

Charakterisierung von KCNQ-Kaliumkanälen und ihren β -Untereinheiten

Vom Fachbereich Biologie der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
angenommene Dissertation

vorgelegt von

Karin Dedek
geboren am 18.08.1972
in Hemer

Referent: apl. Prof. Dr. Josef Ammermüller
Koreferent: Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch
Tag der Disputation: 25. März 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zelluläre Membranen	1
1.2	Ionentransport und Membranpotential	1
1.3	Ionenkanäle	3
1.4	Spannungsabhängige Ionenkanäle	3
1.5	Spannungsabhängige Kationenkanäle	4
1.6	Die Familie der K_v -Kanäle	5
1.6.1	Diversität	5
1.6.2	Struktur und Funktion	6
1.7	EAG-ähnliche Kanäle	8
1.8	KCNQ-Kanäle	9
1.8.1	Struktur	9
1.8.2	Diversität	10
1.8.3	KCNQ1 und seine β -Untereinheiten	11
1.8.4	KCNQ2 und KCNQ3	13
1.8.5	KCNQ4	15
1.8.6	KCNQ5	18
1.9	Fragestellungen	18
2	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien und Enzyme	21
2.2	Filme und bildgebende Verfahren	21
2.3	Puffer, Lösungen und Medien	21
2.4	Bakterienstämme	24
2.5	Vektoren	24
2.6	Eukaryontische Kulturzellen	24
2.7	DNA- und RNA-Techniken	25
2.7.1	Restriktion von DNA	25
2.7.2	Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	25
2.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten	25
2.7.4	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	25
2.7.5	Isolation von DNA aus Bakterien	26

2.7.6	Sequenzierung von DNA	26
2.7.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.7.8	Einführung von Punktmutationen in cDNA durch rekombinante PCR	27
2.7.9	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	28
2.7.10	Isolierung von Total-RNA aus Gewebe	29
2.7.11	Northern Blot	29
2.7.12	Herstellung von cRNA	29
2.7.13	Herstellung radioaktiv-markierter RNA-Sonden	30
2.7.14	Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	30
2.7.15	<i>In situ</i> Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	30
2.8	Zellbiologische Methoden	31
2.8.1	Transiente Transfektion von Zellkulturen	31
2.8.2	Herstellung eines Zelllysats aus HEK293-Zellen	31
2.9	Biochemische Methoden	31
2.9.1	Oberflächenbiotinylierung von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	31
2.9.2	Affinitätsreinigung von Antikörpern	32
2.9.3	Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	32
2.9.4	Immunfluoreszenz an Zellkulturen	33
2.9.5	Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten	33
2.10	Elektrophysiologische Methoden	33
2.10.1	Präparation und cRNA-Injektion von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	33
2.10.2	Zwei-Elektroden <i>Voltage clamp</i> von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	34
2.10.3	<i>Patch clamp</i> Messungen an transfizierten HEK293-Zellen	34
2.10.4	Präparation der Maus-Cochlea	34
2.10.5	<i>Patch clamp</i> Messungen an äußeren und inneren Haarzellen in der Maus-Cochlea	35
3	Ergebnisse	37
3.1	KCNQ1 und seine β -Untereinheiten im Gastrointestinaltrakt	37
3.1.1	Expression von KCNQ1, KCNE2 und KCNE3	37
3.1.2	Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von KCNQ1 und KCNE3 im Darm	39
3.1.3	Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von KCNQ1 und KCNE2 im Magen	41
3.1.4	Elektrophysiologische Eigenschaften von heteromeren Kaliumkanälen aus KCNQ1 und KCNE2	42
3.2	Untersuchung einer Mutation im Spannungssensor von KCNQ2	43
3.2.1	Klinische Charakterisierung der BFNC/Myokymie-Patienten	44
3.2.2	Genetische Charakterisierung der BFNC/Myokymie-Patienten	46
3.2.3	Lokalisation von KCNQ2 und KCNQ3 im Rückenmark	46

3.2.4	Elektrophysiologische Analyse der R207W-Mutation in KCNQ2	48
3.2.5	Oberflächenexpression der R207W-Mutation in KCNQ2	54
3.2.6	Effekt der S4-Mutation auf die Offenwahrscheinlichkeit anderer KCNQ-Kanäle	56
3.3	Analyse von Mausmodellen für DFNA2	58
3.3.1	Erscheinungsbild und Hörvermögen	59
3.3.2	Expression von KCNQ4 im Cortischen Organ	60
3.3.3	Das Ruhemembranpotential in den äußeren Haarzellen der Cochlea	60
3.3.4	Ströme in den äußeren Haarzellen der Cochlea	62
3.3.5	Das Ruhemembranpotential in den inneren Haarzellen der Cochlea	69
3.3.6	Ströme in den inneren Haarzellen der Cochlea	71
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
4	Diskussion	75
4.1	KCNQ1 und seine β -Untereinheiten im Gastrointestinaltrakt	75
4.1.1	KCNQ1 und KCNE3 vermitteln den basolateralen cAMP-abhängigen Kaliumstrom in Kryptzellen	75
4.1.2	KCNQ1 und KCNE2 lokalisieren in einem Subtyp von Magendrüsenzellen	77
4.1.3	KCNE2 moduliert den Strom von KCNQ1	78
4.1.4	KCNQ1/KCNE2-Heteromere sind möglicherweise an der Magensäure-Sekretion beteiligt	78
4.1.5	Ausblick	79
4.2	Analyse einer Mutation im Spannungssensor von KCNQ2	80
4.2.1	Myokymie und BFNC werden durch eine Mutation im Spannungssensor von KCNQ2 verursacht	80
4.2.2	Die Myokymie entsteht vermutlich durch die Übererregbarkeit der unteren Motoneurone	82
4.2.3	Die R207W-Mutation in KCNQ2 hat einen dominant-negativen Effekt auf KCNQ2-Ströme	83
4.2.4	BFNC und Implikationen für eine genotypspezifische Therapie	85
4.2.5	Ausblick	86
4.3	Analyse von Mausmodellen für die progrediente Ertaubung DFNA2	86
4.3.1	KCNQ4 vermittelt den $I_{K,n}$ -Strom äußerer Haarzellen	88
4.3.2	Die Rolle von KCNQ4 in den inneren Haarzellen	91
4.3.3	Die Pathophysiologie von DFNA2	94
4.3.4	Ausblick	97
5	Zusammenfassung	99
6	Kollaborationen	103

Abbildungsverzeichnis

1.1	α -Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle.	6
1.2	Dendrogramm der KCNQ- und der KCNE-Familie.	10
1.3	Kalium-Recycling in der <i>Scala media</i> des Innenohrs.	16
2.1	Schematische Darstellung der gerichteten <i>in vitro</i> Mutagenese durch zweifach rekombinante PCR.	28
2.2	<i>Patch clamp</i> Messungen an äußeren und inneren Haarzellen der Maus-Cochlea.	35
3.1	Northern Blot von KCNQ1 und zwei KCNE-Untereinheiten und Charakterisierung der KCNQ1- und KCNE3-Antikörper.	38
3.2	Charakterisierung der KCNQ1- und KCNE3-Antikörper durch Immunfluoreszenz.	39
3.3	Immunfluoreszenz mit KCNQ1- und KCNE3-Antikörpern an Darmschnitten.	40
3.4	Immunfluoreszenz und <i>in situ</i> Hybridisierung an Magenschnitten.	41
3.5	Elektrophysiologische Eigenschaften von KCNQ1 und KCNE2.	43
3.6	Genetische und klinische Charakterisierung der BFNC/Myokymie-Familie.	47
3.7	Topologie des KCNQ2 Kalium-Kanals.	48
3.8	<i>In situ</i> Hybridisierung an Rückenmarksschnitten der Maus.	49
3.9	Elektrophysiologische Eigenschaften von KCNQ2 und den beiden S4-Mutationen.	50
3.10	Stromamplituden von KCNQ2 und den beiden S4-Mutationen.	52
3.11	Zeitkonstanten der Deaktivierung von KCNQ2 und beiden S4-Mutationen.	53
3.12	Oberflächenexpression von KCNQ2 und den beiden S4-Mutationen bei Koexpression mit KCNQ3-HA.	55
3.13	Effekt der S4-Mutation auf die Offenwahrscheinlichkeit von KCNQ1, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5.	57
3.14	Hörschwellen der verschiedenen Mausmodelle für DFNA2.	60
3.15	Expression von KCNQ4 im Cortischen Organ.	61
3.16	Ruhemembranpotential von äußeren Haarzellen in Abhängigkeit vom Genotyp.	62
3.17	Effekt von XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von <i>KCNQ4</i> ^{+/+} -Mäusen.	63
3.18	Effekt von XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von <i>KCNQ4</i> ^{+/-} -Mäusen.	64
3.19	Effekt von XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von <i>KCNQ4</i> ^{-/-} -Mäusen.	65

3.20	Effekt von XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von <i>KCNQ4-DN</i> ^{+/-} -Mäusen.	66
3.21	Effekt von XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von <i>KCNQ4-DN</i> ^{+/-} -Mäusen.	67
3.22	Effekt von XE991 auf die Spannungsabhängigkeit der Ströme in äußeren Haarzellen.	68
3.23	Ruhemembranpotential von inneren Haarzellen in Abhängigkeit vom Genotyp.	69
3.24	Ströme in inneren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle für DFNA2.	70
3.25	Spannungsabhängigkeit der Ströme in inneren Haarzellen.	71
4.1	Transportmodell für die transepitheliale Chloridsekretion in Kryptzellen.	76
4.2	Transportmodell für die Magensäure-Sekretion in Parietalzellen.	79
4.3	Schema einer äußeren Haarzelle.	95

Tabellenverzeichnis

1.1	Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale in Säugerzellen.	2
1.2	KCNQ-Gene, Funktion der Proteine und mit ihnen assoziierte Krankheiten. .	11
1.3	Expressionsmuster der KCNE-Gene, mit ihnen assoziierte Krankheiten und zur Bildung von Heteromeren notwendige α -Untereinheiten.	12



Abkürzungen

ABR	<i>Auditory brainstem response</i>	FCS	Fötale Kälberserum
ATP	Adenosintriphosphat	HA	Hämagglutinin
BFNC	<i>Benign familial neonatal convulsions</i> , eine Neugeborenen-epilepsie	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
bp	Basenpaare	HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> Meerrettich-Peroxidase
BSA	Bovines Serumalbumin	kb	Kilobasenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat	KO	Knockout
cDNA	Komplementäre DNA	LB	Luria-Bertani
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	o/n	Über Nacht
CMV	Zytomegalovirus	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Da	Dalton	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
DEPC	Diethylpyrokarbonat	PCR	Polymerasekettenreaktion
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT-PCR	PCR mit Reverser Transkriptase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodezylsulfat
EEG	Elektroenzephalogramm	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure	TEA	Tetraethylammonium-Chlorid
EMG	Elektromyogramm	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
		Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
		U	Unit, Enzymeinheit

v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
XE991	10,10-bis(4-Pyridinylmethyl)- 9(10H)-Anthracenon





1 Einleitung

Ionentransportprozesse spielen in allen Organismen eine wichtige Rolle. Durch sie werden Signale übertragen, der Stoffwechsel reguliert und viele physiologische Prozesse gesteuert. Inzwischen sind zahlreiche Erbkrankheiten auf Mutationen in Genen für Ionenkanäle zurückgeführt worden (Ashcroft, 2000; Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Die Charakterisierung von Ionenkanälen kann sowohl zum Verständnis solcher Erbkrankheiten beitragen als auch Perspektiven für ihre Therapie eröffnen.

1.1 Zelluläre Membranen

Zelluläre Membranen sind für das Leben einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Die Plasmamembran umschließt die Zelle, grenzt sie gegen die extrazelluläre Umgebung ab und erhält so das intrazelluläre Milieu aufrecht. Membranen von Zellorganellen dienen in eukaryontischen Zellen dazu, Unterschiede zwischen dem Inneren der Organellen und dem Zytosol zu erhalten.

Zellmembranen bestehen aus zwei Schichten amphiphatischer Lipidmoleküle, die so angeordnet sind, dass die hydrophilen Enden dem wässrigen extra- und intrazellulären Milieu zugewandt sind, während sich die lipophilen Enden im wasserfreien Inneren der Lipiddoppelschicht befinden. Hydrophobe Moleküle, wie Sauerstoff und Kohlendioxid, können die Membran passieren. Auch für kleine, ungeladene polare Moleküle, wie Glycerol, Wasser und Harnstoff, sind Lipiddoppelschichten in begrenztem Umfang durchlässig. Reine Lipiddoppelschichten sind hingegen für Ionen und große ungeladene polare Moleküle (z. B. Glukose, Aminosäuren) nicht permeabel. Daher ist ein gerichteter Ionentransport über die Membran notwendig.

