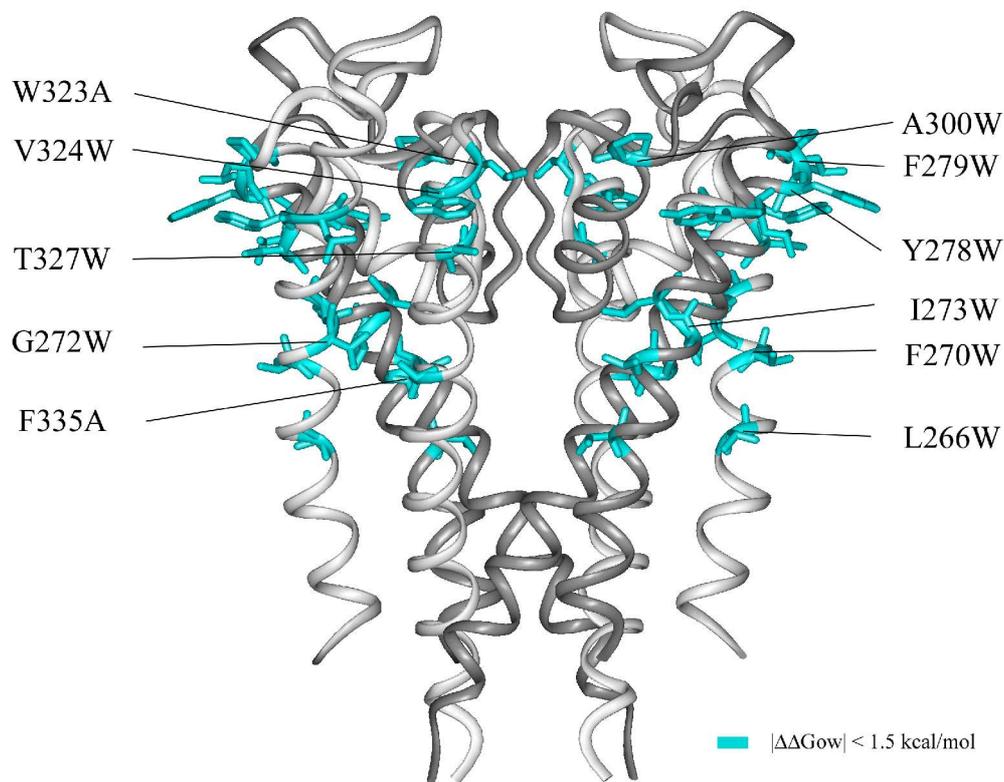


Abbildung III.6: KCNQ1-Mutationen mit gering verändertem Gating

Die in hellblau hervorgehobenen KcsA-Aminosäuren entsprechen den KCNQ1-Mutanten, die ein ähnliches, spannungsabhängiges Aktivierungsverhalten wie der Wildtyp-Kanal zeigten. $|\Delta\Delta G_0^w| < 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Exemplarische G-V-Beziehungen für die Kanalmutanten zeigt Abbildung III.5. Für diese elf KCNQ1-Kanalmutationen waren die ermittelten $|\Delta\Delta G_0^w|$ -Werte alle kleiner als $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, zwischen $0.3 - 1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$. Basierend auf diesen relativ geringen energetischen Störungen während der Aktivierung der Kalium-Kanäle gegenüber dem Wildtyp, wurden diese KCNQ1-Mutanten als Wildtyp-ähnlich klassifiziert (Tabelle II).

Das Homologie-Modelling dieser Aminosäurereste im KcsA-Modell ergab, dass drei KCNQ1-Mutanten in der Porenhelix (A300W, V324W, T327W) lagen und nur eine der elf Aminosäurereste (L266W) in der unteren Hälfte des KcsA Modells lokalisiert war (Abb. III.6). Alle anderen markierten Reste zeigten eine Verteilung im oberen Drittel des Kanals.

3.2 Mutationen mit spannungsabhängiger Inaktivierung

Fünf Mutanten (I268W, V334W, S338W, F339A, F340A) zeigten Ströme mit deutlich veränderten Kanaleigenschaften, obwohl die G-V-Analyse keine wesentlichen Änderungen der spannungsabhängigen Aktivierung im Vergleich zum Wildtypkanal zeigte. Die berechneten $|\Delta\Delta G_0^w|$ -Werte zeigten keine relevanten Änderungen der spannungsabhängigen Aktivierung gegenüber KCNQ1-Wildtyp (Werte zwischen, 0.1-1.2 kcal mol⁻¹; Tabelle II; Abb. III.7). Dennoch zeigten die mutierten Kanäle in dieser Kategorie deutliche Veränderungen vor allem im Bereich der Stabilität von Geschlossen- und/oder Offen-Zuständen. Die mutierten KCNQ1-Kanäle zeigten Auswärtsströme, die bei stärker depolarisierenden Testpotentialen deutlich spannungsabhängig inaktivierten. Bei +60 mV Testspannung, zeigten die Auswärtsströme von V334W und S338W nach einer sehr schnellen Aktivierungsphase, eine schnelle Inaktivierung der Stromkurve, im Bereich von Millisekunden. KCNQ1 V334W zeigte ein τ_{inakt} von 190 ms. Für S338W war die Inaktivierung mit einem τ_{inakt} von 112 ms noch deutlich schneller. I268W und F340W zeigten neben einer spannungsabhängigen Stromkomponente, auch eine nicht-spannungsabhängige Komponente. Selbst bei sehr negativen Potentialen, z. B. -120 mV, bei denen KCNQ1-Kanäle in der Regel geschlossen sind, konnten bei diesen Mutanten Einwärtsströme beobachtet werden. Die GV-Beziehung näherte sich daher nicht wie für KCNQ1 typisch der Nulllinie an, sondern zeigte ein Leckniveau. Daher wurde ein Boltzmann-Fit mit offset eingesetzt, um den spannungsabhängigen Anteil des Stroms untersuchen zu können (Abb. III.8; III.9).

Zur Überprüfung, ob die gemessenen Ströme tatsächlich durch defekte Kanäle verursacht wurden, diente Clofilium-tosylat, ein spezifischer KCNQ1-Blocker. Die KCNQ1-Mutanten I268W, S338W (nicht gezeigt) und F340A wurden damit geblockt. 100 μM Clofilium-tosylat in der ND-Badlösung reduzierte die Kanalaktivität von KCNQ1-Wildtyp-Kanälen (nicht gezeigt; vgl. Arena und Kass, 1988) und der Mutation F340A um etwa 80% (Abb. III.9). Dabei reduzierte die Applikation von 100 μM Clofilium-tosylat sowohl den spannungsabhängigen Strom von F340A, als auch den nicht-spannungsabhängigen „Leckstromanteil“ ungefähr gleich stark. Die Applikation von 100 μM Clofilium-tosylat reduzierte das Maximum der Stromamplitude von I268W nur um ca. 30% (Abb. III.9) und von S338W um rund 25% (nicht gezeigt).

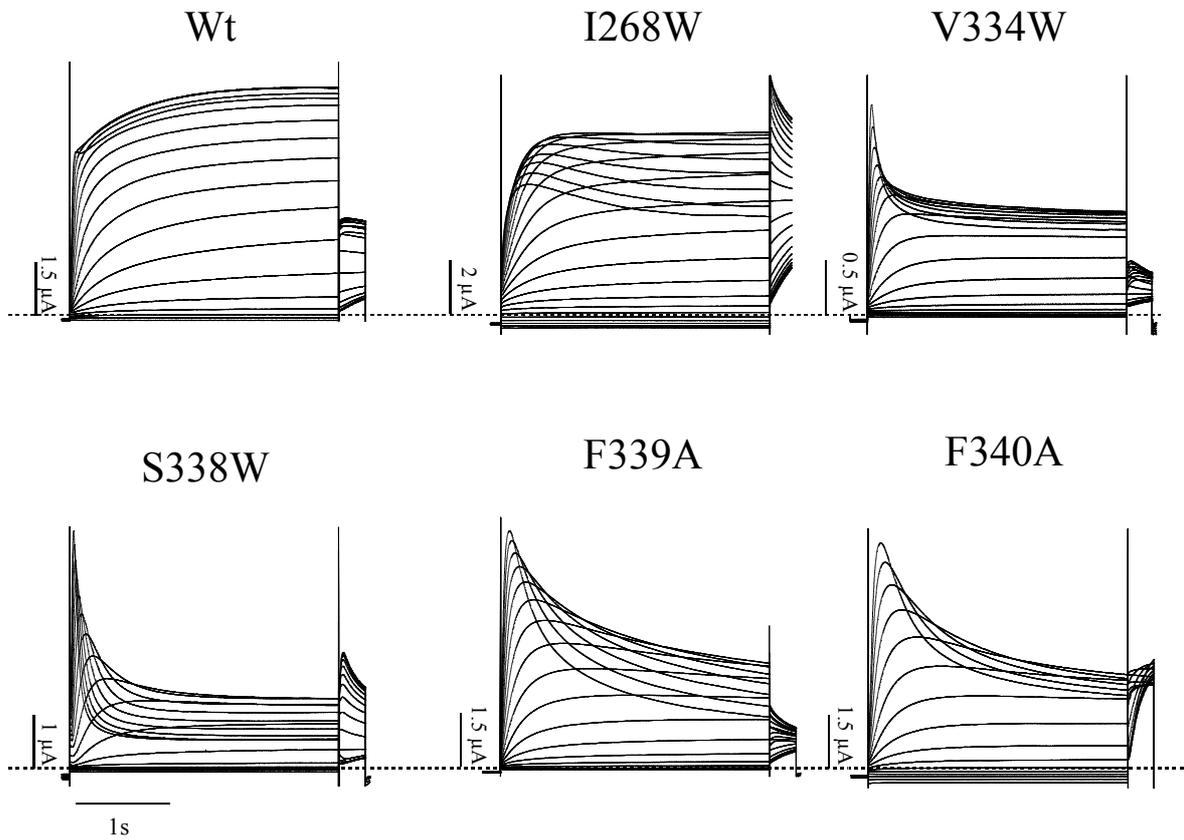


Abbildung III.7: Spannungsabhängig inaktivierende KCNQ1-Mutationen

Fünf KCNQ1-Mutationen mit stark spannungsabhängiger Inaktivierung bei nur gering verändertem $\Delta\Delta G_0^W$. Die gestrichelte Linie zeigt die Nulllinie an. Der vertikale Balken zeigt die Stromamplitude, der horizontale Balken die Testpulsdauer. Stromfamilien wurden mit depolarisierenden Testpulsen im Bereich von -120 mV bis +80 mV aufgezeichnet.

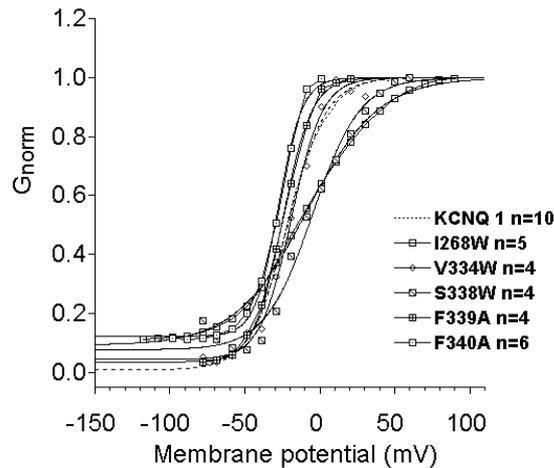


Abbildung III.8: Normalisierte G-V-Beziehung der inaktivierenden KCNQ1 Mutationen

Gezeigt sind die gemittelten, normierten Leitfähigkeiten der einzelnen Mutationen. n gibt die Anzahl der gemittelten Messungen an. Die Standardabweichung vom Mittelwert wurde aus Darstellungsgründen nicht gezeigt. $\Delta\Delta G_0^W$ -Werte: I268W= +1.1 kcal mol⁻¹; V334W=-0.1 kcal mol⁻¹; S338W=+1.1 kcal mol⁻¹; F339A=-0.5 kcal mol⁻¹; F340A=-1.1 kcal mol⁻¹

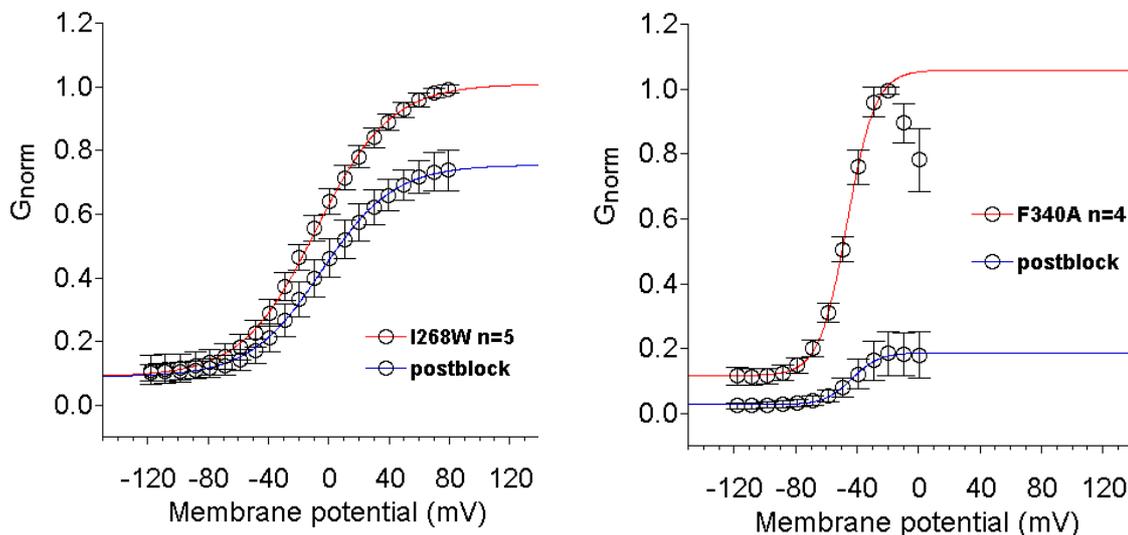


Abbildung III.9: Exemplarische G-V-Kurven für KCNQ1-Mutanten I268W und F340A vor und nach Blockversuch mit dem spezifischen KCNQ1-Blocker Clofilium-tosylat (100 µM-Lösung)

Gezeigt sind die gemittelten, normierten Leitfähigkeiten vor und nach 100 µM Clofilium-tosylat Blockade. n gibt die Anzahl der gemittelten Messungen an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an.

Das Markieren der homologen Aminosäurereste dieser fünf Mutanten in der KcsA-Kristall-Struktur zeigte, dass die entsprechenden KcsA-Reste (grün markiert in Abb. III.10) auf einem engen Raum tief in der Membran, unmittelbar unter dem Selektivitätsfilter gruppiert lagen. Auffällig war die KCNQ1-Mutante I268W, die sich als einzige Aminosäure im Transmembransegment S5, im Modell auf gleicher Höhe wie die in S6 gelegenen Reste zeigte.

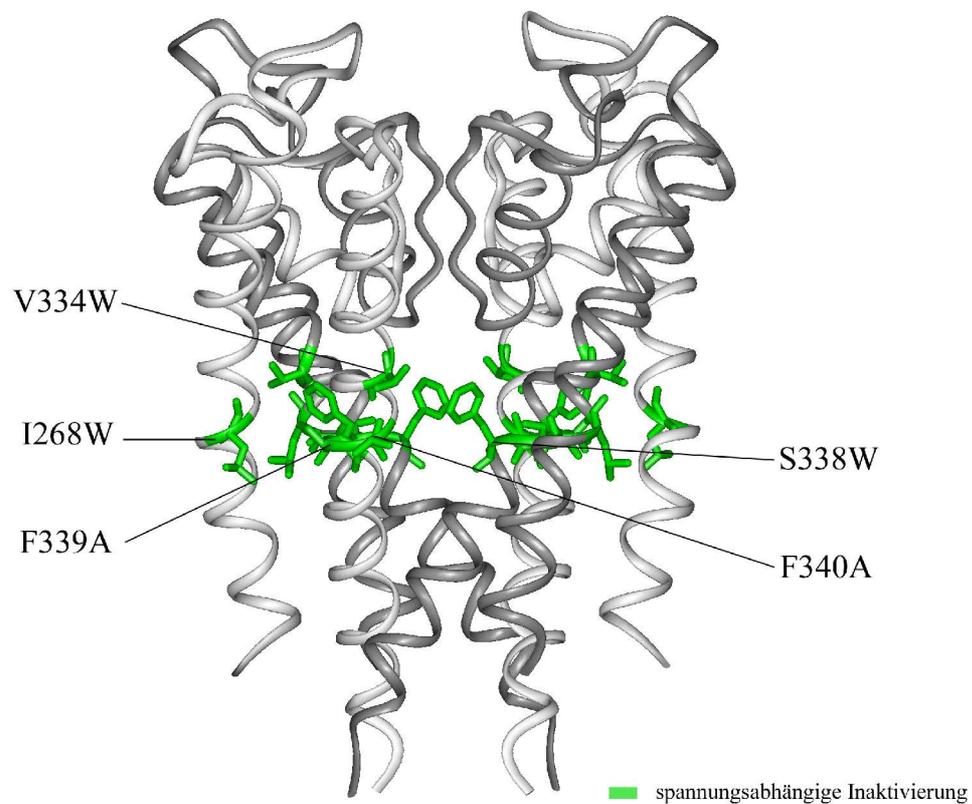


Abbildung III.10: Mutationen ohne veränderte Gatingeigenschaften, mit destabilisierter Pore
Grün markiert sind solche KcsA-Reste, die als KCNQ1-Mutation zu verstärkter Inaktivierung und/oder Störung des Offen-/Geschlossen- Zustandes führten.

3.3 Mutanten mit veränderter Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Neun Mutanten zeigten eine deutlich veränderte Spannungsabhängigkeit der Aktivierung gegenüber dem Wildtyp-Kanal. Abbildung III.11 zeigt exemplarische Stromfamilien dieser Kanäle. Acht Mutanten (R259W, Q260W, E261W, T264W, L271W, F275W, L282W und L347W) hatten $V_{1/2}$ -Werte, die zu positiveren Spannungen verschoben waren. Die Steigungen (z-Wert) der GV-Kurven in $V_{1/2}$ (siehe Abb. III.11, Tabelle II) waren der des Wildtyps ähnlich. Als Ausnahme zeigte sich dabei die KCNQ1-Mutante T264W, bei die Steigung der sich die Steigung deutlich verringerte ($z = 0.8$; Abb. III.11). Die energetische Störung der spannungsabhängigen Aktivierung war am stärksten bei der Mutante E261W ausgeprägt, mit einem $V_{1/2} = +93$ mV. Die meisten Kanäle aus dieser Gruppe aktivierten bei einer Depolarisation nach +60 mV in der ersten Phase ($\tau_{akt 1}$) 2-3 mal langsamer als der Wildtyp-Kanal.

	$\tau_{akt 1}$	$\tau_{akt 2}$	% $\tau_{akt 1}$	τ_{deakt}
	[ms]	[ms]		[ms]
wt	40 ± 1	820 ± 30	77.8 ± 0.9	138 ± 3.7
R259W	95 ± 6	1010 ± 40	40.8 ± 1.9	113 ± 5.8
Q260W	51 ± 2	350 ± 40	70 ± 3.2	54 ± 1.4
E261W	152 ± 2	2150 ± 140	40 ± 2.6	75 ± 3
I263W	65 ± 2	810 ± 90	73.9 ± 2.3	
T264W	139 ± 2	5290 0± 1100	77.4 ± 2.8	163 ± 7.9
L271W	199 ± 9	1740 0± 200	78.4 ± 1.4	276 ± 14
F275W	127 ± 3	1830 0± 90	63.1 ± 0.9	156 ± 9
L282W	63 ± 3	980 ± 20	64.8 ± 1.3	56 ± 5.6
L347W		13600 ± 4300		60 ± 2.4

Tabelle IV: Aktivierungs- und Deaktivierungsparameter für KCNQ1-Kanäle mit veränderter spannungsabhängiger Aktivierung

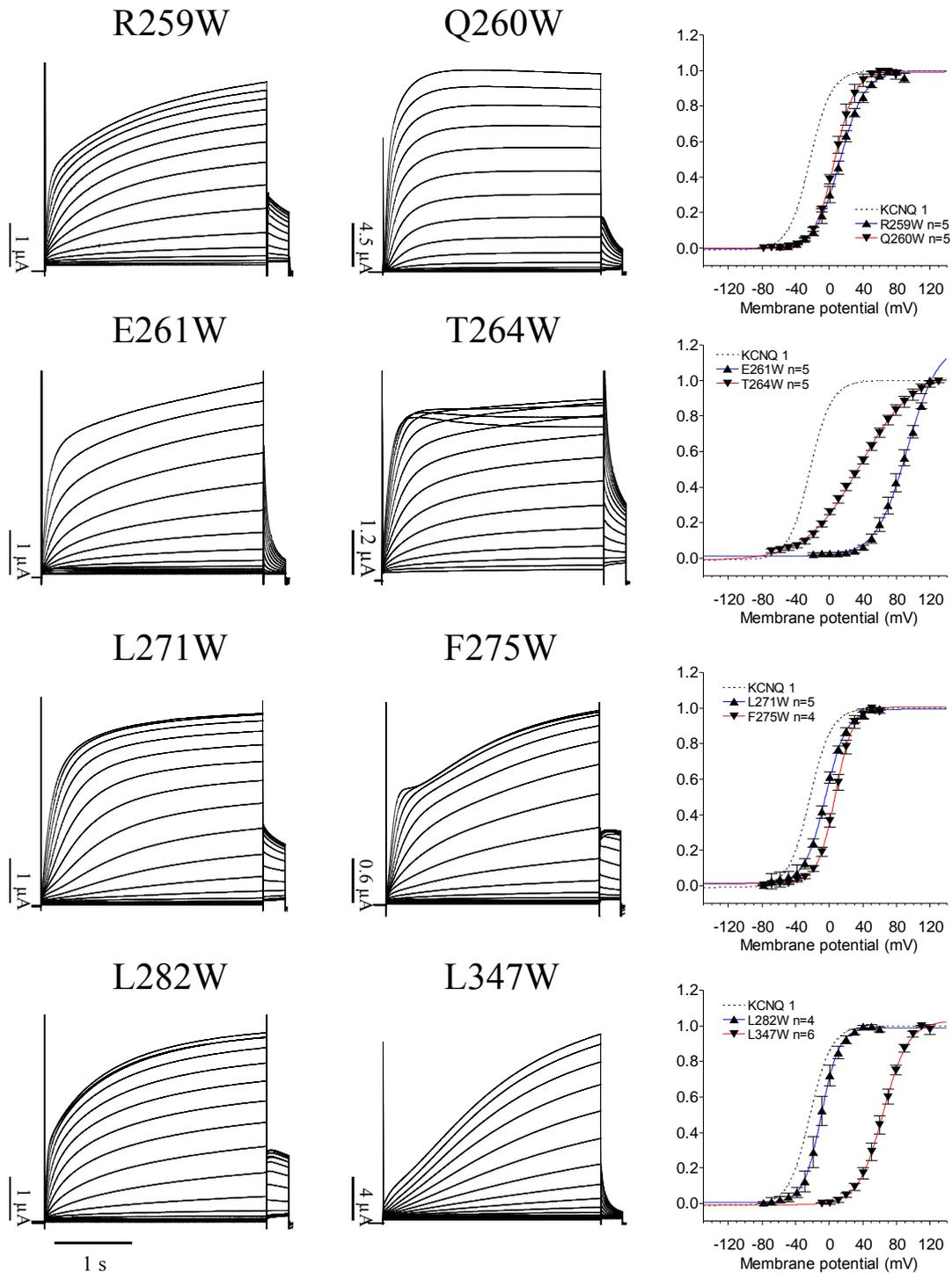


Abbildung III.11: KCNQ1-Mutationen mit $\Delta\Delta G_0^{\text{w}} \geq 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$

Exemplarische Stromfamilien der acht KCNQ1-Kanal-Mutanten mit zu positiveren Werten verschobener, spannungsabhängiger Aktivierung. Für alle Stromfamilien lag das Haltepotential bei -100 mV und Depolarisationspotentiale lagen zwischen -80 mV und $+120 \text{ mV}$ mit 10 mV Intervallen. Allen Testpulsen folgte ein Tailpotential von -30 mV . Die vertikalen Achsen zeigen die Stromamplitude, die horizontalen Achsen die Testpulsdauer. Rechts daneben finden sich die entsprechenden, normalisierten G-V Beziehungen, wobei der Wildtyp als gestrichelte Linie ausgewiesen ist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert.