1.2 Ionentransport und Membranpotential

Der Transport von Ionen über die Membran wird von verschiedenen Ionentransportproteinen vermittelt, die in die ca. 5–8 nm dicke Lipidmembran eingebettet sind. Dabei sind grundsätzlich zwei verschiedene Prozesse zu unterscheiden: 1. aktiver und 2. passiver Transport. Aktiver Transport ist häufig an die Hydrolyse von ATP gekoppelt und kann Substanzen gegen ihren Konzentrationsgradienten über die Membran pumpen. Passiver Transport erfolgt ohne Energieaufwand entlang eines Konzentrationsgradienten. Bei Ionen und geladenen Molekülen

Ion	Extrazelluläre Konzentration (mM)	Intrazelluläre Konzentration (mM)	Gleichgewichtspotential (mV)
Natrium	135-145	12	+66
Kalium	3,5-5	140	-93
Kalzium	2,25-2,52	10^{-4} (frei)	+135
Chlorid	115	2,5-50	-42

Tabelle 1.1: Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale in Säugerzellen, nach Ashcroft (2000).

ist der passive Transport nicht nur vom Konzentrationsgradienten, sondern auch vom elektrischen Feld abhängig, das sich über der Membran aufbaut. Durch die Kombination von aktiven und passiven Transportprozessen entstehen große Unterschiede in der Zusammensetzung des Zytosols auf der einen Seite und der extrazellulären Flüssigkeit bzw. dem Inneren der membranbegrenzten Zellorganellen auf der anderen Seite. Tabelle 1.1 zeigt die intrazellulären und extrazellulären Konzentrationen für die wichtigsten Ionen. K^+ ist das wichtigste intrazelluläre Kation, extrazellulär ist seine Konzentration erheblich niedriger als intrazellulär. Umgekehrt sind die Verhältnisse für Na^+ , das das wichtigste extrazelluläre Kation darstellt. Durch die asymmetrische Verteilung der Ionen ergibt sich eine Potentialdifferenz über der Membran. Für jede Ionensorte X lässt sich eine Spannung E_X berechnen, bei der sich der Einstrom und Ausstrom der Ionen ausgleichen, so dass kein Netto-Ionenfluss über die Membran zu beobachten ist. Dieses Potential nennt man auch Gleichgewichtspotential oder elektrochemisches Potential einer Ionensorte. Es kann nach der *Nernst-Gleichung* (1.1) berechnet werden. Dabei ist R die allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T die absolute Temperatur, z die Ladung des Ions und F die Faraday-Konstante ($96\,500 \text{ C mol}^{-1}$). $[X]_{\text{innen}}$ und $[X]_{\text{außen}}$ sind die intra- bzw. extrazelluläre Konzentration eines Ions X .

$$E_X = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[X]_{\text{außen}}}{[X]_{\text{innen}}} \quad (1.1)$$

Zellmembranen sind jedoch nicht nur für eine Ionensorte permeabel. Das Ruhemembranpotential einer Zelle, d. h. das Potential, bei dem kein Netto-Ionenfluss erfolgt, ist abhängig vom elektrochemischen Gradienten verschiedener Ionen. Dabei kann die Permeabilität der Zellmembran für verschiedene Ionen sehr unterschiedlich sein. Die *Goldmann-Gleichung* (1.2) berücksichtigt für Anionen A und Kationen K unterschiedliche Permeabilitäten P . Diese Gleichung beruht auf der Annahme, dass das elektrische Feld über der Membran konstant ist, und wird daher auch *constant field equation* genannt. Da Kalium bei Zellen in Ruhe die höchste Permeabilität aufweist, liegt das Ruhemembranpotential der meisten Zellen in Nähe

des Kaliumgleichgewichtspotentials, bei ca. -70 mV.

$$E_{\text{Membran}} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{\sum P_K [K]_{\text{außen}} + P_A [A]_{\text{außen}}}{\sum P_K [K]_{\text{innen}} + P_A [A]_{\text{innen}}} \quad (1.2)$$

Die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der zellulären Membranen werden durch eine Reihe von Transportproteinen aufrechterhalten. Einige Transporter tauschen lediglich externe Ionen gegen interne Ionen aus, wie z. B. der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Andere Transportproteine nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP, um Ionen gegen den elektrochemischen Gradienten zu pumpen. So transportiert z. B. die Na^+/K^+ -ATPase drei Na^+ aus der Zelle heraus und zwei K^+ in die Zelle hinein, was einem elektrogenen Auswärtstransport von einer Netto-Ladung entspricht. Neben Pumpen und Transportern, die den aktiven Transport von Ionen vermitteln, gibt es mit den Ionenkanälen eine dritte Klasse von Membranproteinen.

1.3 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Membranproteine, die in der Zellmembran ionenspezifische Poren bilden (Hille, 1992). Sie transportieren Ionen passiv entlang des elektrochemischen Gradienten über die Membran. In jeder Sekunde können ca. 10^7 - 10^9 Ionen die Membran passieren (Alberts *et al.*, 1995). Ionenkanäle regulieren viele Funktionen sowohl in elektrisch-erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen. Ihre große Bedeutung für die Zellphysiologie wird daran deutlich, dass eine Reihe von Krankheiten von der Dysfunktion oder dem Ausfall eines Ionenkanals verursacht werden. Ionenkanäle weisen eine hydrophile Pore auf, die sich durch die Lipiddoppelschicht der Membran erstreckt. Diese Poren können sich entweder in einem offenen oder geschlossenen Zustand oder in einem Zwischenzustand befinden. Der Übergang zwischen diesen Zuständen wird Schalten (*gating*) genannt. Das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle kann zufällig erfolgen. Es kann aber auch durch eine Vielzahl chemischer oder physikalischer Stimuli ausgelöst werden. So reagieren thermosensitive Kanäle auf Temperaturänderungen. Mechanosensitive Kanäle werden durch mechanische Belastung geöffnet, andere Kanäle können auf Änderungen des pH-Werts oder des Zellvolumens reagieren. In den Liganden-abhängigen Kanälen wird das Schalten von extrazellulären Liganden (Azetylcholin, Glyzin etc.) oder intrazellulären Liganden (Ca^{2+} , cAMP, ATP etc.) gesteuert, die an den Kanal binden und ein Öffnen oder Schließen der Pore bewirken. In den meisten Liganden-abhängigen Ionenkanälen ist die ionenleitende Pore des Kanals selektiv für Kationen oder Anionen. Eine andere Klasse von Ionenkanälen öffnet oder schließt bei Änderungen im Membranpotential der Zelle. Diese spannungsabhängigen Kanäle weisen häufig eine hohe Selektivität für eine Kationen- oder Anionensorte auf.

1.4 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Spannungsabhängige Ionenkanäle durchlaufen eine Reihe von Konformationsänderungen, wenn sich die Spannung über der Membran verändert. Diese Konformationsänderungen

führen zum Öffnen oder Schließen der ionenleitenden Pore des Kanals. Es können verschiedene Offen- und Geschlossenzustände angenommen werden. Wenn der Kanal unter der Spannungsänderung aktiviert, folgt häufig eine Inaktivierung durch eine weitere Konformationsänderung, nach der der Kanal keine Ionen mehr passieren lassen kann. Dieser inaktivierte Zustand hält häufig eine bestimmte Zeit an, bevor der Kanal in den geschlossenen Zustand übergeht. Spannungsabhängige Ionenkanäle können sowohl durch Depolarisation (z. B. Na⁺-Kanäle) als auch durch Hyperpolarisation (z. B. einwärtsgerichtete K⁺-Kanäle) geöffnet werden. Es lassen sich spannungsabhängige Anionenkanäle (Chloridkanäle der CLC-Familie) und spannungsabhängige Kationenkanäle unterscheiden. Zu den letzteren gehören die in dieser Arbeit untersuchten Kaliumkanäle, weshalb im Weiteren auf die spannungsabhängigen Kationenkanäle bzw. insbesondere auf die Kaliumkanäle eingegangen wird.

1.5 Spannungsabhängige Kationenkanäle

Bereits 1949 beschrieben Hodgkin und Huxley die physikalischen Grundlagen des Aktionspotentials und der Erregungsweiterleitung in Nervenzellen. Sie zeigten, dass Aktionspotentiale durch die Aktivierung und Inaktivierung von spannungsabhängigen Kationenströmen entstehen (Hodgkin *et al.*, 1949). Als erster Kationenkanal wurde 1984 ein Na⁺-Kanal aus dem Zitteraal *Electrophorus electricus* kloniert (Noda *et al.*, 1984). Es folgten die Isolierung und Klonierung eines spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanals des L-Typs aus dem Skelettmuskel (Curtis und Catterall, 1984; Tanabe *et al.*, 1987). Der erste K⁺-Kanal wurde mit der Klonierung des *Shaker*-Gens aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gefunden (Papazian *et al.*, 1987; Kamb *et al.*, 1987; Pongs *et al.*, 1988). Inzwischen wurde ein Vielzahl von spannungsabhängigen Kationenkanälen kloniert und elektrophysiologisch charakterisiert. Allein im Nematoden *Caenorhabditis elegans* sind inzwischen ca. 60 Gene gefunden worden, die für Kaliumkanäle codieren (Bargmann, 1998).

Die spannungsabhängigen Kationenkanäle gehören zu einer Genfamilie, die sich vermutlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat. Die spannungsabhängigen K⁺-Kanäle, die mit dem *Shaker*-Kanal verwandt sind, werden aus vier Monomeren mit je sechs Transmembransegmenten (S1–S6) gebildet. Zwischen S5 und S6 taucht eine haarnadelförmige Schleife (P-Loop) auf der extrazellulären Seite der Membran ein und trägt zur Pore und dem Selektivitätsfilter des Ionenkanals bei (6TM-1P-Motiv). Die N- und C-Termini der Monomere liegen auf der intrazellulären Seite der Membran (Abb. 1.1 A). Das 6TM-1P-Motiv liegt in spannungsabhängigen Na⁺- und Ca²⁺-Kanälen in vier nicht identischen Wiederholungen vor, wobei die vier Elemente über zytosolische Linker kovalent verbunden sind.

Neben diesen Kationenkanälen gibt es noch Kaliumkanäle, die lediglich aus zwei Transmembrandomänen und einer Pore bestehen (2TM-1P-Motiv). Dies sind einwärtsgerichtete (*inward-rectifying*) Kir-Kanäle, die einerseits am K⁺-Transport über Membranen beteiligt sind und andererseits zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials von Zellen beitragen, z. B. Kir1.1a (Ho *et al.*, 1993). Aus einer Verdopplung des 2TM-1P-Motivs sind vermutlich die Ka-

liumkanäle entstanden, die vier Transmembransegmente und zwei Poren aufweisen, wie z. B. die TWIK-Kanäle (Lesage *et al.*, 1996). Bei der Familie der TOK-Kanäle, die bisher nur in Hefe beschrieben wurden, ist das 6TM-1P-Motiv der spannungsabhängigen Kaliumkanäle am C-Terminus mit dem 2TM-1P-Motiv der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle verschmolzen (Ketchum *et al.*, 1995).

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle mit dem 6TM-1P-Motiv, die im Folgenden ausführlicher beschrieben werden, lassen sich in mindestens drei Gruppen von α -Untereinheiten gliedern: die K_v -Kanäle, die EAG-Kanäle und die KCNQ-Kanäle. Zusätzlich weisen auch die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle sowie die Kanäle, die durch zyklische Nucleotide gesteuert werden, eine Struktur mit sechs Transmembransegmenten und einem P-Loop auf.

1.6 Die Familie der K_v -Kanäle

Nach der Klonierung des *Shaker*-Kanals wurde aus *Drosophila melanogaster* eine Reihe verwandter Gene kloniert, die *Shab*, *Shaw* und *Shal* genannt wurden. Die homologen Proteine in Mammalia werden als K_v1 (*Shaker*), K_v2 (*Shab*), K_v3 (*Shaw*) und K_v4 (*Shal*) bezeichnet (Abb. 1.1 C). Sie stellen Unterfamilien dar, die jeweils mehrere Mitglieder aufweisen. So sind z. B. für K_v1 neun Mitglieder gefunden worden ($K_v1.1-1.9$).

1.6.1 Diversität der K_v -Kanäle

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle werden aus vier porenbildenden α -Untereinheiten gebildet, die ihrerseits mit verschiedenen β -Untereinheiten assoziieren können. β -Untereinheiten können, im Gegensatz zu α -Untereinheiten, allein keine funktionellen Kanäle bilden. Sie erhöhen die Oberflächenexpression der Kanäle (Shi *et al.*, 1996) und modulieren deren physiologische Eigenschaften (Rettig *et al.*, 1994). Bisher sind drei β -Untereinheiten der K_v -Kanäle kloniert worden (Rettig *et al.*, 1994; Majumder *et al.*, 1994), von denen es mehrere Spleißvarianten gibt. Die β -Untereinheiten der K_v -Kanäle sind zytoplasmatische Proteine ohne Transmembransegmente, die sich als tetramere Komplexe an die intrazelluläre Oberfläche der K_v -Kanäle anlagern (Parcej *et al.*, 1992; Gulbis *et al.*, 1999).

Verschiedene α -Untereinheiten der K_v -Unterfamilien können zu heteromeren Kanälen assoziieren (Isacoff *et al.*, 1990; Ruppertsberg *et al.*, 1990; Covarrubias *et al.*, 1991). So können z. B. $K_v1.1$ -Kanäle mit $K_v1.2$ - und $K_v1.5$ -Untereinheiten Heteromere bilden, jedoch nicht mit K_v4 -Kanälen (Christie *et al.*, 1990). Die Assoziation von heteromeren Kanälen einer K_v -Unterfamilie wird über ein ca. 130 Aminosäuren langes Peptid (T1-Domäne) vermittelt, das unmittelbar vor dem ersten Transmembransegment der α -Untereinheit liegt (Li *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1993). Die heteromeren Kanäle können andere funktionelle Eigenschaften aufweisen als die Homomere, wodurch sich eine hohe funktionelle Vielfalt ergibt. Diese Diversität der K_v -Kanäle wird zusätzlich durch das Vorkommen von verschiedenen Spleißvarianten erhöht, die ebenfalls unterschiedliche funktionelle Eigenschaften haben können.

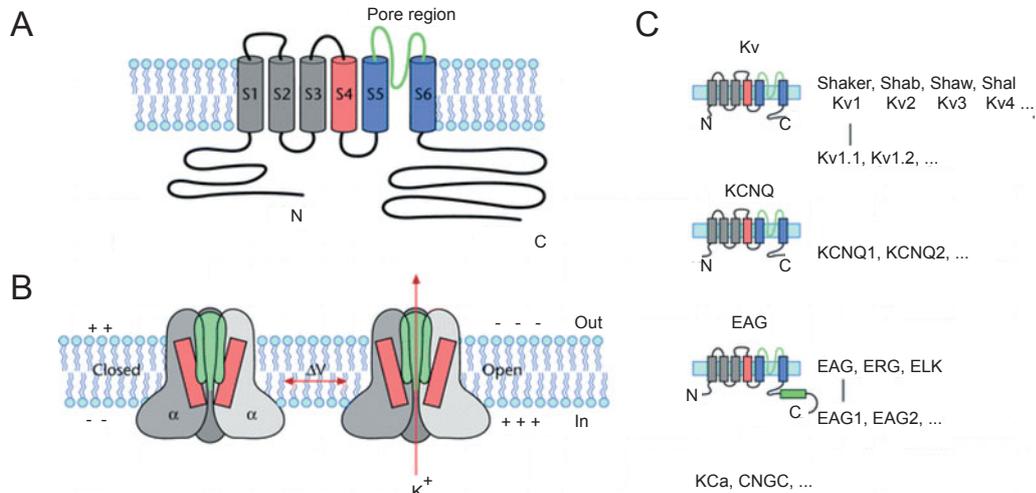


Abb. 1.1: α -Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle. **(A)** Vereinfachtes Topologie-Modell eines spannungsabhängigen Kaliumkanals in der Zellmembran. Sechs putative Transmembransegmente formen den Kern des Kanalkomplexes. Das Segment S4 ist stark positiv geladen und fungiert als Spannungssensor. Die Verbindung zwischen S5 und S6 kleidet die Pore aus und bildet den Selektivitätsfilter. Der N- und C-Terminus des Proteins sind im Zytosol lokalisiert. **(B)** Querschnitte eines K_v -Kanalmodells zeigen die Anordnung der vier α -Untereinheiten. Die grünen Segmente stellen die Porenregion mit dem Selektivitätsfilter dar, der rote Teil repräsentiert den Spannungssensor S4, der bei Depolarisation der Zellmembran eine Translokation erfährt. Diese spannungsabhängige Translokation von S4 führt zur Öffnung der Pore und zum folgenden Ausstrom von Kaliumionen. **(C)** Die drei Familien spannungsabhängiger Kaliumkanäle: die klassischen K_v -Kanäle, die KCNQ- und die EAG-Familie. Es sind einige ausgewählte Unterfamilien und einzelne Mitglieder gezeigt. Diese α -Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle haben das Motiv aus sechs Transmembransegmenten gemeinsam. In dieser Hinsicht sind auch die Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle (BK-, IK- und SK-Kanäle) und die Kanäle, die durch zyklische Nukleotide geschaltet werden (CGN- und HCN-Kanäle), sehr nahe mit den spannungsabhängigen Kaliumkanälen verwandt. Verändert nach: http://www.els.net/els/els/els/public_article.html.