Die Mutante L347W zeigte die auffälligste Veränderung der Aktivierung. L347W-Ströme aktivierten sehr langsam ($\tau_{\text{akt}} = 13.6$ s) und erreichten während der üblichen 3 s Pulse kein Plateau. Der Stromkurvenverlauf und das Gatingverhalten ähnelten dem Verhalten von KCNQ1-Kanälen, die mit KCNE1- β -Untereinheiten coexprimiert wurden (Barrhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996).

Im Gegensatz zu dem bereits erwähnten Tryptophan-Mutanten-Scan der Transmembranhülle der *Shaker*-Porendomäne (Li-Smerin et al., 2000) fand sich für KCNQ1 nur ein mutierter KCNQ1-Kanal (I263W), der bei deutlich negativeren Potentialen als der Wildtypkanal öffnete (Abb. III.12, Tabelle II). Betrachtet man die I263W-Aktivierungskinetik bei einem einfachen Testpuls vom Haltepotential bei -100 mV nach +60 mV, so war keine auffällige Änderung gegenüber dem Wildtyp-Kanal zu erkennen (Tabelle IV).

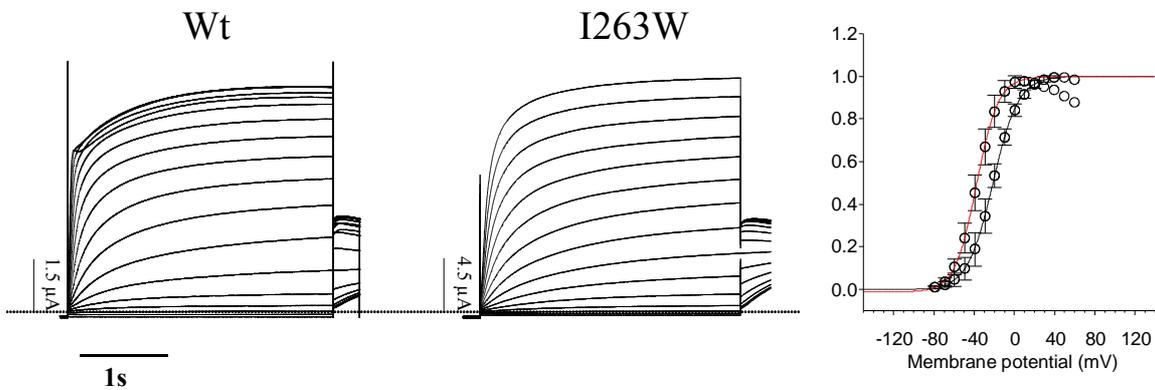


Abbildung III.12: Eine KCNQ1-Mutation zeigte ein $\Delta\Delta G_0^{\text{W}} \leq -1.5$

Familie von Stromkurven für KCNQ1 Wildtyp und Mutation I263W mit den dazugehörigen normalisierten Leitfähigkeits(G_{norm})-Spannungs(V)-Beziehung für I263W KCNQ1-Kanäle. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung vom Mittelwert. $\Delta\Delta G_0^{\text{W}} = 1.8$ kcal mol $^{-1}$ (siehe Tabelle II)

Die $|\Delta\Delta G_0^W|$ -Werte lagen im Bereich von 1.5-6.1 kcal mol⁻¹. Basierend auf diesen, im Vergleich zu allen anderen Mutationen, sehr großen energetischen Änderungen gegenüber dem Wildtyp, wurde diese Gruppe von Mutanten als Aminosäurereste mit deutlich veränderter, spannungsabhängiger Aktivierung bezeichnet. Der größte Teil der Mutanten in dieser Gruppe führte zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem Offen- und Geschlossen-Kanalzustand in Richtung des geschlossenen Zustands (positives $\Delta\Delta G_0^W$). Nur eine Mutante (I263W) neigte dazu schon bei weit niedrigeren Testpotentialen zu öffnen, das heißt diese Mutante favorisierte den Offenzustand verglichen mit KCNQ1 (negatives $\Delta\Delta G_0^W$).

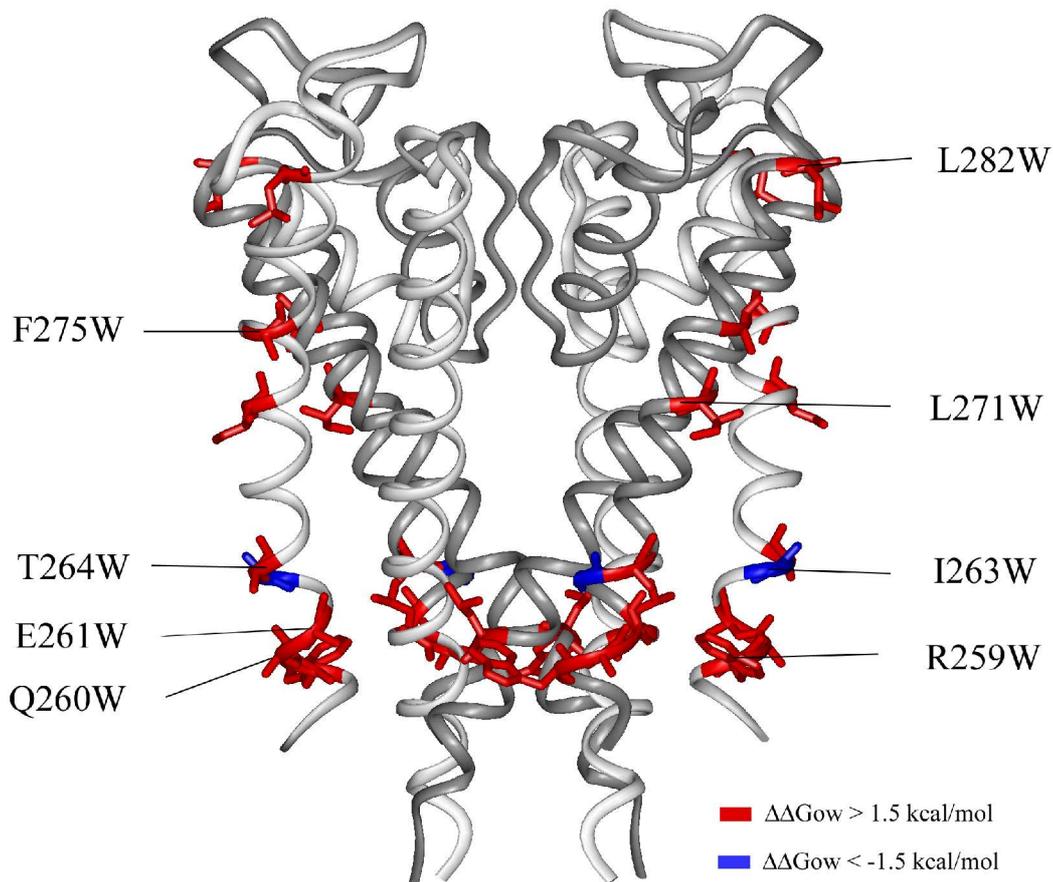


Abbildung III.13: KCNQ1-Mutanten mit deutlich veränderter, spannungsabhängiger Aktivierung
Acht KcsA-Aminosäurereste wurden rot markiert, entsprechend den KCNQ1-Mutanten mit einer gegenüber dem Wildtyp erschwerten, spannungsabhängigen Aktivierung $\Delta\Delta G_0^W \geq 1.5$ kcal mol⁻¹. Die einzige Mutante mit einem negativen $\Delta\Delta G_0^W$ wurde blau eingezeichnet ($\Delta\Delta G_0^W = 1.8$ kcal mol⁻¹)

Auch die deutlich mutationssensitiven Aminosäurereste wurden im KcsA-Kanalmodell markiert (rot und blau in Abb. III.13). Es zeigte sich, dass sich die korrespondierenden Aminosäurereste im KcsA-Kanalmodell sich vor allem in zwei Bereichen befanden. Der erste Bereich, bestehend aus L271W, F275W und L282W, lag in der oberen, äußeren Helix, dezentral, von der Pore weg gerichtet. Dabei scheint die Kontaktstelle zwischen den Monomeren, das so genannte Interface, nicht involviert zu sein. Ein zweiter Bereich (R259W, Q260W, E261W, I263W, T264W und L347W) lag im unteren Drittel des Kanals. Auf dieser Höhe liegt die Transmembranhülle um den inneren, zytoplasmatisch gelegenen Eingang, bei dem in KcsA die inneren Helices eng gebündelt liegen und vermutlich das Kanal-Tor (gate) bilden (Doyle et al., 1998; Zhou et al., 2001). Dabei lag L347W direkt im so genannten „Bundle crossing“, in dem sich die S6-Segmente der einzelnen Monomere kreuzen. Alle anderen Mutationen aus dieser Gruppe lagen auf gleicher Höhe wie das „Bundel crossing“, jedoch im S5-Transmembransegment lokalisiert.

IV Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Punktmutationen im KCNQ1-Porenmodul untersucht. Dabei wurde besonderer Wert auf den letzten Schritt des spannungsabhängigen Gating-Prozesses, dem Öffnen der Pore, gelegt. Grundlage dafür ist die Beobachtung, dass das Gating von spannungsabhängigen Kaliumkanälen sehr sensitiv auf den Austausch von einzelnen Aminosäuren reagiert (Schoppa and Sigworth, 1998b; Ledwell and Aldrich, 1999; Li-Smerin et al., 2000; Hong and Miller, 2000). Dieses sensible Verhalten des Gatings auf Änderungen durch Mutationen enthält wichtige Informationen über Energien und Mechanismen, die für das Öffnen der Pore notwendig sind. Ist die Pore geschlossen, sind die Aminosäuren in einer bestimmten Weise dicht gepackt. Öffnet der Kanal, wird diese Ordnung aufgehoben und neu zur Offen-Struktur sortiert. Mutiert man eine Aminosäure, die im Geschlossen- und im Offen-Zustand unterschiedliche Positionen einnimmt, sollte dies

als energetischer Effekt auf den Offen- und Geschlossen-Zustand messbar sein. Dies würde zu einem verschobenen Gating-Gleichgewicht führen (Yifrach et al., 2002). Auch wenn sich aus diesen Informationen keine direkten Schlüsse auf physikalische Mechanismen ziehen lassen, zeigen sich aber Stellen im Kanal, an denen Umlagerungen und Veränderungen während des Gatings ablaufen. Zusätzlich erhält man Information über die Stabilität des jeweiligen Zustands des Kanals, abhängig davon in welcher Richtung sich der $V_{1/2}$ -Wert verschiebt (Yifrach et al., 2002).

Anhand der KcsA-Kristall-Struktur wurden solche Aminosäurereste ausfindig gemacht, die von einer zentralen Achse weg gerichtet die transmembranäre Hülle der KcsA-Poren-Domäne bilden. Basierend auf der Kombination von Sequenzalignment und der KcsA-Kristall-Struktur (Doyle et al., 1998) wurden 37 Aminosäurereste in der KCNQ1-Porendomäne identifiziert (Abb. III.1, III.2). Diese Aminosäuren wurden von Dr. N. Schmitt und S. Jacob zu Tryptophan und bzw. zu Alanin mutiert (Tab. I).