1.6.2 Struktur und Funktion der K_v -Kanäle

K_v -Kanäle weisen, wie oben beschrieben, sechs Transmembransegmente (S1–S6) auf. Zwischen S5 und S6 befindet sich eine extrazelluläre Schleife, die in die Membran eintaucht und zur Pore und zum Selektivitätsfilter beiträgt (Abb. 1.1 A). Doyle *et al.* (1998) haben durch die Aufklärung der Kristallstruktur des Kaliumkanals von *Streptomyces lividans* (KcsA) ein Modell für die Pore entwickelt. Obwohl KcsA ein bakterieller Kaliumkanal mit nur zwei Transmembransegmenten ist, weist der Kanal eine hohe Homologie zu den K_v -Kanälen vor allem im Bereich der Pore auf (MacKinnon *et al.*, 1998). Die Kristallstruktur von KcsA in einer Auflösung von 3,2 Å zeigte, dass sich vier Untereinheiten symmetrisch um eine einzelne Pore lagern. Jede Untereinheit

besteht aus zwei Transmembransegmenten, die über eine Kette von 30 Aminosäuren verbunden sind. Die Untereinheiten nehmen die Form eines invertierten Tipis an, wobei das breite Ende extrazellulär liegt. Sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Öffnung des Kanals sind negativ geladen, vermutlich um positiv geladene Ionen anzuziehen und negativ geladene abzustößen. Ein Teil des Permeationsweges durch die Membran ist mit Wasser gefüllt. Kaliumionen gelangen daher zunächst mit einer Hülle aus acht Wassermolekülen in die zentrale Höhle der Kanalpore (Zhou *et al.*, 2001). Dort wird das Kaliumion durch Helixdipole stabilisiert (Doyle *et al.*, 1998; Roux und MacKinnon, 1999). Am engsten Teil des Permeationsweges, dem Selektivitätsfilter, muss das Kaliumion seine Hydrathülle abstreifen und wird, ähnlich wie in Wasser, von zwei Gruppen von vier Sauerstoffatomen umgeben und stabilisiert. Diese Sauerstoffatome stammen von den Aminosäureresten des P-Loops, die eine für Kaliumkanäle stark konservierte Aminosäuresequenz aufweisen: TxxTxGYG (Heginbotham *et al.*, 1994). Es befinden sich stets mehrere Kaliumionen in der Pore, die einzeln durch den Permeationsweg geschleust werden (Hille und Schwarz, 1978; Spassova und Lu, 1998; Morais-Cabral *et al.*, 2001) und dafür sorgen, dass das koordinierte Kaliumion nicht in der Pore stecken bleibt, sondern die Pore durch elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen den positiv geladenen Kaliumionen verlässt.

Die Aktivierung von K_v -Kanälen resultiert aus einer spannungsabhängigen Konformationsänderung des Proteins, die zur Öffnung der ionenleitenden Pore führt (Abb. 1.1 B). Das erfordert einen Mechanismus, mit dem eine Spannungsänderung über der Membran wahrgenommen werden kann. Die Aktivierung von spannungsabhängigen Kanälen ist mit nicht-linearen kapazitiven Strömen assoziiert, die als Schaltströme (*gating currents*) bezeichnet werden. Sie entstehen durch die Bewegung von Ladungen über die Membran. Noda *et al.* (1984) erkannten als erste, dass das 4. Transmembransegment (S4) als Spannungssensor der spannungsabhängigen Kanäle dienen könnte. S4 enthält, untypisch für Transmembransegmente, in allen spannungsabhängigen Kationenkanälen sechs bis acht positiv geladene Aminosäuren. Im S4-Segment vom *Shaker*-Kanal befinden sich in jeder dritten Position ein Arginin oder Lysin, die von jeweils zwei nicht-polaren Aminosäuren getrennt werden (Bezanilla, 2000), so dass das S4-Segment eine amphipatische Helix darstellt. Verschiedene Mutagenesestudien an Na^+ -Kanälen und vor allem an K_v -Kanälen unterstützten die Spannungssensor-Hypothese (Stühmer *et al.*, 1989; Papazian *et al.*, 1991; Schoppa und Sigworth, 1998; Seoh *et al.*, 1996; Smith-Maxwell *et al.*, 1998). Durch eine Arbeit von Yang *et al.* (1996) wurde deutlich, dass sich das S4-Segment innerhalb der Membran bewegt, wenn sich die Spannung über der Membran ändert. Kürzlich bestätigten zwei unabhängige Arbeiten von Cha *et al.* (1999) und Glauner *et al.* (1999), dass die Hauptbewegung des S4-Segments eine Drehung um die Längsachse der Helix ist, wobei der Drehungswinkel bis zu 180° beträgt.

K_v -Kanäle verfügen über zwei Arten der Inaktivierung, die schnelle N-Typ Inaktivierung und die langsamere C-Typ Inaktivierung. Bei der schnellen N-Typ Inaktivierung verstopft ein Teil des zytosolischen N-Terminus der α -Untereinheit die Pore des Kanals (Hoshi *et al.*, 1991). Dieser Vorgang ist spannungsabhängig und wird nach einem Modell für die Inaktivierung von Na^+ -Kanälen auch *ball-and-chain*-Modell genannt (Armstrong und Bezanilla, 1973). In

einigen K_v -Kanälen ist das blockierende Peptid nicht an der α -Untereinheit, sondern an der β -Untereinheit lokalisiert (Rettig *et al.*, 1994). Die C-Typ Inaktivierung ist bisher nicht sehr gut verstanden. Man nimmt an, dass an dieser Inaktivierung lokale Konformationsänderungen an der extrazellulären Öffnung der Kanalpore beteiligt sind, die zu einer Verengung bzw. Verstopfung der Pore führen (Liu *et al.*, 1996).

Während sogenannte A-Typ K_v -Kanäle sehr schnell inaktivieren, verläuft die Inaktivierung bei den verzögert gleichrichtenden (*delayed rectifier*) K_v -Kanälen langsamer. A-Typ K_v -Kanäle spielen bei der Generierung prä- und postsynaptischer Signale eine Rolle. Sie arbeiten im Spannungsbereich unterhalb der Aktionspotentialschwelle. *Delayed rectifier* hingegen repolarisieren die Zellen nach einem Aktionspotential und reduzieren die Zellerregbarkeit. K_v -Kanäle kommen jedoch nicht nur in Nerv- und Muskelzellen vor, sondern sind auch in anderen Zelltypen exprimiert.

1.7 EAG-ähnliche Kanäle

EAG- und EAG-ähnliche Kanäle haben ihren Namen von einer *Drosophila*-Mutante, die bei Äther-Exposition die Beine wie beim Go-Go-Tanz schüttelt. Das mutierte Gen wurde daher *ether-à-go-go* oder *eag* genannt. Es codiert für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal (Bruggemann *et al.*, 1993), für den eine Reihe von verwandten Kanälen (die Unterfamilien *eag*, *erg*, *elk*) gefunden wurde (Abb. 1.1 C). Der erste humane homologe Kanal wurde HERG genannt, für *human ether-à-go-go related gene* (Warmke und Ganetzky, 1994).

Die EAG-ähnlichen Kanäle weisen in Mammalia eine Homologie von mehr als 85 % auf DNA-Ebene auf (Warmke und Ganetzky, 1994). Die Kanäle haben eine ähnliche Struktur wie die K_v -Kanäle. Sie besitzen ebenfalls sechs Transmembransegmente, haben einen P-Loop zwischen S5 und S6 sowie einen positiv geladenen Spannungssensor S4 (Abb. 1.1 A). Strukturell unterscheidet sich der HERG-Kanal in zwei Bereichen von den K_v -Kanälen. Erstens trägt der Selektivitätsfilter des Kanals nicht die Konsensussequenz GYG, sondern ein GFG-Motiv. Zweitens liegt im proximalen C-Terminus des Kanals ein hoch konservierter Bereich, der homolog zu den Bindungsstellen für zyklisches Nukleotid in cAMP-gesteuerten Ionenkanälen ist.

Funktionell weist der HERG-Kanal ebenfalls einige Besonderheiten auf. Der Kanal aktiviert bei Potentialen über -50 mV langsam und führt zu auswärtsgerichteten Kaliumströmen (Sanguinetti *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996). Bei $+10$ mV deaktiviert der Kanal jedoch bereits. Diese ungewöhnliche Spannungsabhängigkeit resultiert aus der langsamen Aktivierung des Kanals und einer sehr schnellen Inaktivierung, die bereits einsetzt, bevor der Kanal maximal aktiviert ist. Diese sehr schnelle Inaktivierung ist vom N-Terminus des Proteins unabhängig (Spector *et al.*, 1996b) und weist Charakteristika der C-Typ Inaktivierung auf (Smith *et al.*, 1996).

Die heterologe Expression von HERG zeigte Ströme, die ähnliche Kinetiken und pharmakologische Eigenschaften aufwiesen wie der verzögerte gleichrichtende (*delayed rectifier*) Strom I_{Kr} in Herzmuskelzellen (Sanguinetti *et al.*, 1995; Spector *et al.*, 1996a). HERG ist vermutlich

das molekulare Korrelat von I_{Kr} , wobei kontrovers ist, ob HERG allein diesen Strom konstituiert (Weerapura *et al.*, 2002) oder ob HERG mit einer β -Untereinheit der KCNE-Familie (KCNE1 oder KCNE2) assoziiert (McDonald *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2001; Isbrandt *et al.*, 2002). I_{Kr} spielt eine große Rolle bei der Repolarisation des Aktionspotentials im Herzen. Diese putative Funktion wird dadurch belegt, dass Mutationen in HERG zum *long QT*-Syndrom (LQT2) führen können (Sanguinetti *et al.*, 1995), einer Repolarisationsstörung des Herzens, die klinisch durch ein abnorm langes QT-Intervall im EKG charakterisiert ist und zu einer kardialen Arrhythmie führt.

1.8 KCNQ-Kanäle

Der HERG-Kanal ist nicht der einzige Ionenkanal, in dem Mutationen zum LQT-Syndrom führen können. Es sind insgesamt sieben Genorte (LQT1-7) bekannt. Mutationen im kardialen Natriumkanal *SCN5A* führen zu LQT3 (Wang *et al.*, 1995), und Mutationen in *KCNE1* bzw. *KCNE2* verursachen LQT5 bzw. LQT6 (Splawski *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 1999). LQT7 wird durch eine Mutation in dem einwärtsgerichtenden Kaliumkanal Kir2.1 verursacht. LQT1 ist mit 50–60 % aller Fälle der häufigst mutierte Locus (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Wang *et al.* (1996) zeigten, dass LQT1 für einen Kaliumkanal codiert, der KCNQ1 (früher K_vLQT1) genannt wurde. Inzwischen sind mit KCNQ2–5 vier weitere KCNQ-Kanäle kloniert worden, von denen drei ebenfalls mit Erbkrankheiten assoziiert sind (Tabelle 1.2).

1.8.1 Struktur der KCNQ-Kanäle

KCNQ-Kanäle weisen, wie K_v -Kanäle, sechs Transmembransegmente und einen P-Loop auf (Abb. 1.1). Der Grad der Homologie zwischen KCNQ-Kanälen ist mit ca. 30–65 % Identität auf Aminosäureebene relativ gering (Abb. 1.2 A). KCNQ-Kanäle besitzen ein spannungssensitives 4. Transmembransegment, das in KCNQ2–5 sechs und in KCNQ1 vier positiv geladene Arginine trägt (Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000a). Der N- und der C-Terminus liegen intrazellulär, wobei der C-Terminus sehr lang ist und eine unter KCNQ-Kanälen konservierte Region (A-Domäne) aufweist (Schwake *et al.*, 2000). Der A-Domäne folgt ein kurzer Aminosäureabschnitt, der vermutlich zur Assoziation der α -Untereinheiten in einen tetrameren Kanalkomplex dient (Schmitt *et al.*, 2000). Kürzlich wurde von zwei unabhängigen Gruppen gezeigt, dass Calmodulin (CaM) an KCNQ2, KCNQ3 und KCNQ5 binden kann (Yus-Nájera *et al.*, 2002; Wen und Levitan, 2002). Die Bindungsstelle umfasst u. a. ein IQ-Motiv (CaM-Bindungsmotiv) in einem konservierten Bereich unmittelbar hinter dem 6. Transmembransegment. Ausserdem scheint ein ca. 30 Aminosäuren langer Abschnitt innerhalb der A-Domäne für die Bindung von CaM notwendig zu sein.

In den N-Termini von KCNQ1 und KCNQ2 wurden einige putative Phosphorylierungsstellen gefunden, an die die Proteinkinase A (PKA) binden kann. KCNQ1 weist außerdem eine Glykosylierungsstelle am extrazellulären Loop zwischen S5 und S6 auf (Barhanin *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996).

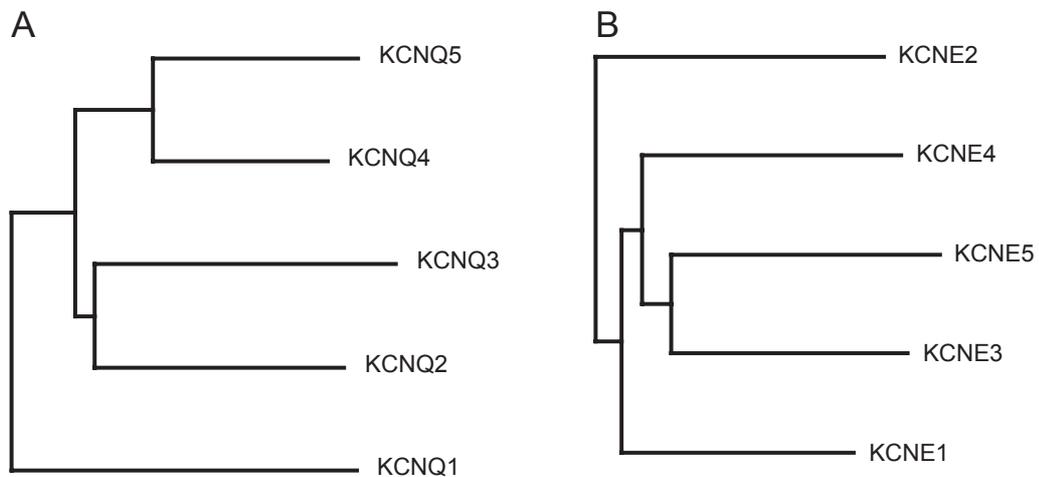


Abb. 1.2: Dendrogramm der KCNQ- (A) und der KCNE-Familie (B) von Kaliumkanaluntereinheiten. KCNQ4 und KCNQ5 besitzen innerhalb der KCNQ-Familie die größte Sequenzähnlichkeit. KCNE3 und KCNE5 sind sich innerhalb der KCNE-Familie am ähnlichsten. Die Dendrogramme wurden mit dem Programm ClustalX 1.8 (Thompson *et al.*, 1997) für die humanen Klone in ihrer vollen Länge erstellt. Die Länge der horizontalen Linien ist proportional zu den Sequenzunterschieden zwischen den Untereinheiten.

1.8.2 Diversität der KCNQ-Kanäle

Für KCNQ1, KCNQ2 und KCNQ5 sind eine ganze Reihe von Spleißvarianten bekannt (Demolombe *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 2000b; Pan *et al.*, 2001), die zum Teil eine gewebespezifische Expression zeigen und unterschiedliche funktionelle Eigenschaften haben.

Alle KCNQ-Kanalproteine können *in vitro* homomere Kanäle bilden, während die Bildung von Heteromeren auf bestimmte Kombinationen beschränkt ist (Kubisch *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 1998; Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000b). So kann KCNQ1 vermutlich keine Heteromere mit den anderen KCNQ-Kanälen bilden. KCNQ3 hingegen assoziiert *in vitro* mit KCNQ2, KCNQ4 und KCNQ5, die sich ihrerseits untereinander nicht zu heteromeren Kanälen zusammenlagern.

KCNQ-Kanäle können außerdem mit β -Untereinheiten der KCNE-Familie assoziieren, die fünf Mitglieder aufweist (Abb. 1.2 B) (Takumi *et al.*, 1988; Abbott *et al.*, 1999; Piccini *et al.*, 1999). KCNE-Proteine besitzen, im Gegensatz zu den β -Untereinheiten der K_v -Kanäle, ein Transmembransegment sowie einen extrazellulären N- und einen intrazellulären C-Terminus. Die KCNE-Untereinheiten weisen eine relativ geringe Homologie (50–60 %) auf, die im Transmembransegment und einem kurzen Bereich dahinter am stärksten ist. Die Mitglieder der KCNE-Familie können nicht nur mit KCNQ-Kanälen assoziieren, sondern mit einer Vielzahl von spannungsabhängigen Kaliumkanälen Heteromere bilden (Tabelle 1.3). So assoziiert

Gen	Expression	Funktion	Erbgang	Krankheit
<i>KCNQ1</i>	Herz, Cochlea, Darm, Magen, Pankreas etc.	Repolarisation des kardialen Aktionspotentials, K ⁺ -Recycling in der <i>Stria vascularis</i> , Chloridsekretion im Darm etc.	dominant	Kardiale Arrhythmie (Romano-Ward-Syndrom)
			rezessiv	Kardiale Arrhythmie mit kongenitaler Taubheit (Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom)
<i>KCNQ2</i>	Gehirn, Ganglien, Rückenmark	M-Strom, Modulation der neuronalen Erregbarkeit	dominant	Neonatale Epilepsie (BFNC)
<i>KCNQ3</i>	Gehirn, Ganglien, Rückenmark	M-Strom, Modulation der neuronalen Erregbarkeit	dominant	Neonatale Epilepsie (BFNC)
<i>KCNQ4</i>	Cochlea, Gehirn, Ganglien etc.	I _{K,n}	dominant	Progrediente Taubheit (DFNA2)
<i>KCNQ5</i>	Gehirn, Ganglien, Skelettmuskel	M-Strom	—	—

Tabelle 1.2: Expressionsmuster der KCNQ-Gene und mit den Genen assoziierte Krankheiten. Für *KCNQ5* ist bisher keine Erbkrankheit gefunden worden.

z. B. KCNE3 sowohl mit *KCNQ1* als auch mit *Kv3.4*, einem Mitglied der *K_v*-Kanalfamilie (Abbott *et al.*, 2001). Verschiedene Ionenkanalerkrankungen konnten auf Mutationen in Mitgliedern der KCNE-Familie zurückgeführt werden (Tabelle 1.3). Im Folgenden werden die KCNQ-Kanäle einzeln vorgestellt (Tabelle 1.2) und ihre Assoziation mit den β -Untereinheiten der KCNE-Familie (Tabelle 1.3) dargestellt.

1.8.3 *KCNQ1* und seine β -Untereinheiten

KCNQ1 wird vor allem im Herzen, in der Niere, Leber, Lunge und Cochlea sowie im Gastrointestinaltrakt exprimiert (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Neyroud *et al.*, 1997). Homomere aus *KCNQ1* vermitteln *in vitro* einen spannungsabhängigen, langsam aktivierenden und langsam deaktivierenden Kaliumauswärtsstrom. Die Inaktivierung des Kanals ist sehr schwach (Sanguinetti *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998b; Yang *et al.*, 1997). *KCNQ1* kann jedoch mit einigen β -Untereinheiten der KCNE-Familie assoziieren (Tabelle 1.3), die die Kinetik von *KCNQ1* fundamental verändern.

Gen	Expression	Krankheit	Heteromere Kanäle
<i>KCNE1</i>	Herz, Cochlea, Darm, Magen, Pankreas etc.	Kardiale Arrhythmie, kardiale Arrhythmie mit kongenitaler Taubheit	KCNQ1, HERG
<i>KCNE2</i>	Herz, Gehirn, Ganglien, Magen	Kardiale Arrhythmie, erworbene kardiale Arrhythmie	KCNQ1, KCNQ2/3, HCN, K _v 4.2, K _v 4.3, HERG
<i>KCNE3</i>	Niere, Darm, Skelettmuskel	Periodische Paralyse	KCNQ1, K _v 3.4
<i>KCNE4</i>	Embryo, Uterus, Niere, Herz	–	KCNQ1
<i>KCNE5</i>	Gehirn, Ganglien, Skelettmuskel, Herz	deletiert im AMME-Syndrom	KCNQ1

Tabelle 1.3: Expressionsmuster der KCNE- β -Untereinheiten und mit ihnen assoziierte Krankheiten. KCNE-Untereinheiten bilden nicht nur mit Mitgliedern der KCNQ-Familie heteromere Kanäle, sondern auch mit anderen Kaliumkanal- α -Untereinheiten. Für *KCNE4* ist bisher keine Erbkrankheit gefunden worden.

Im Herz und im Innenohr assoziiert KCNQ1 mit KCNE1, was zu einer zwei- bis sechsfachen Erhöhung der Stromamplitude, einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit um ca. +30 mV und einer drastischen Verlangsamung der Aktivierung des Kanals führt. Die schwache spannungsabhängige Inaktivierung des Kanals ist in Heteromeren aus KCNQ1 und KCNE1 nicht mehr sichtbar. Gemeinsam bilden KCNQ1 und KCNE1 das molekulare Korrelat zum langsamen, verzögert gleichrichtenden Strom I_{Ks} , der in Herzmuskelzellen die Repolarisation des Aktionspotentials vermittelt. Dominant-negative Mutationen sowohl in *KCNQ1* als auch in *KCNE1* führen zu einem verlängerten Aktionspotential im Herzen und zu einer Form des *long QT*-Syndroms, dem Romano-Ward-Syndrom (Wang *et al.*, 1996; Wollnik *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997; Chouabe *et al.*, 1997). Bei einem totalen Funktionsverlust durch zwei mutierte Allele kommt es neben der kardialen Arrhythmie zusätzlich zu kongenitaler Taubheit (Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom), da die Kaliumsekretion in die Endolymph des Innenohrs gestört ist (Neyroud *et al.*, 1997; Chouabe *et al.*, 1997; Tyson *et al.*, 1997). KCNQ1 und KCNE1 bilden in den Marginalzellen der *Stria vascularis* heteromere Kanäle, die für die apikale Kaliumsekretion verantwortlich sind (Vetter *et al.*, 1996). In Epithelien der Atmungsorgane vermitteln KCNQ1 und KCNE1 möglicherweise eine basolaterale Kaliumleitfähigkeit und spielen eine Rolle bei der Regulation des Zellvolumens (Lock und Valverde, 2000; Mall *et al.*, 2000).

Im Dünn- und Dickdarm assoziiert KCNQ1 vermutlich mit KCNE3. Heteromere aus KCNQ1 und KCNE3 vermitteln einen Strom, der eine lineare Spannungsabhängigkeit aufweist, durch cAMP aktivierbar und zeitunabhängig ist (Schroeder *et al.*, 2000b). Diese Eigenschaften legen die Vermutung nahe, dass KCNQ1 und KCNE3 zusammen für den transepithelialen Chloridtransport in Kryptenzellen des Dünndarms und des Dickdarms verantwortlich sind.

Erst kürzlich zeigten Grunnet *et al.* (2002), dass KCNQ1 mit KCNE4 assoziieren kann. KCNE4 wirkt inhibitorisch und blockiert KCNQ1-Ströme vermutlich in der Plasmamembran (Grunnet *et al.*, 2002). Die physiologische Rolle dieser Interaktion ist jedoch unklar.

Ebenfalls erst kürzlich wurde die Interaktion von KCNQ1 mit KCNE5 nachgewiesen (Angelo *et al.*, 2002). *KCNE5* (auch *KCNE1-L*) ist eines von vier Genen, die im AMME-Syndrom (*Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia, elliptocytosis*) deletiert sind (Piccini *et al.*, 1999). *KCNE5* beeinflusst die Kinetik von KCNQ1 ähnlich wie *KCNE1*, hat jedoch einen stärkeren Effekt als *KCNE1*. So führt die Koexpression von KCNQ1 und *KCNE5* zu sehr langsam aktivierenden Strömen, deren Spannungsabhängigkeit im Vergleich zu Heteromeren aus KCNQ1 und *KCNE1* zu noch positiveren Potentialen verschoben ist. Die Deaktivierung des Stroms erfolgt schneller als bei Heteromeren aus KCNQ1 und *KCNE1*. Möglicherweise bilden KCNQ1 und *KCNE5* im Herzen heteromere Kanäle, die in bestimmten Regionen des Herzens aktiv sind (Angelo *et al.*, 2002). KCNQ1 scheint also gewebespezifisch mit verschiedenen *KCNE*-Untereinheiten zu assoziieren, die das Schalten von KCNQ1 stark modulieren.

1.8.4 KCNQ2 und KCNQ3

KCNQ2 und KCNQ3 wurden über ihre Homologie zu KCNQ1 identifiziert (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998) und durch positionelles Klonieren in Familien mit BFNC (*benign familial neonatal convulsions*), einer generalisierten idiopathischen Epilepsie bei Neugeborenen, gefunden (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998). Beide Kanäle werden ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; Tinel *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998); dabei zeigen die Expressionsmuster beider Kanäle starke Überlappungen. Allerdings kommen die Kanäle in verschiedenen Regionen des Gehirns unterschiedlich stark vor (Schroeder *et al.*, 1998). Antikörperstudien haben außerdem gezeigt, dass in einigen Neuronen nur eine der beiden Untereinheiten exprimiert wird (Cooper *et al.*, 2000). Die KCNQ2-Expression im Gehirn ist in Bereichen, die für die Kontrolle rhythmischer Gehirnaktivität und die neuronale Synchronisation verantwortlich sind, besonders ausgeprägt (Cooper *et al.*, 2001).

KCNQ2 und KCNQ3 können *in vitro* homomere Kanäle bilden (Wang *et al.*, 1998a; Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), dabei sind die Ströme für KCNQ3 bei heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oozyten wesentlich kleiner als für KCNQ2 (Wang *et al.*, 1998a; Schroeder *et al.*, 1998). KCNQ2 und KCNQ3 vermitteln bei Depolarisation langsam aktivierende Kaliumauswärtsströme, die nach Repolarisation langsam deaktivieren. Heterologe Koexpression der beiden KCNQ-Untereinheiten führt zu einem dramatischen Anstieg der Stromamplitude

(Wang *et al.*, 1998a; Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998) mit leicht veränderten kinetischen Eigenschaften und einer geänderten Sensitivität zu Kaliumkanalblockern, wie TEA, Linopirdin, Ba^{2+} (Wang *et al.*, 1998a; Hadley *et al.*, 2000; Robbins, 2001). Der starke Anstieg in der Stromamplitude (bis zu 10fach verglichen mit KCNQ2-Homomeren) ist auf eine Erhöhung der Anzahl funktioneller Kanäle in der Membran zurückzuführen und nicht auf einen Anstieg der Einzelkanalleitfähigkeit oder der Offenwahrscheinlichkeit der heteromeren Kanäle (Schwabe *et al.*, 2000). Koimmunpräzipitationen mit menschlichem Gehirngewebe sowie Antikörperstudien zeigen, dass KCNQ2 und KCNQ3 auch *in vivo* heteromere Kanäle bilden können (Cooper *et al.*, 2000). KCNQ3 kann außer mit KCNQ2 auch mit KCNQ4 und KCNQ5 assoziieren. Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist jedoch unklar. Gleiches gilt für die Interaktion von KCNQ2/3-Heteromeren mit β -Untereinheiten der KCNE-Familie. Yang *et al.* (1998) berichteten über einen Effekt von KCNE1 auf die Größe und die Aktivierung von Strömen aus KCNQ2/3-Heteromeren bei einer starken Überexpression von KCNE1. Schroeder *et al.* (1998) fanden bei Expression geringerer Mengen KCNE1, die bereits deutliche Auswirkungen auf das Schalten von KCNQ1 haben, keinen Effekt. Da KCNE1 nicht in neuronalem Gewebe exprimiert wird, ist eine Interaktion *in vivo* eher unwahrscheinlich. Tinel *et al.* (2000b) zeigten hingegen eine Interaktion von KCNQ2/3-Heteromeren mit der β -Untereinheit KCNE2, die ein sehr breites Expressionsmuster aufweist und auch in neuronalem Gewebe vorkommt. Allerdings ist der Einfluss von KCNE2 auf die Kinetik der Ströme aus KCNQ2/3-Heteromeren sehr gering (Tinel *et al.*, 2000).