In *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierte KCNQ1-Kanäle sind geschlossen, wenn die Membran hyperpolarisiert ist und öffnen bei Depolarisation. Die Kaliumleitfähigkeit, als Funktion abhängig von der Membranspannung, zeigt eine sigmoide Aktivierungskurve. Diese steigt erst langsam an, wird dann steil und findet dann eine Sättigung in der maximalen Aktivierung. Dieser Aktivierungsprozess ließ sich am besten mit einer Boltzmann-Funktion mit zwei Stadien analysieren. Bestimmt wurden die unabhängigen Variablen $V_{1/2}$ (die halb maximale Öffnung der Kanäle) und z (die Steigung der Kurve in $V_{1/2}$). z ist dabei ein Äquivalent für die bewegte Ladung im Kanal während des Gatings (Hille, 2001). Für alle der funktionell exprimierenden Kanäle konnten $V_{1/2}$ und z -Werte bestimmt werden. Es fanden sich keine Kanäle mit mehrphasiger Aktivierung. Um Störungen des Kanalverhaltens durch lokale Veränderungen quantifizieren zu können, wurde die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden $\Delta\Delta G_0$ -Werte berechnet. Da zum Teil sehr unterschiedlich große Volumenänderungen durch die Mutationen hervorgerufen wurden, wurden die $\Delta\Delta G_0$ -Werte auf die Seitenkettenvolumenänderung ($\Delta\Delta G_0^w$) normiert.

Um die Veränderungen in $V_{1/2}$ und z interpretieren zu können, wurde ein Gatingmechanismus mit zwei Zuständen, Offen und Geschlossen, angenommen. In diesem Modell bedeutet eine Verschiebung im Gleichgewicht zwischen diesen beiden Zuständen ein verändertes $V_{1/2}$, jedoch keine Änderung des z -Wertes (Yifrach et al.; 2002). Es ändert sich nur der Mittelpunkt der Aktivierungskurve, nicht jedoch die Steilheit der Kurve. Der gleiche Gating-

Mechanismus lässt sich für Kanäle anwenden, bei denen vier Untereinheiten unabhängig voneinander vom Geschlossen- in den Offen-Zustand übergehen, der Kanal jedoch erst leitet, wenn alle vier den Offen-Zustand erreicht haben. Nach Yifrach et al., 2002 läßt sich dann annehmen, dass ein sehr später Schritt, kurz vor dem Öffnen des Kanals, beeinflusst wurde, wenn ein größeres $V_{1/2}$ mit einer flacheren Steigung in diesem Punkt einhergeht. Ist der z -Wert größer und der Mittelpunkt der Aktivierung zu negativeren Potentialen verschoben. Ist dies nicht der Fall, ist eine Interpretation der Daten nicht ohne weitere Untersuchungen oder mit einem anderen Gating-Modell möglich.

1 Wildtyp-ähnliche KCNQ1 Mutationen

Eine relativ große Anzahl der mutierten KCNQ1-Kanäle zeigte ein wildtyp-ähnliches Gating-Verhalten (L266W, F270A, G272W, L273W, Y278W, F279W, A300W, W323A, V324W, T327W und F335A). Diese Kalium-Kanäle zeigten im Vergleich zum Wildtyp-Kanal kaum Veränderungen bezüglich Ihrer Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik, sowie der Spannung für die halbmaximale Aktivierung und der Steilheit der GV-Kurve in diesem Punkt (z). Die Homologiemodellierung der elf Aminosäurereste, basierend auf der KcsA-Kristall-Struktur (Abb. III.6), zeigte ein definiertes Verteilungsmuster. Die Mutanten lagen fast ausschließlich in der oberen Hälfte der transmembranären Porenhülle, wo die Außen-, Innen- und Porenhelices äußerst dicht gepackt liegen.

Bei den *Shaker*-Tryptophan-Mutanten zeigten sich nur acht, wildtyp-ähnliche Kanäle, von denen zwei in der Porenhelix lagen. Im Homologiemodelling dieser *Shaker*-Mutanten zeigte das Verteilungsmuster eine ähnliche Verteilung wie für die KCNQ1-Mutanten, jedoch weniger konzentriert im oberen drittel des Kanalmodells.

Die wildtyp-ähnlichen Mutanten in der Porenhelix (A300W, V324W, T327W), die zwar im KcsA-Kristallstruktur-Modell nach Außen gerichtet erscheinen, aber eine große Nähe zum Selektivitätsfilter und der Pore besitzen, sollten gesondert betrachtet werden.

Besonders A300W zeigte eine wildtyp-ähnliche, spannungsabhängige Aktivierung, in den Tailstößen der Stromfamilie für die GV-Analyse (Abb. III.4) fiel jedoch eine veränderte Deaktivierung gegenüber dem Wildtyp auf. Somit ist die spannungsabhängige Aktivierung

gleich, jedoch weist die veränderte Deaktivierung auf Störungen des Gatings an anderer Stelle hin.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese wildtyp-ähnlichen Kanalmutanten nicht an einer Protein-Protein-Interaktion beteiligt sind. Es besteht die Möglichkeit, dass die Aminosäuren der transmembranären Außenhülle der KCNQ1-Porendomäne in der oberen Hälfte mit Lipiden oder kleinen wassergefüllten Spalten in der Membran interagieren. Andernfalls müsste man sehr präzise balancierte Störungen in allen Konformationstadien des KCNQ1-Kanals postulieren, die durch die großen Änderungen des Seitenkettenvolumens eher unwahrscheinlich sind. Als dritte Möglichkeit käme in Betracht, dass der Kanal in diesem Bereich so eng gepackt ist, dass kaum Bewegungen während des Gatings stattfinden, die zu energetischen Störungen führen würden.

Bei der Betrachtung des vor kurzem kristallisierten Modells für den KvAP-K⁺-Kanal (Jiang et al., 2003a/b) fällt auf, dass der Spannungssensoranteil S2, der an der Porenhülle entlang zu gleiten scheint, seine Bewegung vornehmlich in den unteren zwei Dritteln des Kanals ausführt. In dem Bereich, in dem sich die hier gezeigten Mutationen befinden, scheint ein erheblicher Abstand zwischen Sensor und Porenregion zu bestehen. Man kann sich daher gut vorstellen, dass gerade in dieser Region die nach Außen gerichteten, apolaren, sterisch großen Tryptophan-Reste nicht stören, da ohnehin Protein-Lipid-Interaktion vorzuliegen scheint.

In diesem Bereich der transmembranär-gelegenen Hülle scheinen sowohl KcsA- als auch KvAP-Kalium-Kanäle keine besonders großen Konformationsänderungen während des Übergangs vom Geschlossen- in den Offen-Zustand zu durchlaufen (Jiang et al., 2002b; Jiang et al., 2003b). Nimmt man ein ähnliches Verhalten und ähnlichen Aufbau für KCNQ1-Kalium-Kanäle an, würde eine sterisch große Aminosäure wie Tryptophan sich beim Gating nicht bemerkbar machen, da keine Änderungen der Kanalkonformation auftreten, die das Gating energetisch beeinflussen könnten. Wird jedoch der Aufbau des Kanals in dieser Region gestört, so kommt es leicht zu funktionell nicht exprimierenden Kanalmutanten (s.u.).

Bereits veröffentlichte Daten für Mutationen an den Positionen G272 und L273 zeigten eine wichtige Rolle bei Änderungen des Inaktivierungsverhaltens und der Kalium/Rubidium-Leitfähigkeit (G_K/G_{Rb}) (Seeböhm et al., 2003b). Die leichte, in der Stromfamilie von L273W zu erkennende, spannungsabhängige Inaktivierung wurde für verschiedene Punkt-

mutationen an dieser Stelle in unterschiedlicher Ausprägung gefunden. Es konnte jedoch keine klare Korrelation zu einer elektrochemischen Eigenschaft des Aminosäurerestes gezeigt werden. Eine besonders wichtige Rolle spielt dabei auch, dass Mutationen des KCNQ1-Kanals an Position L273 zu Alanin und Glutamin keine funktionelle Expression zeigen und beim Menschen zu verschiedenen Formen des LQT-Syndroms führen (Wang et al. 1996b; Shalaby et al., 1997; Saarinen et al., 1998; Splawski et al. 2000; Seeböhm et al. 2001). Auch in diesen Arbeiten wurde ein dreidimensionales Modell von KcsA verwendet, in dem L273 und V307 als mögliche Interaktionspartner diskutiert wurden (Seeböhm et al., 2001; Seeböhm et al., 2003b).

Für L273 wurde eine Interaktion mit der Porenhelix und dem Selektivitätsfilter diskutiert, die sowohl den Ionenfluss als auch die KCNQ1-Inaktivierung beeinflusst (Seeböhm et al., 2003b). Für T307W konnte in dieser Arbeit keine funktionelle Expression gefunden werden (s. u.), passend zu den bereits publizierten Daten, die an dieser Position nur für Mutationen nach Cystein oder Serin eine funktionelle Expression zeigten.

Für G272 wurde I337 als möglicher Interaktionspartner in S6 diskutiert, beruhend auf der Erkenntnis, dass in Kv2.1 K⁺-Kanälen die homologen Aminosäuren G421 und Y480 (S6) in der Lage sind, den Offen-Zustand über eine S6-Porenhelix-Interaktion zu stabilisieren (Liu und Joho, 1998; Seeböhm et al. 2003b). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zu G272W zeigen keine verstärkte spannungsabhängige Inaktivierung, doch eine genauere Betrachtung des Hooks, der als Ausdruck für die spannungsunabhängige, KCNQ1 typische Inaktivierung im Tail zu finden ist, wurde nicht durchgeführt.

2 Spannungsabhängig inaktivierende KCNQ1 Mutationen

Eine Gruppe von fünf Mutationen (I268W, V334W, S338W, F339W, F340A) führte zu KCNQ1-Kanälen, die Auswärtsströme mit einer KCNQ1 untypischen, spannungsabhängig inaktivierenden Komponente zeigten (Abb. III.7). Zusätzlich fiel bei I268W und F340A in den aufgezeichneten Stromfamilien auf, dass sie selbst bei sehr negativen Testpotentialen, im Bereich bis -120 mV, nicht vollständig geschlossen werden konnten.

In der KcsA-Kristall-Struktur verteilen sich diese Aminosäurereste auf einem Ring, zwischen den stark gating-veränderten, in der Nähe des „Bundel crossings“ liegenden Aminosäureresten und den wildtyp-ähnlichen Mutationen in der oberen Hälfte der Kanalstruktur (Abb. III.10). Genau in dieser Region befindet sich auch die für die Kalium-Kanalfunktion äußerst wichtige Knickstelle, der sog. „hinge point“, die dem Glyzin 99 in KcsA und dem Alanin 336 in KCNQ1 entspricht (siehe Abb. 1.2; Jiang et al., 2002b). Dieses „Gating-Hinge“ ist essentiell für die Konformationsänderung der Pore von KcsA- und MthK-Kanälen, die beim Übergang vom Geschlossen- in den Offen-Zustand auftritt (Jiang et al., 2002b).

Es fanden sich neben dem bereits weiter oben erwähnten KCNQ1-Rest I337 (Seeböhm et al., 2003b), der hier nicht untersucht wurde, eine ganze Gruppe stark spannungsabhängig inaktivierender KCNQ1-Mutanten (S338W, F339A, F340A). Für die beiden Alanin KCNQ1-Mutationen wurde diese Inaktivierung bereits kürzlich beschrieben (Seeböhm et al., 2003a) und die Blockierbarkeit dieser Mutanten im Vergleich zum Wt-Kanal durch das Benzodiazepinderivat L-7 überprüft. Dort konnte für diese zwei Mutationen (F339A, F340A) kein suffizienter, Wt-ähnlicher Block hergestellt werden, was mit einer vermutlich veränderten Bindungsstelle für L-7 erklärt wurde. Anhand der hier gezeigten Block-Experimente mit Clofilium-tosylat (Arena und Kass, 1988; Abb. III.9) konnte für F340A ein dem Wildtyp ähnlicher Block erreicht werden. Daher kann an dieser Stelle weder eine deutliche Konformationsänderung im Bereich des Gates noch eine gestörte Bindungsstelle für Clofilium-tosylat angenommen werden. Für S338W und I268W war eine Blockierung mittels Clofilium-tosylat nicht oder nur eingeschränkt möglich. Gründe dafür sind entweder in veränderten Eigenschaften des Gates zu suchen, so dass Clofilium-tosylat nicht in die innere Höhle eindringen kann, oder aber in einer veränderten Bindungsstelle für Clofilium-tosylat. Da die hier mutierten KCNQ1-Aminosäuren alle als die äußere Hülle bildend betrachtet und identifiziert wurden, erscheint erstere Erklärungsmöglichkeit näherliegend. Auch eine extrem langsame Deaktivierung kann dazu führen, dass die KCNQ1-Mutanten scheinbar nicht schließen. In den hier durchgeführten Experimenten waren die Interpulsabstände nie länger als 60 s. Es ist deshalb möglich, dass der Offset in der GV-Kurve die Erholung aus der Inaktivierung über den Offen-Zustand repräsentiert. Eine ebenfalls erst kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte, dass S338, F339 und F340 auch als Cystein-Mutanten starke, KCNQ1 untypische Inaktivierung zeigten. Außerdem sind

diese Aminosäuren funktionelle Interaktionspartner für KCNE1 und KCNE3 (Melman et al., 2004).