KCNQ2 und KCNQ3 weisen allein und in Koexpression funktionelle und pharmakologische Charakteristika des neuronalen M-Stroms (I_M) auf (Wang *et al.*, 1998a). I_M wurde zuerst von Brown und Adams in sympathischen Neuronen des Ochsenfrosches beschrieben und später auch im ZNS nachgewiesen (Halliwell und Adams, 1982). Er stellt eine nicht-inaktivierende Kaliumleitfähigkeit dar, die bei Depolarisation langsam aktiviert und durch Aktivierung des muscarinischen Azetylcholinrezeptors (mAChR) inhibierbar ist (Brown und Adams, 1980). I_M wurde in vielen zentralen und peripheren Neuronen identifiziert (Marrión, 1997). Die Identität des Botenstoffs, der die Aktivierung des mAChR an die Modulation des Kaliumstroms koppelt, war lange unbekannt. Erst kürzlich wiesen Suh und Hille nach, dass mAChR die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins vermittelt, das seinerseits die Phospholipase C- β aktiviert und zum Abbau von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) führt. Die Phospholipase C- β scheint den M-Strom zu modulieren, indem sie die PIP₂-Konzentration, die von KCNQ2/3 benötigt wird, an der Membran verringert (Suh und Hille, 2002). Heteromere aus KCNQ2 und KCNQ3 scheinen zumindest in einigen Zellen diesen M-Strom zu vermitteln. Sie zeigen die gleichen Eigenschaften im Schalten und in der Sensitivität zu den I_M -Blockern Linopirdin und XE991 wie die nativen M-Ströme (Wang *et al.*, 1998a). Außerdem sind Homomere aus KCNQ2 und KCNQ3 sowie KCNQ2/3-Heteromere durch Muscarin inhibierbar, wenn sie mit dem Muscarinrezeptor (M1) koexprimiert werden (Selyanko *et al.*, 2000; Shapiro *et al.*, 2000). Allerdings beteiligen sich vermutlich auch andere Kanäle an der Konstituierung des M-Stroms. So sind KCNQ4 und KCNQ5 ebenfalls durch Muscarin inhibierbar und zeigen die typischen kinetischen und pharmakologischen Eigen-

schaften des M-Stroms (Selyanko *et al.*, 2000; Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000a). Auch EAG-ähnliche Kanäle weisen Eigenschaften des M-Stroms auf (Stansfeld *et al.*, 1996; Selyanko *et al.*, 1999). Der M-Strom spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung neuronaler Erregbarkeit, denn I_M ist der einzige Strom, der an der Schwelle von Aktionspotentialen aktiv ist, zur Repolarisation nach Aktionspotentialen beiträgt und so wiederholtes Feuern von Aktionspotentialen verhindert. Eine Inhibition des M-Stroms führt daher zu einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit (Jentsch, 2000).

Die Hypothese, dass KCNQ2 und KCNQ3 dem M-Strom entsprechen, wird durch die Tatsache unterstützt, dass Mutationen in *KCNQ2* und *KCNQ3* zu einer Störung der neuronalen Erregbarkeit führen und eine idiopathische Epilepsie bei Neugeborenen (BFNC) verursachen können. BFNC ist eine seltene autosomal dominant vererbte Epilepsie, die durch partielle oder generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle gekennzeichnet ist, die manchmal mit Apnoe und einer Zyanose einhergehen (Ronen *et al.*, 1993). BFNC beginnt um den dritten Tag nach der Geburt und remittiert nach 3–10 Wochen. Etwa 12–15 % der Patienten erleiden weitere epileptische Anfälle in fortgeschrittenem Alter. BFNC wurde zu zwei verschiedenen Genorten (20q13.3 und 8q24) gelinkt (Leppert *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1993), die das *KCNQ2*- bzw. *KCNQ3*-Gen enthalten (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998). Es sind mehr als zehn Mutationen für *KCNQ2* (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Lerche *et al.*, 1999; Biervert und Steinlein, 1999; Lee *et al.*, 2000b; del Giudice *et al.*, 2000) und zwei Mutationen für *KCNQ3* identifiziert worden (Charlier *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2000). Bei den Mutationen handelt es sich im Wesentlichen um Spleißstellen- und Punktmutationen, Leserasterverschiebungen und Trunkationen. Eine Trunkation (Biervert *et al.*, 1998) und verschiedene Punktmutationen (Schroeder *et al.*, 1998) wurden heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert, wo keine der Mutanten Ströme lieferte. Es konnte jedoch bei Koexpression mit nicht-mutierten Untereinheiten kein dominant-negativer Effekt auf den Strom festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass der dominante Erbgang von BFNC auf Haploinsuffizienz zurückzuführen ist (Schroeder *et al.*, 1998). Die Mutationen führten zu einer Reduktion des *KCNQ2/3*-Stromes um 25 %. Diese geringe Reduktion ist offensichtlich ausreichend, um die neuronale Erregbarkeit in früher Kindheit soweit zu erhöhen, dass eine Epilepsie ausgelöst werden kann. Bisher sind keine dominant-negativen Mutationen in *KCNQ2* oder *KCNQ3* gefunden worden. Es ist zu vermuten, dass solche Mutationen zu einem erheblich schwereren Krankheitsbild führen würden (Schroeder *et al.*, 1998). Dies wird durch Studien an *KCNQ2*-defizienten Mäusen bestätigt, in denen die homozygote Deletion von *KCNQ2* unmittelbar nach der Geburt zum Tod führt, da die Tiere nicht atmen können (Watanabe *et al.*, 2000). Heterozygote Tiere hingegen entwickeln sich normal und weisen keine spontanen epileptischen Anfälle auf, sind jedoch anfälliger für Pharmaka-induzierte Krampfanfälle als WT-Tiere (Watanabe *et al.*, 2000).

1.8.5 KCNQ4

KCNQ4 wurde über seine Homologie zu *KCNQ3* kloniert (Kubisch *et al.*, 1999). Das Expressionsmuster von *KCNQ4* ist nicht so breit wie das der anderen KCNQ-Kanäle. So wird *KCNQ4*

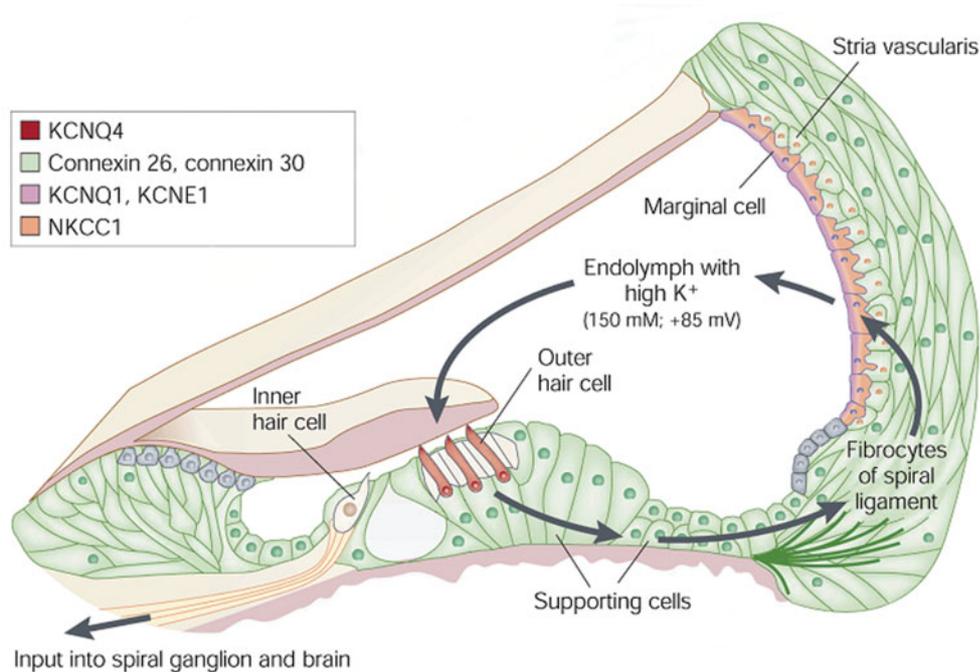


Abb. 1.3: Kalium-Recycling in der *Scala media* des Innenohrs. Die Endolymphe der *Scala media* weist eine hohe K⁺-Konzentration und ein positives Potential auf. Kalium wird von den Marginalzellen der *Stria vascularis* in die Endolymphe sezerniert. Daran sind Heteromere aus KCNQ1 und KCNE1 beteiligt. Kalium gelangt durch mechanosensitive Transduktionskanäle in die Haarzellen und verlässt die äußeren Haarzellen möglicherweise durch KCNQ4. Für die inneren Haarzellen ist noch kein Transportweg bekannt. Kalium wird durch die Stützzellen und Fibrozyten des spiralen Ligaments zurück zur *Stria vascularis* transportiert, wo es erneut sezerniert wird. Aus: Jentsch (2000).

lediglich im Innenohr und in bestimmten Nuklei und Trakten des Hirnstamms exprimiert (Kubisch *et al.*, 1999; Kharkovets *et al.*, 2000). KCNQ4 bildet homomere Kanäle, die langsam bei Depolarisation aktivieren (Kubisch *et al.*, 1999), und weist, wie KCNQ2 und KCNQ3, Charakteristika des M-Stroms auf. KCNQ4 kann mit KCNQ3 zu heteromeren Kanälen assoziieren, was die Aktivierungskinetik des Kanals beschleunigt und die Sensitivität zu den I_M-Blockern Linopirdin und XE991 erhöht (Kubisch *et al.*, 1999). Ob KCNQ3/4-Heteromere jedoch *in vivo* vorkommen, ist unklar.

Im Innenohr beschränkt sich die Expression auf die Typ 1 Vestibularzellen und das Cortische Organ (Abb. 1.3). Dabei ist jedoch umstritten, ob KCNQ4 im Cortischen Organ sowohl in inneren als auch in äußeren Haarzellen exprimiert wird (Beisel *et al.*, 2000), oder ob die Expression weitgehend auf die äußeren Haarzellen beschränkt ist (Kubisch *et al.*, 1999; Kharkovets *et al.*, 2000). Die äußeren und inneren Haarzellen bilden im Cortischen Organ drei

Reihen bzw. eine Reihe sensorischer Zellen, die sich vom basalen Ende der Cochlea (hohe Frequenzen) zum apikalen Ende der Cochlea (tiefe Frequenzen) erstrecken. Die inneren Haarzellen versorgen das Gehirn mit elektrischen Signalen, die das Hören vermitteln. Äußere Haarzellen dagegen leiten nicht viele Afferenzen an das Gehirn, sondern erhöhen die Sensitivität des Hörens durch Verstärkung der akustischen Vibrationen. Die apikalen Stereozilien der beiden Zelltypen werden als Antwort auf ein akustisches Signal verbogen, wodurch mechanosensitive Transduktionskanäle geöffnet werden. Der Einstrom von Kalium durch diese Kanäle depolarisiert die Haarzellen aufgrund eines ungewöhnlichen elektrochemischen Kaliumgradienten über der apikalen Membran der Haarzellen. Im Gegensatz zur Zusammensetzung der normalen Extrazellulärflüssigkeit weist die Endolymphe der *Scala media* eine außergewöhnlich hohe Kaliumkonzentration (ca. 150 mM) und ein positives Potential (+85 mV) auf (Abb. 1.3). Das liefert eine große Triebkraft für den Einstrom von Kaliumionen in die Haarzellen. Der elektrochemische Gradient wird durch Ionentransportprozesse in der *Stria vascularis* aufrechterhalten. Während die apikalen Membranen der Haarzellen also in der Endolymphe baden, haben die basolateralen Enden der Zellen Kontakt zur Perilymphe, die die übliche hohe Na^+ - und niedrige K^+ -Konzentrationen aufweist. Der elektrochemische Gradient ermöglicht also an der apikalen Seite der Haarzellen einen K^+ -Einstrom und auf der basolateralen Seite einen K^+ -Ausstrom. Dieser K^+ -Ausstrom wird möglicherweise von KCNQ4 vermittelt, der an der basolateralen Seite der äußeren Haarzellen lokalisiert wurde (Kharkovets *et al.*, 2000). Es wird daher vermutet, dass KCNQ4 mit dem $I_{\text{K,n}}$ -Strom (Housley und Ashmore, 1992) in äußeren Haarzellen der Cochlea identisch ist. $I_{\text{K,n}}$ vermittelt eine große Kaliumleitfähigkeit in Nähe des Ruhemembranpotentials äußerer Haarzellen und ist ab dem postnatalen Tag 8 (P8) in äußeren Haarzellen von Mäusen messbar (Marcotti und Kros, 1999). Immunhistochemisch lässt sich KCNQ4 ebenfalls ab dem Tag P8 in äußeren Haarzellen der Maus nachweisen (Kharkovets *et al.*, 2000). Sowohl $I_{\text{K,n}}$ als auch KCNQ4 sind durch die M-Strom-Blocker Linopirdin und XE991 inhibierbar. Allerdings weisen $I_{\text{K,n}}$ und KCNQ4 unterschiedliche Spannungsabhängigkeiten auf. Während $I_{\text{K,n}}$ bei Spannungen von -80 mV halbmaximal aktiviert ist (Marcotti und Kros, 1999), wird KCNQ4, bei heterologer Expression in *Xenopus* Oozyten, erst ab Spannungen um -10 mV halbmaximal aktiviert (Kubisch *et al.*, 1999).

Das *KCNQ4*-Gen ist auf Chromosom 1p34 lokalisiert (Kubisch *et al.*, 1999). In diesem Bereich befindet sich ein Locus für eine Form dominant vererbbarer Taubheit, DFNA2 (Coucke *et al.*, 1994). Inzwischen sind sieben *KCNQ4*-Mutationen bekannt, die zu DFNA2 führen (Kubisch *et al.*, 1999; Coucke *et al.*, 1999; Talebizadeh *et al.*, 1999; Akita *et al.*, 2001; Van Hauwe *et al.*, 1999a). DFNA2 ist eine nicht-syndromische progrediente Ertaubung, die in der 2.-3. Lebensdekade mit einer Schwerhörigkeit bei hohen Frequenzen beginnt und innerhalb von zehn Jahren zu einer absoluten Taubheit führt. Die meisten der bisher bekannten *KCNQ4*-Mutationen üben einen dominant-negativen Effekt aus. Kubisch *et al.* (1999) fanden eine Punktmutation in der Porenregion des KCNQ4-Kanals, die die in allen betroffenen Mitgliedern einer Familie vorhanden war. Die Mutation ersetzte ein Glyzin im hochkonservierten GYG-Motiv der Pore zu Serin (G285S). In heterologer Expression in *Xenopus* Oozyten ergab der mutierte KCNQ4-Kanal keinen Strom, übte einen starken dominant-negativen Effekt auf den WT-Kanal aus und

reduzierte den Strom um ca. 90 % (Kubisch *et al.*, 1999). Der Pathomechanismus der Taubheit ist jedoch ungeklärt. Der langsame Hörverlust deutet an, dass KCNQ4-Ströme nicht für den Hörprozess an sich wichtig sind, sondern dass dem Hörverlust möglicherweise ein langsamer degenerativer Prozess zugrunde liegt. Der Verlust von KCNQ4 an der basalen Seite der äußeren Haarzellen könnte zu einer chronischen Überladung der Zellen mit Kalium führen, was deren langsame Degeneration zur Folge haben könnte.

KCNQ4 ist außerdem in einigen Nuklei des zentralen auditorischen Verarbeitungsweges im Hirnstamm exprimiert, z. B. dem anteroventralen cochlearen Nukleus und der lateralen superioren Olive. KCNQ4 kommt zusätzlich in einigen weiteren Kerngebieten vor, die bei der auditorischen Verarbeitung keine Rolle spielen. Inwieweit die Expression im auditorischen Verarbeitungsweg zur progredienten Ertaubung der Patienten beiträgt, ist unbekannt.

1.8.6 KCNQ5

KCNQ5 wurde durch seine Homologie zu den anderen KCNQ-Kanälen kloniert (Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000a). Dieser Kanal weist eine breite Expression im Gehirn auf. Er vermittelt langsam aktivierende und deaktivierende Kaliumauswärtsströme, die ähnliche Kinetiken wie der neuronale M-Strom (s. 1.8.4) aufweisen (Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000a). KCNQ5 kann mit KCNQ3 *in vitro* heteromere Kanäle bilden, die ebenfalls Eigenschaften des I_M haben. Anders als die anderen KCNQ-Gene wird KCNQ5 stark im Skelettmuskel exprimiert (Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000a) (Tabelle 1.2). Dort kommt vor allem eine Spleißvariante von KCNQ5 vor, die ein zusätzliches Exon im C-Terminus aufweist, die das Schalten des Kanals so ändert, dass keine Ähnlichkeit mehr zum neuronalen M-Strom besteht (Schroeder *et al.*, 2000b). *KCNQ5* liegt auf Chromosom 6q14, wo sich mehrere Loci für retinale Erkrankungen befinden. Bis jetzt wurde KCNQ5 jedoch noch mit keiner Erbkrankheit assoziiert.

1.9 Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es, KCNQ-Kanäle und ihre β -Untereinheiten zu charakterisieren. In einem ersten Projekt wurde die Interaktion von KCNQ1 und seinen β -Untereinheiten im Gastrointestinalsystem untersucht. Im Dünn- und Dickdarm assoziiert KCNQ1 vermutlich mit KCNE3, einem Mitglied der KCNE-Familie von Kaliumkanal- β -Untereinheiten. Heteromere aus KCNQ1 und KCNE3 vermitteln einen Strom, der eine lineare Spannungsabhängigkeit aufweist, durch cAMP aktivierbar und zeitunabhängig ist (Schroeder *et al.*, 2000b). Diese Eigenschaften legen die Vermutung nahe, dass KCNQ1 und KCNE3 zusammen für den transepithelialen Chloridtransport in Kryptenzellen des Dünndarms und des Dickdarms verantwortlich sind. Dabei werden basolateral über einen Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter (NKCC-1) je ein Kalium und ein Natriumion sowie zwei Chloridionen in die Zelle transportiert. Na^+ wird über die Na^+/K^+ -ATPase wieder aus der Zelle heraustransportiert, und Cl^- verlässt die Zelle über CFTR, einen mit cAMP aktivierbaren Chloridkanal. K^+ wird durch

einen, beim Ruhepotential offenen Kaliumkanal recycelt, der vermutlich von Heteromeren aus KCNQ1 und KCNE3 gebildet wird (Schroeder *et al.*, 2000b; Devor *et al.*, 1997; Greger *et al.*, 1997; MacVinish *et al.*, 1998; Mall *et al.*, 1998; Warth *et al.*, 1996). Diese putative Funktion von KCNQ1 und KCNE3 erfordert eine basolaterale Lokalisation der heteromeren Kanäle. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten Antikörper gegen KCNQ1 und KCNE3 generiert und zum immunhistochemischen Nachweis der Kanäle im Gastrointestinalsystem der Maus verwendet werden. Da KCNQ1 auch im Magen exprimiert wird, sollte mittels Northern Blot, *in situ* Hybridisierung und Antikörperstudie untersucht werden, ob KCNQ1 auch im Magen mit einer β -Untereinheit der KCNE-Familie assoziiert ist. Falls dies der Fall war, sollte die Untereinheit identifiziert und ihre Interaktion mit KCNQ1 elektrophysiologisch untersucht werden.

In einem zweiten Projekt wurde eine Mutation in KCNQ2 untersucht. Mutationen in diesem Kaliumkanal und in KCNQ3 verursachen eine idiopathische, dominant vererbte Epilepsie bei Neugeborenen (BFNC). Alle bisher bekannten Mutationen (Trunkationen, Spleißstellen- und Punktmutationen, Leserasterverschiebungen) führten *in vitro* zu einer Reduktion des Strom um ca. 25 % in heteromeren Kanälen aus KCNQ2 und KCNQ3 (Schroeder *et al.*, 1998), so dass der autosomal dominante Erbgang der Erkrankung vermutlich auf eine Haploinsuffizienz zurückzuführen ist. Von Dr. Steinlein (Humangenetik, Universität Bonn) wurde eine deutsche Familie gefunden, deren Mitglieder nicht nur an BFNC, sondern auch, bis ins Erwachsenenalter, an Myokymie leiden. Myokymie ist eine Erkrankung, die durch spontane, unwillkürliche Kontraktionen von Muskelfasergruppen charakterisiert ist und auf Störungen im peripheren oder zentralen Nervensystem zurückgeführt werden kann. Mitglieder der betroffenen Familie sollten auf eine Mutation im *KCNQ2*-Gen untersucht werden. Wurde eine Mutation gefunden, sollte sie *in vitro* in *KCNQ2* eingebaut und der Strom des mutierten Kanals sowohl allein als auch in Koexpression mit KCNQ3 elektrophysiologisch charakterisiert werden. Da die Myokymie eventuell einen peripheren Ursprung hatte, war zu untersuchen, ob KCNQ2 und KCNQ3 im Rückenmark exprimiert werden.

In einem dritten Projekt wurden Mausmodelle für DFNA2 untersucht. DFNA2 ist eine progrediente Ertaubung, die durch Mutationen in KCNQ4 verursacht wird, bei den Betroffenen mit einer Schwerhörigkeit bei hohen Frequenzen beginnt und innerhalb von zehn Jahren nach Krankheitsbeginn zu einer absoluten Taubheit führt (Kubisch *et al.*, 1999). Der genaue Pathomechanismus der Ertaubung ist ungeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass der Verlust von KCNQ4 in den äußeren Haarzellen zu einem verringerten basalen Efflux von K^+ führt, das durch apikale mechanosensitive Kanäle in die Zelle gelangt. Daraus könnte eine Überladung mit K^+ resultieren, die schließlich zur Degeneration der Zellen führt (Kharkovets *et al.*, 2000; Jentsch, 2000). Um den Pathomechanismus der Ertaubung aufzuklären, wurden von Tatjana Kharkovets verschiedene Mausmodelle für DFNA2 generiert. Dabei handelt es sich erstens um eine KCNQ4-defiziente Maus (*KCNQ4*^{-/-}), bei der die Exone 6–8 von *KCNQ4* deletiert wurden. Die Deletion führte zu einem Verlust der Porenregion, des 6. Transmembransegments und einem Bereich des angrenzenden C-Terminus. Zweitens wurde eine transgene Maus mit einer dominant-negativen Mutation (G285S) in der Pore des KCNQ4-Proteins hergestellt, um

ein Mausmodell zu generieren, das direkt der menschlichen Mutation entspricht. Zunächst sollten Messungen am auditorischen Hirnstamm durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob und mit welchem zeitlichen Verlauf die generierten Mausmodelle ertauben. Da KCNQ4 in den basolateralen Membranen äußerer Haarzellen exprimiert wird und dort vermutlich den $I_{K,n}$ -Strom vermittelt, der zum Ruhestrom der äußeren Haarzellen beiträgt (Housley und Ashmore, 1992; Marcotti und Kros, 1999), sollte mit Hilfe der *Patch clamp* Technik untersucht werden, ob sich die Kaliumleitfähigkeiten von WT-Mäusen und den Mausmodellen für DF-NA2 unterscheiden. Außerdem sollte in diesen Zellen das Ruhemembranpotential gemessen werden, um zu überprüfen, ob eine KCNQ4-Defizienz Auswirkungen auf das Ruhemembranpotential der Zellen hat. Beisel *et al.* (2000) detektierten, im Gegensatz zu Kharkovets *et al.* (2000), KCNQ4 nicht nur in den äußeren Haarzellen, sondern auch in den inneren Haarzellen des Cortischen Organs. Daher sollten auch die Kaliumleitfähigkeiten der inneren Haarzellen mit der *Patch clamp* Technik untersucht werden. Ebenso sollte das Ruhemembranpotential der Zellen gemessen werden und für WT-Mäuse und KCNQ4-defiziente Tiere verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Falls nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien der Firmen Biorad (Hercules, USA), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelzen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in der Qualität *reinst* oder *p.A.* verwendet. Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden von New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) bezogen, einzelne Enzyme auch von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Life Technologies (Karlsruhe). Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) oder Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Radioaktive Nukleotide wurden von den Firmen Amersham Buchler (Braunschweig) und DuPont (Boston, USA) bezogen.

2.2 Filme und bildgebende Verfahren

Die Dokumentation von Agarosegelen erfolgte mit einem Digitalvideosystem der Firma Intas (Göttingen). Zur Autoradiographie wurden Kodak X-Omat MS (Kodak, Frankfurt a. M.) Röntgenfilme oder ein PhosphoImager BAS-1500 in Verbindung mit TINA 2.1 Software (FUJI/Raytest, Staubenhardt) verwendet. Chemolumineszenz wurde mittels X-Omat Blue XB-1 Filmen (Kodak) dargestellt. Für histologische Schwarzweiß-Aufnahmen wurden AGFA APX 100 oder Ilford PAN-F 50 Filme (Ilford, Dreieich), für Farbaufnahmen Kodak Elite-100 Filme eingesetzt. Die Schwarzweiß-Bilder wurden auf Ilford Fotopapier mit AGFA Entwickler entwickelt und zur späteren Verarbeitung mit einem UMAX 2000 Scanner digitalisiert. Farbdias wurden mit einem Nikon Scanner digitalisiert. Die Nachbearbeitung der digitalisierten Bilder erfolgte mit Photoshop 6.0 (Adobe) und Freehand 8.0 (Macromedia) oder Illustrator 9.0 (Adobe).

2.3 Puffer, Lösungen und Medien

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden soweit nicht anders angegeben in bidestilliertem H₂O (ddH₂O) angesetzt.

10x MOPS: 2 M Morpholinopropansulfonsäure; 0,5 M Natriumazetat; 0,01 M EDTA; pH 7; angesetzt in H₂O/DEPC.

20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumzitat; pH 7 (HCl).

20x SSPE: 3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,02 M EDTA; pH 7,4 (NaOH).

Badlösung (Haarzellen): 144 mM NaCl; 5,8 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 0,9 mM MgCl₂; 0,7 mM NaH₂PO₄; 5,6 mM Glukose; 10 mM HEPES; pH 7,3 (NaOH).

Badlösung (HEK-Zellen): 130 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; pH 7,4 (NaOH).

Blocklösung (Antikörperaufreinigung): 50 mM Cystein in Kopplungspuffer.

Blocklösung (Gefrierschnitte): 2 % (v/v) BSA; 3 % (v/v) Ziegenserum; 0,5 % (v/v) NP-40 in PBS.

Blocklösung (Immunfluoreszenz): 10 % (v/v) Serum; 0,2 % (w/v) BSA; 0,3 % (v/v) TritonX-100 in PBS.

DNA-Ladepuffer: 50 % (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Xylenzyanol in H₂O/DEPC.

Elutionslösung (Antikörperaufreinigung): 100 mM Glyzin; pH 2,5.

H₂O/DEPC: 0,5 ml Diethylpyrokarbonat in ddH₂O o/n bei 37 °C inkubieren, anschließend autoklavieren.

Hochsalz-PBS: 0,64 M NaCl; 0,4 g KCl; 0,06 g Na₂HPO₄; 0,06 g KH₂PO₄; 0,35 g NaHCO₃; 1 g Glukose; pH 7,4.

HybMix: 10 ml 4x SSC; 50 % Formamid; 1x Denhardts Lösung (Denhardt, 1966); 5 % (w/v) Dextransulfat; 0,5 mg/ml ssDNA (denaturierte Heringsspermien-DNA); 0,25 mg/ml Hefe-tRNA.

Kopplungspuffer (Antikörperaufreinigung): 50 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; pH 8,5.

LB-Agar: LB-Medium + 15 g/l Agar.

LB/Amp-Agar: LB-Agar + 150 mg/l Ampizillin.

LB/Amp-Medium: LB-Medium + 150 mg/l Ampizillin.

LB-Medium: 10 g/l Bakto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7,2.

Lysis-Puffer: 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; 1 % Triton-X100; pH 7,6 (NaOH); 4 mM Pefa-Block (Roche); 1x Complete-Protease-Inhibitor (Roche).

Modifizierte Barth-Lösung: 88 mM NaCl; 2,4 mM NaHCO₃; 1 mM KCl; 0,41 mM CaCl₂; 0,33 mM Ca(NO₃)₂; 0,82 mM MgSO₄; 10 mM HEPES; pH 7,6 (NaOH); ergänzt mit 100 µg/ml Gentamyzin und 50 µg/ml Tetrazyklin.