3 Mutanten mit gestörter, spannungsabhängiger Aktivierung

Es wurden neun KCNQ1-Aminosäurereste gefunden (R259W, Q260W, E261W, I263W, T264W, L271W, F275W, L282W und L347W), die nach Mutation zu Tryptophan ein deutlich verändertes, spannungsabhängiges Aktivierungsverhalten zeigten. In diesen Fällen wurde ein $|\Delta\Delta G_0^w| \geq 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ beobachtet (Tabelle II). Acht dieser Mutationen verschoben das Potential, bei dem ein absolutes Gleichgewicht zwischen Offen- und Geschlossen-Zustand des Kanals besteht, in Richtung positiverer Werte. Es musste daher mehr Spannung aufgewendet werden, stärker depolarisiert werden, um diese Kanäle zu öffnen (Abb. III.11). Nur eine KCNQ1-Mutation (I263W) führte zu einer auf der Spannungsachse nach links verschobenen GV-Kurve. Hier war also das Potential, bei dem ein absolutes Gleichgewicht zwischen Offen- und Geschlossen-Zustand des Kanals besteht, in Richtung des Offen-Zustandes verschoben (Abb. III.12).

Yifrach und Mitarbeiter veröffentlichten 2002 ein Diagramm, in dem sie $V_{1/2}$ und z -Werte von *Shaker*-Kanal-Alanin-Mutanten miteinander in Beziehung stellten, um Abhängigkeiten der beiden Werte für gleichsinnig, durch Mutation veränderte Kanäle, zu finden. Es zeigte sich für *Shaker*, dass $V_{1/2}$ und z -Werte generell korreliert waren. Eine nach links verschobene Aktivierungskurve (negativeres $V_{1/2}$) ging mit einer steileren Steigung (höherer z -Wert) einher. Eine nach rechts verschobene Aktivierungskurve (positiveres $V_{1/2}$) war eher flacher (kleinerer z -Wert). Dieses Verhältnis zwischen $V_{1/2}$ und z passte zu der Ansicht, dass die Mutanten hauptsächlich einen der letzten Schritte der vielen spannungsabhängigen Konformationsänderungen im *Shaker*-Kalium-Kanal vor dem Öffnungsschritt beeinflussten. Für KCNQ1 konnte eine solch detaillierte Analyse nicht durchgeführt werden, da hier die Werte nur in einem sehr geringen Bereich variierten und nur ein negativ verschobener Wert zu finden war. Nur wenige Mutanten (R259W, E261W, I263W, L271W) zeigten einen Zusammenhang zwischen $V_{1/2}$ und z -Wert, der auf eine Störung im letzten Schritt des

Gatings, kurz vor dem Öffnen des Kanals, hinweist. Für alle anderen Mutanten ist eine genauere Aussage für die zu Grunde liegende Störung vermutlich nur durch Mutantcycle-Analysen oder die Verwendung eines anderen Gating-Schemas möglich.

Homologie-Modellierung mit der KcsA-Kristall-Struktur zeigte, dass alle mutationssensitiven Aminosäurereste, ausgenommen L347W, auf der Außenhelix des Porenmoduls (S5) lagen (Abb. III.13). L271W, F275W und L282W zeigten sich entlang einer gedachten Linie, zentral auf der Oberfläche der Untereinheiten. Sie folgten dabei der aufwärts laufenden Spirale der äußeren Helix. An diesen Stellen scheint eine Protein-Protein-Interaktion so gestört worden zu sein, dass mehr Energie als beim Wildtyp benötigt wurde, um den Kanal zu öffnen. Es kann jedoch ohne genauere Analyse der Selektivität, der Aktivierung und vor allen Dingen der Inaktivierung nur spekuliert werden, welche funktionellen Strukturen des Kanals hier in ihrer Interaktion behindert wurden. Als möglicher Interaktionspartner im Spannungssensor-Modul scheint am ehesten das S2-Segment in Frage zu kommen. Wie im KvAP-Modell (Jiang et al., 2003b) gezeigt wurde, liegt das S2-Segment während des Öffnungsvorgangs zwischen dem Paddel und dem Porenmodul. Aber auch jede andere Struktur in der Porendomäne kommt als Interaktionspartner in Frage, gerade mit Blick auf die bereits erwähnten, mit der Pore interagierenden, KCNQ1-Aminosäurereste G272 und L273 (Seeböhm et al., 2003a).

Die größten Störungen der spannungsabhängigen Aktivierung wurden für R259W, Q260W, E261W, I263W und L347W beobachtet. Diese Mutanten lagen alle im Bereich des so genannten „Gates“ von KcsA und *Shaker* Kanälen, in der unteren Hälfte der transmembranären Hülle (Abb. 2.11). Gerade in dieser Region, wo die inneren Helices (S6) eine Art Bündel bilden (Doyle et al., 1998), finden während des Öffnungsvorganges von Kalium-Kanälen große Konformationsänderungen (Jiang et al., 2002b) statt, die im KvAP Kanal mechanisch an eine Positionsänderung des Spannungssensors gekoppelt zu sein scheinen (Jiang et al., 2003b).

4 Kanalkonstrukte ohne funktionelle Expression

Für zehn Kanalkonstrukte (A283W, Y299A, L303W, V307W, I328W, S330W, C331W, L342W, P343W und G350W) konnte mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in dem hier untersuchten Spannungsbereich kein Strom aufgezeichnet werden, der über den endogenen Strom von nicht oder mit sterilem Wasser injizierten *Xenopus laevis*-Oozyten hinausging (Tabelle II). Es bleiben dadurch aber verschiedene Fragen offen:

- Wurde die entsprechende Mutante überhaupt exprimiert?
- An welcher Stelle der Kanalexpression trat ein Fehler auf?
- Wurden eventuell nicht leitende Kanäle mit verschlossener Pore als Resultat der Expression gebildet?

Eine weitere Möglichkeit, dass keine Ströme gemessen werden konnten, könnte eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu Spannungen außerhalb des untersuchten Bereichs sein.

Das Verteilungsmuster in der KcsA-Kanalstruktur zeigte, dass das Segment S5 fast keine nicht funktionell exprimierende KCNQ1-Tryptophan-Mutationen besitzt (Abb. 2.1). Unter Einbeziehung von an anderer Stelle veröffentlichten Daten, bleibt nur A283W ohne funktionelle Expression in diesem Teil der Porendomäne. Die größte Ansammlung von Kanalmutationen aus dieser Gruppe fand sich im Bereich der Porenhelix (Y299A, L303W und V307W) und in der oberen Hälfte der inneren Helix (S6) (I328W, S330W und C331W). In genau dieser Region fanden sich aber auch die meisten, wildtyp-ähnlichen KCNQ1-Mutanten. Im Gegensatz zu den wildtyp-ähnlichen Mutanten könnte hier die dichte Packung des Kanals und die damit verbundenen Interaktionen zwischen den Aminosäuren (s. o.) durch große sterische Änderungen gestört werden. Cystein 331, das in die Gruppe der nicht funktionell exprimierenden KCNQ1 Tryptophan-Mutationen gehört, konnte mit einem künstlich in KCNE1 eingeführten Cystein verbunden werden, was eine Interaktion mit S6 ermöglichte (Tapper und George, 2001).

In S6 fanden sich zudem noch drei funktionell nicht exprimierende KCNQ1-Mutationen (L342W, P343W und G350W), die rund um das so genannte „Bundel crossing“ lagen.

5 Vergleich der *Shaker*- und KCNQ1-Scanning-Mutagenesen

Ein Vergleich der Tryptophan-Scanning-Mutagenese-Untersuchungen der transmembranären Hülle von KCNQ1 und dem *Shaker*-Kalium-Kanal (Li-Smerin et al. 2000), zeigte sowohl Regionen, in denen die Mutationen homologer Aminosäuren ähnliche Auswirkungen auf die beiden Kanal-Typen hatten als auch Regionen mit großen Unterschieden. Die Verteilung der Daten für KCNQ1-Kanalmutanten machte es notwendig, leicht veränderte Grenzen zwischen stark beeinträchtigten und wildtyp-ähnlichen Kanälen, die bei *Shaker* bei einem $|\Delta\Delta G_0^w| \geq 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ lag, zu wählen. Die KCNQ1-Mutanten zeigten $\Delta\Delta G_0^w$ -Werte im Bereich zwischen -1.8 und $6.1 \text{ kcal mol}^{-1}$. Die Grenze für Mutanten mit veränderter, spannungsabhängiger Aktivierung bei $|\Delta\Delta G_0^w| \geq 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ festzulegen ergab sich aus der Verteilung der Messwerte. Alle wildtyp-ähnlichen Mutanten waren deutlich davon abzugrenzen.

Im Fall von *Shaker* wurden einundzwanzig Aminosäurereste mit veränderter spannungsabhängiger Aktivierung identifiziert, denen neun in KCNQ1 gegenüber stehen. Die Unterschiede zwischen den beiden Mutagenese-Scan-Analysen zeigte sich am deutlichsten in der Region der transmembranären Hülle, die den Selektivitätsfilter umgibt. Dort lagen viele stark veränderte *Shaker*-Aminosäuren, aber nur wenige KCNQ1-Mutationen mit einem $|\Delta\Delta G_0^w| \geq 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$. Genau an dieser Stelle scheint die KCNQ1-Kanalfunktion durch den Aminosäureaustausch und die damit verbundenen sterischen Änderungen kaum beeinträchtigt zu werden (Abb. III.6). Oder aber, die Kanalstruktur wird so verändert, dass keine funktionelle Expression resultiert. Im oberen Drittel des KvAP-Porenmoduls scheinen während der Spannungssensorbewegung (Jiang et al., 2003a/b) kaum Konformationsänderungen statt zu finden. Dies könnte bedeuten, dass, im Gegensatz zu *Shaker*, KCNQ1 einige Gemeinsamkeiten mit dem KvAP-Modell besitzt.

Es zeigten sich nur sechs wildtyp-ähnliche *Shaker*-Aminosäurereste in der oberen Hälfte der Transmembranhülle des Porenmoduls (Li-Smerin et al., 2000), aber zehn in KCNQ1. Außerdem führten sieben Tryptophan-Mutationen, in der Transmembranhülle des *Shaker*-Kanals, zu einer zu negativeren Potentialen verschobenen G-V-Beziehung, denen nur eine KCNQ1-Mutante (I263W) entgegensteht (Tabelle II; Balkendiagramm in Abb.VI.1; Li-Smerin et al., 2000).

Eine Gruppierung von stark gating-sensitiven Mutationen rund um das „Gating-hinge“ von S6 (Doyle et al., 1998), findet sich in beiden Kanälen. Bei *Shaker*-Tryptophan-Mutanten zeigten sich jedoch viel ausgeprägtere Veränderungen der spannungsabhängigen Aktivierung als es für KCNQ1-Kanal-Mutanten der Fall war. Als mögliche Erklärung dafür könnte das unterschiedlich aufgebaute „Gating-hinge“ dienen. Die Kristallstruktur des Ca²⁺-aktivierten MthK-Kanals legt nahe, dass die Aktivierung von Kalium-Kanälen eine Biegung der inneren Helix, weg von der zentralen Achse beinhaltet, entsprechend eines Scharniers oder einer Türangel. Dies „Gating-hinge“ wird bei den meisten Kaliumkanälen durch einen hochkonservierten Glycinrest, der etwa in der Mitte der α -Helix liegt, gebildet (Jiang et al., 2002 a/b). Es wurde ebenfalls diskutiert, ob eine konservierte PVP-Sequenz in Kv-Kanälen für die Biegung des S6-Transmembransegments zuständig sein könnte (del Camino et al., 2000). KCNQ1 hat eine PAG- Sequenz an Stelle des PVP und im Alignment findet sich an der Stelle des „Glycin-hinge“-Rests ein Alanin. (Seebohm et al., 2003a).

Im Alignment ist zu erkennen, dass die Aminosäuresequenz von KCNQ1 in der Schleife zwischen dem S5-Transmembransegment und der Porenhelix um drei Aminosäuren länger ist als die korrespondierende *Shaker*-Sequenz. Daraus ergibt sich Spielraum für eine leicht veränderte Lage der Segmente zueinander (Abb. IV.1). Damit könnten die Unterschiede der Ergebnisse erklärt werden, da drei zusätzliche Aminosäuren die Lage der Helices zueinander stark variieren lässt. Da eine helicale Windung 3.6 Aminosäuren enthält, könnten die drei zusätzlichen Aminosäurereste einen Gangunterschied von bis zu 5,4 Å, also einer ganzen Windung ausmachen.

Für *Shaker*-Kalium-Kanäle zeigte Li-Smerin et al., 2000, dass es eine deutliche Akkumulation von Tryptophan-Mutationen entlang der Kontaktstellen der Monomere gab, die besonders mutationssensitiv waren. Dies konnte für KCNQ1 nicht gezeigt werden. Es zeigten sich vielmehr horizontal zur Membran gelegene Bereiche im Kanal, die gleichsinnigen, funktionellen Änderungen zugeordnet werden konnten.

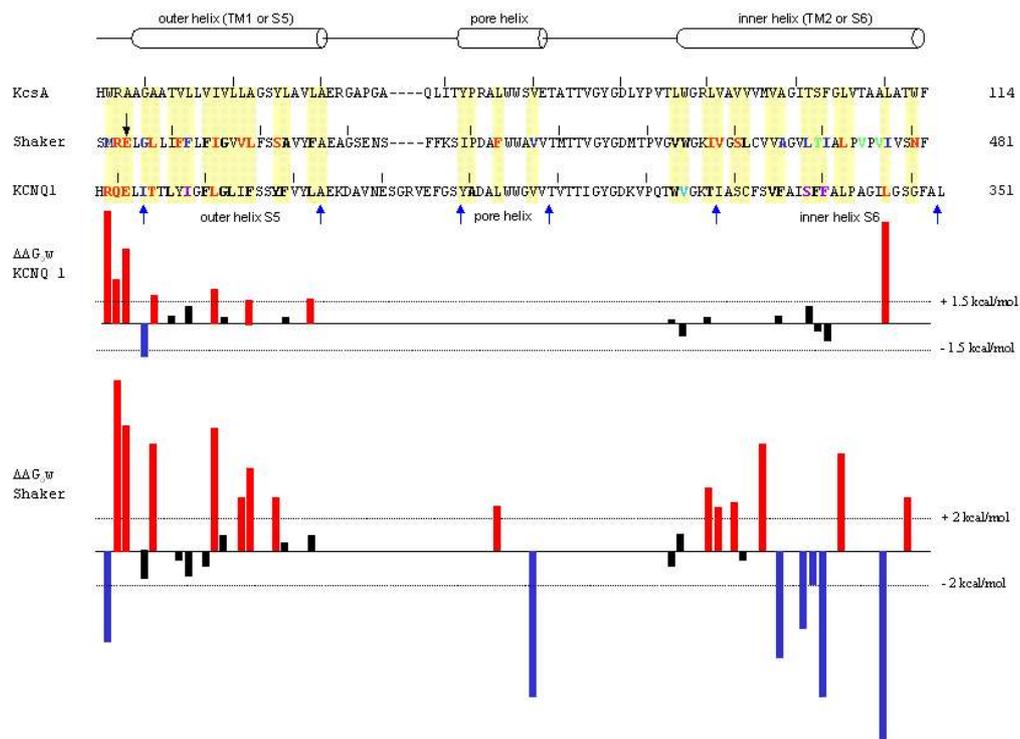


Abbildung IV.1: Vergleich der $\Delta\Delta G_0^w$ -Werte von *Shaker* und KCNQ1-Tryptophan-Scan

Oben: Sequenzalignment von *KcsA*, *Shaker* und KCNQ1-Kaliumkanälen. Gelb hinterlegt sind die 37, in der *KcsA*-Struktur identifizierte, die transmembranäre Hülle bildenden Aminosäurereste. Blaue Buchstaben entsprechen negativ, rote positiv verschobenen GV-Kurven. Grüne Buchstaben bezeichnen stark inaktivierende KCNQ1-Mutationen. Die blauen Pfeile geben die Bereiche der Helices an.

Unten: Balkendiagramm der $\Delta\Delta G_0^w$ -Werte von KCNQ1 und *Shaker*-Tryptophan-Scan (Li-Smerin et al., 2000). Gestrichelte Linie gibt die Grenze zwischen wildtyp-ähnlichen und stark veränderten Mutationen an. Für KCNQ1 $|\Delta\Delta G_0^w| \geq 1.5$ kcal mol⁻¹, für *Shaker* $|\Delta\Delta G_0^w| \geq 2$ kcal mol⁻¹. Absolute Werte siehe Tabelle II.

6 Möglichkeiten und Grenzen des Tryptophan-Mutanten-Scan

Die genauen physikalischen und strukturellen Änderungen, die Tryptophan-Mutationen hervorrufen, sind bisher nicht bis ins Detail bekannt und verstanden. Des Weiteren existieren für die Schritte, die ein Kanal bis zum Öffnen oder Schließen benötigt, nur Modelle. Daher lassen sich Schlüsse über die Effekte auf die relative Stabilität des Offen- und Geschlossen-Zustands im Kaliumkanal nur unter bestimmten Prämissen ziehen.

Die hier angewendete Betrachtung anhand der Gating-Parameter $V_{1/2}$ und z erlaubt es energetische Störungen der spannungsabhängigen Aktivierung festzustellen. Yifrach und MacKinnon (2002) haben jedoch gezeigt, dass man nur von einer Störung des Gatings kurz vor dem Öffnungsschritt ausgehen kann, wenn ein gegenüber dem Wildtyp positiverer $V_{1/2}$ -Wert gleichzeitig mit einer kleineren Steigung in diesem Punkt einhergeht. Dies spricht dann für eine lokale Störung. Für alle anderen Mutationen sind eventuell gestörte Interaktionen zwischen Aminosäuren verantwortlich, die sich eventuell mit Mutantcycle-Analysen genauer untersuchen lassen.

Wie bei KCNQ1 hatte nur ein geringer Anteil von Mutationen in *Shaker* eine rein lokale Änderung im Kanal zur Folge. Es konnte bei *Shaker* mittels Kopplungsanalysen gezeigt werden, dass einzelne Mutationen auch an sehr weit entfernten Regionen des Kanals nur selten unabhängig von einander waren. Auch die Arbeit von Seebohm et al. (2003b) zeigte, dass Interaktionen zwischen den einzelnen Aminosäureresten über den lokalen Einfluss hinaus den gesamten Kanal beeinflussen. So verändern lokale Aminosäureaustausche nicht nur Interaktionen in ihrer direkten Umgebung. Es bestehen auch Kontakte zu anderen weit entfernten Regionen des Kanals, die durch Punktmutationen empfindlich gestört werden und dann, neben einem veränderten Gating, auch Einfluss auf die Selektivität für Kalium-Ionen und/oder das „Inaktivierungsgating“ haben können. Daher reicht es nicht aus, nur die Gatingparameter zu untersuchen, sondern in einem zweiten Schritt sollten Untersuchungen der Selektivität folgen.

Homomere KCNQ1-Kanäle besitzen eine verzögerte, inkomplette und intrinsisch spannungsunabhängige Inaktivierung (Pusch et al., 1998; Tristani-Firouzi et al., 1998;

Pusch et al., 2000), die sich hauptsächlich im biphasischen Tail-Strom nach einem aktivierenden Vorpuls zeigt. Um Veränderungen der Inaktivierung genauer zu untersuchen, müssten die Tailströme mittels biexponentieller Funktion „gefittet“ und dann das Verhältnis aus der schnellen initialen und der langsameren späteren Deaktivierung berechnet werden (Pusch et al., 1998). Die KCNQ1-untypische, spannungsabhängige Inaktivierung sollte deshalb in einem zweiten Schritt genauer analysiert werden. Als mögliche Gründe für den beobachteten Stromabfall kommt ein Porenblock mit z. B. makromolekularen Zellbestandteilen wie z.B. Spermidin bei Kir-Kanälen in Frage (Ficker et al., 1994; Lopatin et al., 1994). Aber auch ein spannungsabhängiger Block durch andere Ionen ist vorstellbar (Pusch et al., 2001; Orikabe et al., 2003).

Auf der anderen Seite könnte dieser Block Ausdruck der Instabilität der Pore sein, über die, die für die Deaktivierung aus der Inaktivierung bei KCNQ1 typischen „Hooks“ (Pusch et al., 1998), Aufschluss geben könnten. Zu diesem Zweck sind allerdings andere Pulsprotokolle als die hier verwendeten nötig, da bei einem Tailpotential von -30 mV der „Hook“ nicht korrekt analysiert werden kann. Der Grund dafür liegt darin, dass die meisten Mutanten bei -30 mV bereits wieder aktiviert werden und somit der Schritt vom inaktivierten Zustand über den Offen-Zustand hin zum Geschlossen-Zustand nicht klar unterschieden werden kann. Die hier gezeigten Deaktivierungskinetiken wurden alle nach einem Einzeltestpuls nach +60 mV und bei -100 mV Tailpotential ausgewertet. Allerdings wurde auf eine ausführliche Analyse des „Hooks“, der sich in einer stärker kaliumhaltigen Messlösung (z. B. 100 mM) besser analysieren ließe, verzichtet (Pusch et al., 1998). Mit dieser Methode werden die gemessenen Ströme deutlich größer und lassen sich daher einfacher und genauer analysieren.

Ob und wie eventuell im C-Terminus des Kanals gelegene Domänen, wie sie z. B. als RCK-Domäne (regulating the conductance of K^+ -channels) bei BK-Kanälen bekannt ist (Jiang et al., 2001), auch das Gating von KCNQ1 beeinflussen ist bisher unklar. Es wurde jedoch für KCNQ1, bereits eine C-terminale Interaktionsstelle mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) diskutiert (Loussouram et al., 2003).

Abschließend ist zu sagen, dass der hier verwendete Tryptophan-Scan eine gute Methode darstellt, um funktionelle Regionen im Kanal auszumachen, die das Gating beeinflussen. In einem zweiten Schritt sollten nun mutanten-spezifische Untersuchungen folgen, um die oben erwähnten, noch offenen Fragen genauer zu analysieren. Die hier gefundenen muta-

tionssensiblen Regionen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Funktion des Kanals entscheidend. Die Bewertung der gemessenen Ströme ist jedoch nur eingeschränkt möglich. Um genauere Aussagen treffen zu können, sollten für einige Mutationen weitere Untersuchungen bezüglich Selektivität, Einfluss auf die Deaktivierung sowie die spannungsabhängige Inaktivierung folgen.

Einzig für solche Mutationen die sowohl makroskopisch als auch nach den Gating-Parametern keine Änderungen gegenüber dem Wildtyp-Kanal zeigten, lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, dass Lipid-Interaktion möglich ist.

7 Ausblick

Eine genauere Charakterisierung der einzelnen KCNQ1-Kanal-Mutanten bezüglich Selektivität, spannungsunabhängiger oder spannungsabhängiger Inaktivierung, sowie der Deaktivierung sollte zukünftig durchgeführt werden.

Es sollte die mögliche gegenseitige Beeinflussung zweier, unterschiedlicher Mutanten mittels Kopplungsanalyse untersucht werden. Dabei sind die Mutanten zu wählen, die als Einzelmutation das Gating beeinträchtigen. Dies würde alle diejenigen Aminosäuren identifizieren, die unabhängig von anderen Aminosäuren Bewegungen im Kanal ausführen, also nur lokale Änderungen hervorrufen. Für solche Aminosäuren könnte dann eine nach außen gerichtete Interaktion mit dem Spannungssensor oder dem gegenüberliegenden Monomer postuliert werden könnte.

Die Proteinexpression für solche Kanäle, die nicht funktionell exprimiert werden konnten, sollten überprüft werden, um genauere Aussagen zum Verbleib dieser Kanalproteine zu erhalten.

Es bleibt für KCNQ1 die Frage offen, ob und in welcher Weise sich die durch Punktmutationen erzielten Effekte auf die Interaktion mit den physiologischen Interaktionspartnern, den KCNE- β -Untereinheiten, auswirken. Insbesondere für die Mutationen in den Positionen S338-F340, für die eine direkte Interaktion zwischen KCNQ1 und den β -Untereinheiten KCNE1 und KCNE3 gezeigt werden konnte (Melman et al., 2004).

V Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Tryptophan-Mutanten-Scanning-Analyse als Werkzeug benutzt, um Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktion für die Aminosäuren der äußeren Hülle des KCNQ1-Porenmoduls zu untersuchen. Im Sequenzvergleich mit den Sequenzen von *Shaker*- und KcsA-Kalium-Kanälen wurden 37 Aminosäuren identifiziert, die die Hülle des Porenmoduls von KCNQ1 bilden. Diese Aminosäuren wurden dann zu Tryptophan mutiert und die Mutanten in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert. Ströme wurden mittels der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemm-Technik gemessen. Für die Auswertung der Daten wurde das Öffnen des Kanals vereinfacht als ein einziger Schritt zwischen Offen- und Geschlossen-Zustand betrachtet. Die GV-Analyse der funktionell exprimierenden Kanäle zeigten alle einen s-förmigen Verlauf, der sich mit einer Boltzmann-Funktion mit zwei Stadien in guter Annäherung beschreiben lässt. Als Parameter der spannungsabhängigen Aktivierung wurden $V_{1/2}$ - und z -Wert bestimmt und damit energetische Störungen der Aktivierung gegenüber dem KCNQ1-Wildtyp-Kanal berechnet ($\Delta\Delta G_0$).

Es zeigte sich, dass der verwendete Tryptophan-Scan eine gute Methode darstellt, um funktionelle Regionen im KCNQ1-Kalium-Kanal auszumachen, die das Gating auf verschiedene Weise beeinflussen. Die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals wurde besonders ausgeprägt im Bereich des „Bundel crossing“ im unteren Drittel der S6-Transmembranhelix gestört, was in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen mit dem *Shaker*-Kalium-Kanal ist (Li-Smerin et al., 2000; Yifrach et al., 2002).

Dicht unterhalb der Pore zeigte sich eine zweite funktionell wichtige Region in der vier Mutanten KCNQ1-untypische, spannungsabhängige Inaktivierung zeigten. Das obere Drittel des Kanals zeichnete sich vor allem durch eine Vielzahl von Kanalmutanten aus, deren spannungsabhängige Aktivierung wildtyp-ähnlich war. Zehn Mutationen führten zu keiner funktionellen Expression.

VI Literaturverzeichnis

- Arena, J.P. und Kass, R.S. (1988) Block of heart potassium channels by clofilium and its tertiary analogs: relationship between drug structure and type of channel blocked. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 60-66.
- Attali, B.(1996) A new wave for heart rythm. *Nature*, **384**, 24-25.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. and Romey, G. (1996) KVLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*, **384**, 78-80.
- Barry, D.M. und Nerbonne, J.M. (1996) Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Ann. Rev. Physiol.*, **58**, 363-394
- Bennet, P.B., Yazawa, K., Makita, N. und Georg, A.L.J. (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*, **376**, 683-685
- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J. und Steinlein, O.K. (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, **279**, 403–406.
- Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J. und Leppert, M. (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat. Genet.*, **18**, 53–55.
- Choe, S., Stevens, C.F. und Sullivan, J.M. (1995) Three distinct structural environments of a transmembrane domain in the inwardly rectifying potassium channel ROMK1 defined by perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 12046-12049.

- Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., und Barhanin, J. (1997) Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.*, **16**, 5472-5479.
- Creighton, T. E., (1993) Proteins-second edition: structures and molecular properties, Freeman and Company, USA
- Choe, S., Stevens, C.F. und Sullivan, J.M. (1995) Three distinct structural environments of a transmembrane domain in the inwardly rectifying potassium channel ROMK1 defined by perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12046-12049.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G. und Barhanin, J. (1997) Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.*, **16**, 5472-5479.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Richard, P., Denjoy, I., Hainque, B., Romey, G., Drici, M.D., Guicheney, P. und Barhanin, J. (2000) Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{ks} activation through interactions with I_{ks}. *Cardiovasc. Res.*, **45**, 971-980
- Cohen, B.E., Grabe, M. und Jan, L.Y. (2003) Answers and questions from the KvAP structures. *Neuron*, **39**, 395-400.
- Collins, A., Chuang, H., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1997) Scanning mutagenesis of the putative transmembrane segments of Kir2.1, an inward rectifier potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 5456-5460.
- Dedek, K., Kunath, B., Kananura, C., Reuner, U., Jentsch, T.J. und Steinlein, O.K. (2001) 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**, 12272-12277.
- del Camino, D. und Yellen, G. (2001) Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K⁽⁺⁾ channel. *Neuron*, **32**, 649-656.
- del Camino, D., Holmgren, M., Liu, Y. und Yellen, G. (2000) Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature*, **403**, 321-325.
- Demolombe, S., Baro, I., Pereon, Y., Bliet, J., Mohammad-Panah, R., Pollard, H., Morid, S., Mannens, M., Wilde, A., Barhanin, J., Charpentier, F. und Escade, D. (1998) A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6837-6843
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77.

- Feng, J., Wible, B., Li, G.R., Wang, Z. und Nattel, Z. (1997) Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv 1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ. Res.*, **80**, 572-579.
- Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B.A., Henley, C.M. und Brown, A.M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science*, **266**, 1068-1072
- Gandhi, C.S., Clark, E., Loots, E., Pralle, A. und Isacoff, E.Y. (2003) The orientation and molecular movement of a K⁺ channel voltage-sensing domain. *Neuron*, **40**, 515-525.
- Goldin, A.L. (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol.*, **207**, 266-279.
- Grahammer, F., Herling, A.W., Lang, H.J., Schmitt-Graff, A., Wittekindt, O.H., Nitschke, R., Bleich, M., Barhanin, J. und Warth, R. (2001) The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology*, **120**, 1363-1371.
- Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Hördt, M., Wedekind, H., Funke, H., Borggrefe, M., Assmann, G. und Breithardt, G. (1997) QT-Syndrome: Aspekte zur Pathogenese, molekularen Genetik, Diagnostik und Therapie. *Dt. Ärztebl.*, **94**, A-667-672.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. und MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.*, **66**, 1061-1067.
- Hille, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Hong, K.H. und Miller, C. (2000) The lipid-protein interface of a Shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.*, **115**, 51-58.
- Jackman, W.M., Friday, K.J., Anderson, J.L., Aliot, E.M., Clark, M. und Lazzara, R. (1988) The long QT syndromes: acritical review, new clinical observations and a unifying hypothesis. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **31**, 115-172.
- Jan, L.Y. und Jan, Y.N. (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.*, **20**, 91-123.
- Jentsch, T.J. (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **1**, 21-30.
- Jervell, A. und Lange-Nielsen, F. (1957) Congenital deaf mutism, functional heart disease with prolongation of the QT intervall, and sudden death. *Am. Heart J.*, **54**, 59-78.
- Jiang, M., Tseng-Crank, J. und Tseng, G.N. (1997) Suppression of slow delayed rectifier current by a truncated isoform of KvLQT1 cloned from human heart. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24109-24112.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (2002a) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, **417**, 515-522.

- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (2002b) The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, **417**, 523-526.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 33-41.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (2001) Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron*, **29**, 593-601.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. und MacKinnon, R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 42-48.
- Katz, A.M. (1992) Physiology of the heart. Second Edition, Raven Press, New York.
- Keating, M., Atkinson, D., Dunn, C., Timothy, K., Vincent, G.M. und Leppert, M. (1991) Linkage of cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science*, **252**, 704-706.
- Kubisch, C., Schroeder, B.C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C. und Jentsch, T.J. (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, **96**, 437-446.
- Lainé, M., Lin, M.C., Bannister, J.P., Silverman, W.R., Mock, A.F., Roux, B. und Papazian, D.M. (2003) Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron*, **39**, 467-481.
- Ledwell, J.L., and Aldrich, R.W. (1999). Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.*, **113**, 389-414.
- Lee, H.C., Wang, J.M. und Swartz, K.J. (2003) Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels. *Neuron*, **40**, 527-536.
- Lee, M.P., Hu, R.J., Johnson, L.A. und Feinberg, A.P. (1997) Human KvLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.*, **15**, 181-185.
- Legros, C., Pollmann, V., Knaus, H.G., Farrell, A.M., Darbon, H., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F. und Pongs, O. (2000) Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16918-16924.
- Lehmann-Horn, F. und Jurkat-Rott, K. (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev.*, **79**, 1317-1372
- LeMasurier, M., Heginbotham, L. und Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.*, **118**, 303-314.

- Li-Smerin, Y., Hackos, D.H. und Swartz, K.J. (2000) A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron*, **25**, 411-423.
- Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M.E. und Jellen, G. (1997) Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron*, **19**, 175-184.
- Liu, Y. und Joho, R.H. (1998) A side chain in S6 influences both openstate stability and ion permeation in a voltage-gated K⁺ channel. *Pflugers. Arch.*, **435**, 654-661
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N. und Nichols, C.G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, **372**, 366-369
- Loussouarn, G., Park, K.H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F. und Escande, D.(2003) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.*, **22**, 5412-21.
- Lu, Z., Klem, A.M. und Ramu, Y. (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*, **413**, 809-813.
- MacKinnon, R., Cohen, S.L., Kuo, A., Lee, A. und Chait, B.T. (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, **280**, 106-109.
- Mall, M., Bleich, M., Schurlein, M., Kuhr, J., Seydewitz, H.H., Brandis, M., Greger, R. und Kunzelmann, K. (1998) Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am. J. Physiol.*, **275**, G1274-1281.
- Melman, Y.F., Um, Y.O., Krumerman, A., Kagan, A. und McDonald, T.V. (2004) KCNE1 binds to the KCNQ1 pore to regulate potassium channel activity. *Neuron*, **42**, 927-937.
- Michetson, J.S. Und Sanguinetti, M.C. (1999) Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell. Physiol. Biochem.*, **9**, 201-216
- Monks, S.A., Needleman, D.J. und Miller, C. (1999) Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the Shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.*, **113**, 415-423.
- Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y. und MacKinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*, **414**, 37-42.
- Murai, T., Kakizuka, A., Takumi, T., Ohkubo, H. und Nakanishi, S. (1989) Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 176-181.

- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K. und Guicheney, P. (1997) A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat. Genet.*, **15**, 186-189.
- Noble, D. und Tsien, R. W. (1969) Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.*, **200**, 205-231
- Orikabe, M., Hirano, Y., Isobe, M. und Hiraoka, M. (2003) Block of recombinant KCNQ1/KCNE1 K⁺ channels (IKs) by intracellular Na⁺ and its implications on action potential repolarization. *Jpn J Physiol.*, **53**, 417-425.
- Pongs, O. (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett.*, **452**, 31-35.
- Pusch, M., Bertorello, L. und Conti, F. (2000) Gating and flickery block differentially affected by rubidium in homomeric KCNQ1 and heteromeric KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Biophys. J.*, **78**, 211-226.
- Pusch, M., Ferrera, L. und Friedrich, T. (2001) Two openstates and rate-limiting gating steps revealed by intracellular Na⁺ block of human KCNQ1 and KCNQ1/KCNE1 K⁺ channels. *J. Physiol.*, **533**, 135-144.
- Pusch, M., Magrassi, R., Wollnik, B. und Conti, F. (1998) Activation and inactivation of homomeric KvLQT1 potassium channels. *Biophys. J.*, **75**, 785-792.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N. Dolly, J.O. und Pongs, O. (1994) Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*, **369**, 289-294.
- Robbins, J. (2001) KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Ther.*, **90**, 1-19.
- Roden, D.M. Lazzara, R., Rosen, M., Schwartz, P.J., Towbin, J. und Vincent, G.M. (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation*, **94**, 1996-2012
- Romano, C. (1967) Congenital cardiac arrhythmias. *Lancet*, **1**, 658.
- Roux, B. und MacKinnon, R. (1999) The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*, **285**, 100-102.
- Ruta, V., Jiang, Y., Lee, A., Chen, J. und MacKinnon, R. (2003) Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **422**, 180-185.
- Saarinen, K., Swan, H., Kainulainen, K., Toivonen, L., Viitasalo, M. und Kontula, K. (1998) Molecular genetics of the long QT syndrome: two novel mutations of the KVLQT1 gene and phenotypic expression of the mutant gene in a large kindred. *Hum Mutat* **11**, 158-165

- Salen, P. und Nadkarni, V. (1999) Congenital long-QT syndrome: a case report illustrating diagnostic pitfalls. *J. Emerg. Med.*, **17**, 859-864
- Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L. und Keating, M.T. (1996) Coassembly of KVLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I (Ks) potassium channel. *Nature*, **384**, 80-83.
- Schmitt, N. (1996) Charakterisierung eines kardialen Kaliumkanals. Diplomarbeit am Fachbereich Chemie/Biochemie, Universität Hannover.
- Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B. und Pongs, O. (2000) A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J.*, **19**, 332-340.
- Schoppa, N.E., and Sigworth, F.J. (1998a). Activation of shaker potassium channels. I. Characterization of voltage-dependent transitions. *J. Gen. Physiol.*, **111**, 271–294.
- Schoppa, N.E., and Sigworth, F.J. (1998b). Activation of shaker potassium channels. II. Kinetics of the V2 mutant channel. *J. Gen. Physiol.*, **111**, 295–311.
- Schroeder, B.C., Kubisch, C., Stein, V. und Jentsch, T.J. (1998) Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* **396**, 687–690.
- Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R. und Jentsch, T.J.(2000) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196–199.
- Schwartz, P.J., Moss, A.J., Vincent, M. und Crampton, R.S. (1993) Diagnostic criteria for the long QT syndrome: an update. *Circulation*, **88**, 782-784.
- Schulze-Bahr, E., Haverkamp, W., Borggrefe, M., Wedekind, H., Monnig, G., Mergenthaler, J., Assman, G., Funke, H. und Breithardt, G. (2000) Molecular genetics of arrhythmias – a new paradigm. *Z. Kardiol.*, **89**, Suppl. 4:IV 12-22
- Seeböhm, G., Scherer, C.R., Busch, A.E. und Lerche, C. (2001) Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome. *J. Biol. Chem.*, **276**, 13600–13605.
- Seeböhm, G., Chen, J., Strutz, N., Culbertson, C., Lerche, C. Und Sanguinetti, M.C. (2003a) Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine. *Mol. Pharmacol.*, **64**, 70-77
- Seeböhm, G., Sanguinetti, M.C. und Pusch, M. (2003b) Tight coupling of rubidium conductance and inactivation in human KCNQ1 potassium channels. *J. Physiol.*, **552**, 369-378

- Selyanko, A.A., Hadley, J.K., Wood, I.C., Abogadie, F.C., Delmas, P., Buckley, N.J., London, B. und Brown, D.A. (1999) Two types of K⁺ channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell. *J. Neurosci.*, **19**, 7742-7756.
- Sewig, S., Röper, J. und Pongs, O. (1996) Kv β 1 subunit binding specific for *Shaker*-related potassium channel α -subunits. *Neuron*, **16**, 455-463.
- Shalaby, F.Y., Levesque, P.C., Yang, W.P., Little, W.A., Conder, M.L., Jenkins-West, T. und Blanaar, M.A. (1997) Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. *Circulation* **96**, 1733-1736.
- Sharp, L.L., Zhou, J. und Blair, D.F. (1995) Tryptophan-scanning mutagenesis of MotB, an integral membrane protein essential for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **34**, 9166-9171.
- Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M.H., Sanguinetti, M.C. und Keating, M.T. (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suess I(Ks) function. *Nat. Genet.*, **17**, 338-340.
- Splawski, I., Shen, J., Timothy, K.W., Lehmann, M.H., Priori, S., Robinson, J.L., Moss, A.J., Schwartz, P.J., Towbin, J.A., Vincent, G.M. und Keating, M.T. (2000) Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* **102**, 1178-1185.
- Stühmer, W. (1992) Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.*, **207**, 319-339.
- Takumi, T., Ohkuubo, H. und Nakanishi, S. (1998) Cloning a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*, **242**, 1042-1045
- Tapper, A.R. und George, A.L., Jr. (2000) MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J. Gen. Physiol.*, **116**, 379-390.
- Tristani-Firouzi, M. und Sanguinetti, M.C. (1998) Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J. Physiol.*, **510**, 37-45.
- Tyson, J., Tranebjaerg, L., Bellmann, S., Wren, C., Taylor, J.F.N., Bathen, J., Aslksen, B., Sorland, S.J., Lund, O., Malcolm, S., Pembrey, M., Bhattacharya, S. und Bitner-Glindzic, M. (1997) IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **61**, 2179-2185.
- Viskin, S. (1999) Long QT syndromes and torsade de pointes. *Lancet*, **354**, 1625-1633.
- Wang, D.W., Yazawa, K., George, A.L.J. und Bennett, P.B. (1996b) Characterization of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13200-13205.

- Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E. und McKinnon, D. (1998b) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science*, **282**, 1890-1893.
- Wang, Q., Chen, Q., und Tobwin, J. A. (1998a) Genetics, molecular mechanism and management of long QT syndrome. *Ann. Med.*, **30**, 58-65
- Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T.C., Millholland, J.M., Vanraay, T.J., Shen, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., De Jager, T., Schwartz, P.J., Toubin, J.A., Moss, A.J., Atkinson, D.L., Landes, G.M., Connors, T.D. und Keating, M.T. (1996a) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.*, **12**, 17-23.
- Wang, Q., Shen, J., Li, Z., Timothy, K., Vincent, G.M., Priori, S.G., Schwartz, P.J. und Keating, M.T. (1995a) Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1603-1607.
- Ward, O.C. (1964) A new familial cardiac syndrome in child. *J. Med. Assoc.*, **54**, 103-106.
- Warth, R., Garcia Alzamora, M., Kim, J.K., Zdebik, A., Nitschke, R., Bleich, M., Gerlach, U., Barhanin, J. und Kim, S.J. (2002) The role of KCNQ1/KCNE1 K⁺ channels in intestine and pancreas: lessons from the KCNE1 knockout mouse. *Pflügers Arch.*, **443**, 822-828.
- Wei, A., Jegla, T. und Salkoff, L. (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. Elegans* genome project. *Neuropharmacology*, **35**, 805-829.
- Yang, W.P., Levesque, P.C., Little, W.A., Conder, M.L., Shalaby, F.Y. und Blannar, M.A. (1997) KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4017-4021
- Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, **419**, 35-42.
- Yifrach, O. und MacKinnon, R. (2002) Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel. *Cell*, **111**, 231-239.
- Yu, W., Xu, J. und Li, M. (1996) NAB domain is essential for the subunit assembly of both α - α and α - β complexes of Shaker-like potassium channels. *Neuron*, **16**, 441-453.
- Yue, L., Feng, J., Li, G.R., und Nattel, S. (1996) Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J. Physiol.*, **496**, 467-490.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. und MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, **414**, 43-48.

VII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Ω	Ohm
\emptyset	Durchmesser
μ	micro (10^{-6})
$\times g$	relative Erdbeschleunigung
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
\AA	Angström (10^{-13})
A	Adenin, Ampere, Alanin
Abb.	Abbildung
Acc.	<i>accession number</i>
Ach	Acetylcholin
AP	Aktionspotential, Alkalische Phosphatase
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-tri-phosphat
C	Cytosin, Cystein
Ca	Kalzium
Cl	Chlor
C-Terminus	Carboxyterminus einer Proteinkette
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese Hamster Ovary
C. histolytikum	Clostridium histolytikum
COS-7	CVI Origin SV40
crNA	<i>copy</i> Ribonukleinsäure

D	Aspartat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutamat
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	und Mitarbeiter
F	Farad, Phenylalanin
<i>f.c.</i>	<i>final concentration</i> , Endkonzentration
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
fl.	flüssig
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanosin, Leitfähigkeit, Glycin
Gl.	Gleichung
G_{norm}	Normalisierte Leitfähigkeit
ΔG_0	Gibb's freie Energie bei 0 mV
Gentamycin	Antibiotikum
h	human, Stunde
H	Histidin
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperzino)-ethansulfonsäure
HEK	Human embryonal Kidney Cells
I	Strom, Leitfähigkeit, Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
JLN(S)	Jervell und Lange-Nielsen (Syndrom)
K	Kalium, Lysin
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
KvAP	Spannungsabhängiger Kaliumkanal aus <i>Aeropyrum pernix</i>
KvLQT1	Entspricht KCNQ1
l	Liter
L	Leucin
locus	Ort
LQTS	Langes QT Syndrom
m	milli (10^{-3})
M	Mega (10^6), molar, Methionin
Mg	Magnesium
min	Minute
n	nano (10^{-9}), Nematode, Anzahl
N	Asparagin
Na	Natrium
ND96	Messlösung
N-Terminus	Aminoterminus einer Proteinkette
OR ₂	Oozyten-Ringer
p	pico (10^{-12})
P	Porenregion, Prolin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pGEM	Klonierungsvektor
PVC	Polyvenylchlorid
Q	Guanosin, Glutamin
R	Arginin
RCK	regulating the conductance of \mathbf{K}^+ -channels

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RW(S)	Romano-Ward (Syndrom)
s	Sekunde
S	Serin, Threonin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TM	Transmembransegment
Tricain	3-Aminobenzoic acid ethyl ester
V	Volt, Valin
V _H	Haltepotential
V _T	Tailpotential
Vol	Volumen
W	Tryptophan
Wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
z	Steigung in V _{1/2}
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Für die Aminosäuren wurden die Ein-Buchstaben-Symbole verwendet.

2 Veröffentlichung

Born, R., Bähring, R. und Pongs, O. (2004) Tryptophan-Scanning mutagenesis of the transmembrane shell of KCNQ1 pore domain; Posterpräsentation Biophysical Meeting in Baltimore /USA

3 Curriculum vitae

Roman Born geboren am 06. Dezember 1977 in Mainz

Hochschulstudium:

06/2005	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt
03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2000	Ärztliche Vorprüfung Physikum
10/1998	Immatrikulation für Staatsexamen Medizin an der Universität Hamburg

Zivildienst:

Okt.1997 bis Nov 1998	Dienst als Rettungssanitäter für das DRK KV Rhein- Hunsrück Rettungswache Boppard / Rhein
-----------------------	--

Schulische Laufbahn:

1987-1997	Allgemeine Hochschulreife am Herzog-Johann Gymnasium Simmern / Hunsrück
1983-1987	Grundschule Kastellaun

4 Danksagungen

Prof. Dr. Olaf Pongs danke ich für die Gelegenheit, in einem technisch optimal ausgestatteten Labor arbeiten zu dürfen. Die Betreuung meiner Doktorarbeit durch Prof. Pongs und seine Mitarbeiter empfand ich als vorbildlich.

PD Dr. Robert Bähring danke ich für die engagierte Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit. Seine Geduld, ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Hilfen haben entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Nicole Schmitt danke ich für die Bereitstellung der KCNQ1-Tryptophan-Mutanten, den molekularbiologischen Hintergrund.

Silke Jacob, Söhnke Hornig, Lars Schlichting und insbesondere Dr. Vitja Vardanjan danke ich für die geduldige Einführung in die verschiedenen Arbeitstechniken und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Renana Krause und Anne-Christin Turnbull danke ich für die Korrektur der Rechtschreibung.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Neurale Signalverarbeitung, die mit großer Hilfsbereitschaft und einem hervorragenden Arbeitsklima dafür gesorgt haben, dass mir die Arbeit viel Freude bereitet hat.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und mir von großer Bedeutung sind.

5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Roman Born