ND96: 96 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; pH 7,4 (NaOH).

Neutralisationspuffer (Antikörperaufreinigung): 1 M Tris-HCl; 2 M NaCl; pH 8,5.

Northern-Hybridisierungspuffer: 7 % SDS; 10 % (v/v) PEG-6 000; 1,5x SSPE; 0,12 mg/ml Lachs-Sperma-DNA.

Northern-Waschpuffer I: 2x SSC; 0,05 % (w/v) SDS.

Northern-Waschpuffer II: 0,1x SSC; 0,1 % (w/v) SDS.

OR-2: 80–100 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; pH 7,4 (NaOH).

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4.

Pipettenlösung (Haarzellen): 135 mM KCl; 3,5 mM MgCl₂; 0,1 mM CaCl₂; 2,5 mM Na₂-ATP; 5 mM EGTA-KOH; 5 mM HEPES; pH 7,3 (KOH).

Pipettenlösung (HEK-Zellen): 135 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 2 mM EGTA-KOH; 5 mM HEPES; pH 7,4 (KOH).

PLP-Fixans: 2 % (w/v) Paraformaldehyd; 75 mM Lysin; 10 mM Periodsäure in 0,5x PBS, pH 7,4 (NaOH).

Präparationslösung (Haarzellen): 144 mM NaCl; 5,8 mM KCl; 0,1 mM CaCl₂; 2,1 mM MgCl₂; 0,7 mM NaH₂PO₄; 5,6 mM Glukose; 10 mM HEPES; pH 7,3 (NaOH).

Protein-Ladepuffer (3x konz.): 150 mM Tris-HCl; 6 % (w/v) SDS; 0,3 % (w/v) Bromphenol-blau; 30 % Glycerol. Vor Western Blot Addition von 6 % (v/v) Mercaptoethanol.

RNAse-A-Puffer: 25 ml 5 M NaCl; 2,5 ml 1 M Tris; 500 µl 0,5 M EDTA; 500 µl RNAse A (Stock 10 mg/ml; Roche) ad 250 ml H₂O.

SOC-Medium: 20 g/l Baktopenon; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glukose; pH 7 (NaOH).

Speed-Hyb2: 7 % SDS (w/v); 10 % Polyethylenglykol 6000 (w/v); 1,5x SSPE.

TAE: 40 mM Tris-Azetat; 1 mM Na₂-EDTA; pH 8,0.

TBS: 25 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4.

TE: 10 mM Tris-HCl; 1 mM Na₂-EDTA; pH 8,0.

Western-Blocklösung: 5 % (w/v) Magermilchpulver; 0,2 % (v/v) NP-40; in TBS.

Western-Laufpuffer: 25 mM Tris (Base); 190 mM Glyzin; 0,1 % (w/v) SDS.

Western-Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl; 200 mM Glyzin; pH 8,3 (HCl); 20 % (v/v) Methanol.

Western-Waschpuffer: 0,1 % (v/v) NP-40 in TBS.

2.4 Bakterienstämme

Es wurde folgender Abkömmling des *Escherichia coli* K12 Sicherheitsstammes verwendet:

XL-1 Blue: *supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46thi, relA1, lac⁻*

Sofern nicht anders angegeben wurden die Bakterien bei 37 °C in LB/Amp-Medium oder auf LB/Amp-Agar kultiviert. Teilweise wurden dem LB/Amp-Medium 10 mM Glukose hinzugefügt.

2.5 Vektoren

pBluescript KS⁺/KS⁻: Ein Klonierungsvektor der Firma Stratagene (Heidelberg) zur Propagation in *E. coli*. Der Vektor enthält eine multiple Klonierungskassette, die von einem T3- und T7-Promotor zur cRNA-Synthese flankiert wird, ein *LacZ*-Gen und eine Ampizillinresistenz.

pcDNA3.1: Ein Expressionsvektor für Säugerkulturzellen der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Das zu exprimierende Gen steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Der Vektor enthält einen Polylinker, einen T3- und T7-Promotor zur cRNA-Synthese, ein *LacZ*-Gen und eine Ampizillin- sowie Neomycinresistenz.

pTLN: Es handelt sich um einen Expressionsvektor für *Xenopus laevis* Oozyten, der sich von pSP64 (Krieg und Melton, 1984) ableitet. Er ist durch Modifikation der multiplen Klonierungskassette entstanden (Lorenz *et al.*, 1996), und enthält zur Expressionssteigerung die 3'- und 5'-untranslatierte Region des *Xenopus laevis* β -Globingens. Hinter der 3'-untranslatierten Region wurden Linearisierungsschnittstellen eingefügt.

2.6 Eukaryontische Kulturzellen

HEK293: Diese permanente Zelllinie leitet sich von einer humanen, embryonalen Nierenzelle ab, die durch Transformation des humanen Adenovirus Typ5 etabliert wurde. Die von den HEK293 Zellen exprimierten adenoviralen Proteine erlauben eine Transkription vom CMV-Promotor (z. B. vom pcDNA3.1-Plasmid) (Graham *et al.*, 1977). Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, Streptomycin (100 μ g/ml) und Penizillin (100 U/ml) kultiviert.

COS-7: Von einer Affennierenzelle abgeleitete Fibroblasten-Zelllinie, die durch Transformation mit einer Variante des Affenvirus SV40 entstanden ist und das SV40 *large T* Antigen exprimiert (Gluzman, 1981). Das ermöglicht die Replikation von Plasmiden, die den SV40-Replikationsursprung tragen. Die Zellen wurden wie HEK293-Zellen kultiviert.

CHO-K1: Diese permanente Zelllinie leitet sich von der Ovarzelle eines adulten Chinesischen Hamsters ab (Puck *et al.*, 1958) und weist eine fibroblastenähnliche Morphologie auf. Die Zellen wurden in HAM-12 mit 10 % FCS, Streptomycin (100 µg/ml) und Penizillin (100 U/ml) kultiviert.

2.7 DNA- und RNA-Techniken

2.7.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Volumen von 30–50 µl. Puffermenge, Zugabe von BSA, Temperatur und Dauer der Restriktion richteten sich nach den Angaben des Restriktionsenzym-Herstellers. In der Regel wurden pro µg DNA 3 U des Restriktionsenzym eingesetzt und die Ansätze mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Um die Selbstligation von Vektoren nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, wurde dem Reaktionsansatz nach der Restriktion 1 U Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer) zugesetzt und für weitere 30 min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt, und die DNA-Fragmente durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Trennung von DNA-Fragmenten wurden 0,6–1,8 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer diente TAE. Zur Anfärbung der DNA wurde den Gelen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml zugesetzt. Die DNA wurde vor dem Beladen mit 10 % DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte mit einer Feldstärke von 5–10 V/cm. Als Größenstandard wurde eine 1 kB-Leiter von Life Technologies verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator analysiert und die DNA-Banden gegebenenfalls mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) wurde die DNA nach Vorgaben des Herstellers aus der Gelmatrix isoliert.

2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in einem Volumen von 10 µl mit T4-Ligase nach Herstellerangaben ligiert. Dabei wurden der Vektor und das zu ligierende Fragment im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder 3–6 h bei RT oder 17–24 h bei 17 °C.

2.7.4 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Die Transformation von Bakterien (XL-1 Blue) mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation mit einem Genepulser (Biorad). Elektrokompente Zelle wurden nach Ausubel *et al.* (1991) hergestellt und bei –80 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden 1 µl eines Ligationsansatzes mit 50 µl frisch aufgetauter Bakteriensuspension vermischt und in eine, auf Eis vorgekühlte,

Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2 500 V, 400 W und 25 mF mit einer Pulsdauer von ca. 7,5 ms. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml SOC Medium aufgenommen und 30–60 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf LB/Amp-Agar Platten ausgestrichen wurden. Die Platten wurden für etwa 16 h bei 37 °C inkubiert, bis sich gut sichtbare Kolonien gebildet hatten. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Bakterien einer Kolonie in 15–100 ml LB/Amp-Medium überimpft. Nach 14–20 h Inkubation bei 37 °C wurde die DNA mittels Mini- oder Midipräparation aus den Bakterien isoliert.

2.7.5 Isolation von DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde aus Bakterien mittels alkalischer Lyse isoliert. Kleinere Mengen DNA aus 15 ml Kulturen wurden durch eine Minipräparation gewonnen. Dazu wurde das E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II von Peqlab (Erlangen) nach Angaben des Herstellers benutzt, mit dem bis zu 70 µg DNA gewonnen werden konnten. Für größere Mengen DNA wurden Midisäulen der Firma Genomed (Jetstar) eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. Aus 100 ml Kulturen konnten bis zu 500 µg DNA isoliert werden.

2.7.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen von DNA erfolgten nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurde in der Regel 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Länge der Sequenzierprimer lag zwischen 18 und 24 Basen. Als Terminatoren wurden fluoreszenzfarbstoffmarkierte 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphate des AmpliTaq Sequenzierungsmixes (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers benutzt. Die Auswertung der Fragmente erfolgte mit einem automatischen Sequenzanalysegerät des Typs ABI 310 (Applied Biosystems) oder wurde in der Service-Einheit des ZMNH mit Hilfe eines ABI 377 (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.7.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen (Saiki *et al.*, 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR vor allem zur gerichteten *in vitro* Mutagenese sowie zur Klonierung von Sonden für Northern Blots verwendet. Als Primer dienten Oligonukleotide mit einer Länge von 18–30 Basenpaaren. Sie wurden nach Möglichkeit so gewählt, dass an ihren 3'-Enden zwei Pyrimidine lagen und der Guanin/Cytosin-Gehalt bei ca. 40–60 % lag. Um Fehlerraten bei der PCR möglichst gering zu halten, wurde zur *in vitro* Mutagenese die *Pfu* Polymerase (Stratagene) verwendet, die eine 3'-Exonuklease-Aktivität und eine niedrige Prozessivität aufweist. Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

2 μ l	Primer1 (10 μ M)
2 μ l	Primer2 (10 μ M)
100 ng	cDNA
3-5 μ l	dNTP (2,5 mM je Nukleotid)
5 μ l	10x Reaktionspuffer
0,5-0,75 μ l	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase
ad 50 μ l	H ₂ O

Eventuell wurden dem Reaktionsansatz 1-2 μ l DMSO zugesetzt, um die Hybridisierungstemperatur der Primer herabzusetzen. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Template-DNA. Die PCR erfolgte bei *in vitro* Mutagenese in Thermozyklern der Firma Biometra (Göttingen). Ein typisches Temperaturprofil sah folgendermaßen aus:

1. Denaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	50 s
3. Hybridisierung	54 °C	50 s
4. Elongation	72 °C	1-2 min
5. Elongation	72 °C	5 min
6. Kühlung	10 °C	∞

Die Schritte 2-4 wurden als Schleifen 25-30fach wiederholt, bevor sich die Schritte 5 und 6 anschlossen. Je nach Länge und Schmelztemperatur der verwendeten Primer wurde die Hybridisierungstemperatur angepasst. Die Elongationsdauer richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Nach der Reaktion wurden die erhaltenen Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Bei PCR mit genomischer DNA als Template wurde die *Taq* DNA-Polymerase (Boehringer) verwendet und die Reaktion in GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) Thermozyklern durchgeführt. Dabei wurde die Elongationstemperatur auf 72 °C herabgesetzt und die Elongationsdauer verkürzt, da die *Taq* Polymerase ca. 1 000 bp/min synthetisiert, während die *Pfu* Polymerase nur 500 bp/min einbaut.

2.7.8 Einführung von Punktmutationen in cDNA durch rekombinante PCR

Punktmutationen wurden mit Hilfe der rekombinanten PCR (Higuchi *et al.*, 1988; Herlitze und Koenen, 1990) in cDNAs eingeführt. Das Prinzip dieser Methode verdeutlicht Abb. 2.1. In zwei getrennten PCR-Ansätzen wurden Sequenzabschnitte im 3'- und 5'-Bereich der Ziel-Position mit Hilfe von flankierenden Primern amplifiziert. Die Punktmutation war als Basenfehlpaarung in den inneren Primern (Mutagenese-Primern) enthalten, die zueinander komplementär waren. Beiderseits der Basenfehlpaarung sorgten ca. 10-12 Basenpaare für eine gute Primerbindung. Die in den beiden ersten PCR entstandenen Reaktionsprodukte wurden über

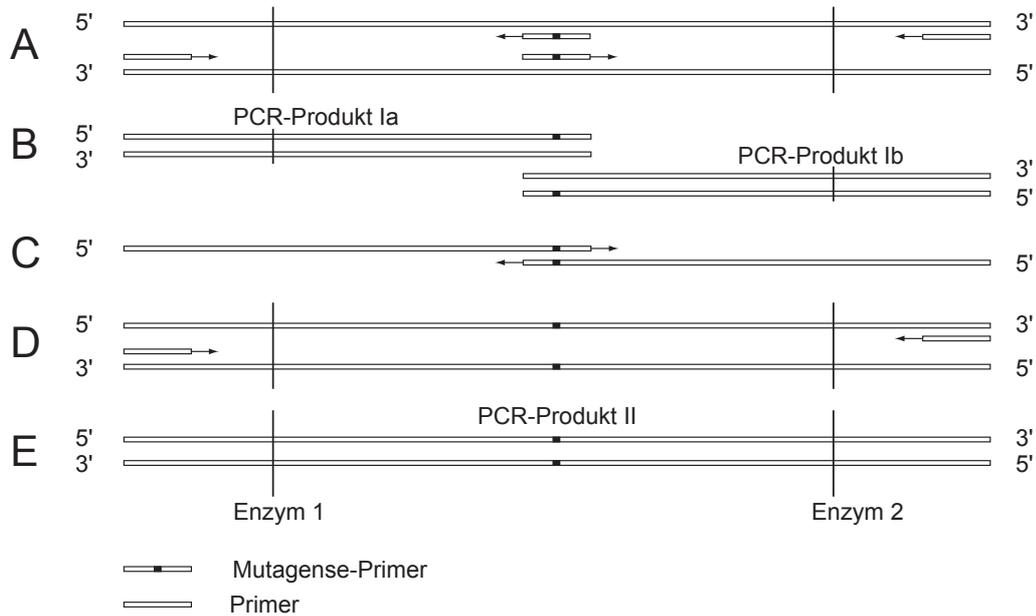


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der gerichteten *in vitro* Mutagenese durch zweifach rekombinante PCR. (A) In zwei separaten PCR-Ansätzen werden überlappende Sequenzabschnitte mit jeweils einem genspezifischen und einem Mutagenese-Primer amplifiziert. (C) In einer dritten PCR-Reaktion binden die beiden entstandenen Fragmente (B) im überlappenden Bereich und werden verlängert. So entstehen rekombinierte Fragmente, die in derselben Reaktion durch die genspezifischen Primer aus (A) amplifiziert werden (D). (E) Nach der PCR wird das entstandene DNA-Fragment mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten, um es in einen Expressionsvektor zu ligieren.

Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und in einer weiteren PCR als Template eingesetzt. In dieser Reaktion wurden die PCR-Produkte (Ia und b) durch die Überlappung im Bereich der Punktmutation zunächst verlängert und dann mit Hilfe der eingesetzten flankierenden Primer amplifiziert. Das PCR-Produkt (II) wurde nach der Aufreinigung mit zwei geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, um es in einen entsprechend geschnittenen Expressionsvektor zu ligieren. Nach Ligation und Transformation in Bakterien wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt und die Sequenz des mutierten DNA-Abschnitts durch Sequenzierung überprüft.

2.7.9 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die als Sonde verwendete DNA wurde entweder mittels Restriktionsspaltung aus Plasmiden gewonnen oder direkt durch eine PCR auf cDNA amplifiziert. Die so erhaltenen und aufgereinigten DNA-Fragmente hatten eine Länge von 250–500 bp. 5–25 ng des zu markierenden DNA-Fragments wurden in 45 μ l TE-Puffer verdünnt, 10 min bei 95 °C denaturiert und an-

schließlich 5 min im Eisbad abgekühlt. Das Fragment wurde zu frisch in ddH₂O resuspendiertem RediprimeII-Ansatz (Amersham Pharmacia, Freiburg) gegeben und mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP 30 min bei 37 °C inkubiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden über Quickspin G-50 Sephadex Gelfiltrationssäulen (Boehringer) abgetrennt. Vor der Verwendung in einem Hybridisierungsmix wurde die Sonde 3 min bei 95 °C denaturiert.

2.7.10 Isolierung von Total-RNA aus Gewebe

Die Total-RNA wurde mit Trizol (Life Technologies) nach Herstellerangaben aus Geweben des Gastrointestinaltraktes gewonnen und für eine Northern Blot Analyse verwendet.

2.7.11 Northern Blot

Der Northern Blot wurde nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Alle wässrigen Lösungen (mit Ausnahme der Tris-Puffer) wurden mit H₂O/DEPC angesetzt und autoklaviert. Alle Gefäße wurden einer RNase-Dekontamination unterzogen. Für die denaturierende Gelelektrophorese von Total-RNA wurde ein 1 g Agarose in 71 ml H₂O gelöst und auf 60 °C abgekühlt. Vor dem Gießen wurden 10 ml 10x MOPS-Puffer und 19 ml Formaldehyd hinzugefügt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer, die Feldstärke betrug 5 V/cm. Es wurden je 25 μg Total-RNA pro Spur und ein RNA-Standard (Life Technologies) aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 2 min in H₂O/DEPC inkubiert und anschließend 20 min in 20x SSC equilibriert. Für den Transfer mittels Kapillarblot wurde eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Pharmacia) gewählt, die ebenfalls kurz in H₂O/DEPC inkubiert und in 20x SSC equilibriert wurde. Als Transfermedium diente 20x SSC. Nach dem Transfer (o/n) wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA mit UV-Licht auf der Membran fixiert. Die Nylonmembran wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe bei 60 °C o/n in Hybridisierungspuffer hybridisiert und anschließend mit Northern-Waschpuffer gewaschen. Die Detektion des radioaktiven Signals erfolgte mit einem PhosphoImager Bas-1500 (Fuji/Raytest). Als Kontrolle für gleiche RNA-Lademengen diente eine β -Aktin-Sonde.

2.7.12 Herstellung von cRNA

Für die Herstellung von RNA zur Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten wurde das SP6-mMessage mMachine Kit (Ambion, Huntingdon, UK) nach Herstellerangaben verwendet. Standardmäßig befand sich die zu transkribierende Sequenz im pTLN-Vektor, der vor der *in vitro* Transkription linearisiert, über das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt und in H₂O/DEPC aufgenommen wurde. Die Konzentration der synthetisierten cRNA wurde mit einem Genequant-Photometer (Amersham Pharmacia) gemessen und ihre Qualität mit einem 1%igen Agarosegel überprüft. Mit H₂O/DEPC wurde die Konzentration der cRNA auf 100–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt.

2.7.13 Herstellung radioaktiv-markierter RNA-Sonden

Zur Herstellung radioaktiv markierter *sense*- und *antisense*-Sonden für die *in situ* Hybridisierung wurden die T3- und T7-MAXIscript Kits (Ambion) verwendet. Standardmäßig befanden sich die Proben im pBluescript KS⁺-Vektor, der vor der *in vitro* Transkription linearisiert, über eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Präzipitation aufgereinigt und in TE-Puffer aufgenommen wurde. Während der Transkription wurde ³⁵S-UTP in die RNA-Sonde eingebaut, die anschließend über Sephadex G-50 Gelfiltrationssäulen (Boehringer, Mannheim) aufgereinigt und in 10 µl 1 M DTT, 10 µl 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und 5 µl t-RNA aufgenommen wurde. Nach einer Ethanol-Präzipitation wurde die Probe in HybMix aufgenommen, die Konzentration in einem Szintillationsmessgerät (Beckmann, München) gemessen und mit HybMix auf 1 000–5 000 counts/µl eingestellt.

2.7.14 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Der verwendete Vektor wurde wie zur Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden behandelt. Zur Transkription von *sense*- und *antisense*-Proben mit dem T7- und SP6-MAXIscript Kit (Ambion) wurde Digoxigenin-UTP (Roche) verwendet. Die Aufnahme der Probe in Hybridisierungslösung und anschließende *in situ* Hybridisierung erfolgte wie beschrieben (Hartmann *et al.*, 1995).

2.7.15 *In situ* Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Zur *in situ* Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurden Gefrierschnitte vom Rückenmark der Maus verwendet. Hierzu wurde das Rückenmark aus dem Wirbelkanal präpariert und auf Trockeneis in Kryotek eingebettet. Am Kryostaten wurden 8–16 µm dicke Schnitte hergestellt. Nach der Trocknung wurden die Schnitte 2–3 min in 0,1x TAE-Puffer (pH 8) inkubiert und anschließend mit 350 µl Essigsäureanhydrid für 10 min azetyliert. Es folgte eine Entwässerung der Schnitte in einer Ethanolreihe (30, 50, 70, 96, 100 %). Nach Trocknung der Schnitte wurden 50–70 µl Hybridisierungsprobe auf die Schnitte aufgetragen und Deckgläschen mit DPX (Sigma) auf die Schnitte geklebt. Nach 18–24 h Inkubation bei 55 °C wurde das DPX abgezogen, die Schnitte mit Deckgläschen in 4x SSC inkubiert und für 15–20 min bei RT geschüttelt, bis sich die Deckgläschen von den Schnitten lösten. Anschließend wurden die Schnitte 3x mit 4x SSC gewaschen und 30 min bei 37 °C in vorgewärmtem RNase A-Puffer inkubiert. Es folgte eine Waschreihe mit 2x SSC, 1x SSC und 0,5x SSC für je 10–20 min bei RT, 0,1x SSC für je 30 min bei 55 °C und bei RT. Anschließend wurden die Schnitte erneut in einer Ethanolreihe entwässert und nach dem Trocknen ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach Auswertung des Röntgenfilms wurden die Schnitte für 2–4 Wochen in NTB-3 Fotoemulsion (Mediatech, Norderstedt) gedippt, anschließend entwickelt und mit Giemsa (Sigma) gefärbt.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Transiente Transfektion von Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden unter 5 % CO₂ bei 37 °C in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert (Heraeus-Inkubatoren, Hanau). Medien und Lösungen wurden vor der Benutzung auf 37 °C erwärmt. HEK293 oder CHO-K1-Zellen wurden mit Lipofectamin (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers transfiziert, sobald die Zellen 50–80 % konfluent waren. Drei bis vier Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch das entsprechende Kulturmedium ersetzt. Für die Immunfluoreszenz wurden bis zu 2 µg cDNA pro 6 cm-Kulturschale eingesetzt. Zellen für *Patch clamp* Messungen wurden entweder mit *KCNQ1* allein oder mit *KCNQ1* und *KCNE2* transfiziert. Beide Konstrukte waren in den pcDNA3.1-Vektor kloniert worden. Um transfizierte Zellen zu identifizieren, wurde ein *pEGFP*-Konstrukt kotransfiziert, das für ein grünes Fluoreszenzprotein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* codiert (Prasher *et al.*, 1992). Das Verhältnis von *pEGFP* zu Kanal-cDNA betrug 1:2, bei 2 µg cDNA pro 6-cm Kulturschale.

2.8.2 Herstellung eines Zelllysats aus HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen wurden 24–48 h nach der transienten Transfektion auf 4 °C gekühlt und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 200 µl kaltem 1x Protein-Ladepuffer, ergänzt mit 4 mM Pefa-Block und 1x Complete-Protease-Inhibitor, vom Schalenuntergrund geschabt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde kurz mit Ultraschall behandelt und bei –20 °C bis zur SDS-PAGE aufbewahrt.

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 Oberflächenbiotinylierung von *Xenopus laevis* Oozyten

Bei dieser Methode bindet Biotin an die extrazellulären Proteine der Oozytenmembran. Mit Streptavidin-Beads können die biotinylierten Proteine aufgereinigt und auf einem SDS-Gel getrennt und im Western Blot mit Antikörpern nachgewiesen werden. Zwei bis drei Tage nach der Injektion von 10 ng cRNA wurde bei 2–3 Oozyten stichprobenartig die Expression gemessen. Dann wurden 5–10 Oozyten pro Sorte injizierter cRNA 3x mit kalter ND96 gewaschen und bei RT für 10 min in 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in ND96 inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten 4x mit kalter ND96 gewaschen und in 200 µl Lysispuffer lysiert, kurz mit Ultraschall behandelt und 15 min bei 14 000 g zentrifugiert. Die klare Phase wurde abgenommen und mit 50 µl immobilisierten Streptavidin-Beads (Pierce) 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die Beads mit je 200 µl Lysis-Puffer 4x gewaschen. Die Beads wurden anschließend in 3x Protein-Ladepuffer, ergänzt mit 4 mM Pefa-Block und 1x Complete-Protease-Inhibitor, aufgenommen und bei –20 °C bis zur SDS-PAGE aufbewahrt.

2.9.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Gegen die Kaliumkanal- α -Untereinheit KCNQ1 und die β -Untereinheit KCNE3 wurde in Kaninchen jeweils ein Antiserum erzeugt (Eurogentec, Belgien), das sich gegen ein Peptid im C-Terminus von KCNQ1 bzw. KCNE3 richtete. Es wurden je zwei Kaninchen mit folgenden Peptiden immunisiert:

C-terminal	(Q1C2):	C-LTVPQTGPDEGS-OH	KCNQ1
C-terminal	(E3C1):	C-DKRSDPYHVYIKNR-NH ₂	KCNE3

Die Antiseren wurden auf ihre Aktivität im Western Blot getestet und anschließend über eine Säule affinitätsgereinigt. Dazu wurde 1 mg des Peptids in 200 μ l H₂O gelöst und 50 μ l Kopplungspuffer hinzugefügt. Eine PolyPrep Säule (Biorad) wurde mit 0,8 ml Sulfolink Coupling Gel (Pierce) beladen und 6x mit 1 ml Kopplungspuffer equilibriert. Danach wurde die Peptidlösung auf die Säule gegeben, 1–2 h bei RT schüttelnd inkubiert und der Puffer abgelassen. Die Säule wurde 3x mit 1 ml Kopplungspuffer gewaschen und das Gel mit 1 ml Blocklösung 15 min gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Nach 2x Waschen mit 8 ml 1 M NaCl und 1x Waschen mit 1x TBS wurde die Säule mit 4 ml Serum (1:1 verdünnt in TBS) 2 h bei RT oder o/n bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Der Überstand wurde abgelassen und die Säule 2x mit 10 ml PBS und 1x mit 5 ml 0,1x PBS gewaschen. Dann wurden je 5x 400 μ l Elutionspuffer auf die Säule gegeben und die gebundenen Antikörper in je 5x 40 μ l 1 M Tris 2 M NaCl (pH 8,5) eluiert. Zur Stabilisierung der Antikörper wurde BSA in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zugegeben. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden im Western Blot und in der Immunfluoreszenz getestet. Dazu wurden COS7- bzw. CHO-K1-Zellen verwendet, die mit KCNQ1 und KCNE3 transfiziert wurden. Nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle.

2.9.3 Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Denaturierte Proteingemische wurden durch eine SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Dazu wurden Minigelkammern der Firma Hoefer Scientific (San Francisco, USA) verwendet. Zur Größenbestimmung diente ein Molekulargewichtsstandard (Life Technologies). Die 8–12 %igen Gele wurden nach dem Lauf in einer mit Transferpuffer gefüllten Transphor Tankblot Kammer (Hoefer Scientific) auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran, Schleicher & Schuell, Einbeck) transferiert (20 V, 15 h, 4 °C). Die Vollständigkeit des Transfers wurde entweder durch einen gefärbten Molekulargewichtsstandard oder eine Poinceau S-Färbung (Sigma) überprüft (Sambrook *et al.*, 1989). Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran zunächst 30 min in Western-Blocklösung bei 37 °C blockiert, der Primär-Antikörper zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Nach 5x Waschen mit Western-Waschpuffer wurde die Membran erneut 30 min blockiert und anschließend ein HRP-gekoppelter Sekundär-Antikörper zur Western-Blocklösung gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion der Antigen-Antikörper

Komplexe erfolgte mit dem Renaissance Western Blot Chemoluminescence Kit (NEN Life Science Products, Köln) nach Angaben des Herstellers. Röntgenfilme wurden auf einem Curix 60-Automaten (AGFA) entwickelt.

2.9.4 Immunfluoreszenz an Zellkulturen

CHO-K1-Zellen wurden 8 h nach der Transfektion auf Deckglaschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd in PBS 15 min fixiert. Nach 3x Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt und die Zellen für 2 h bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper, verdünnt in 0,1 % TritonX-100 in PBS, auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT im Dunkeln. Nach 3x Waschen mit PBS wurden die Präparate mit Glycerin-Gelatine (Sigma) eingedeckelt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.9.5 Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

Zur Fixierung von Gewebe wurde eine adulte Maus mit einer Butterfly-Kanüle unter konstantem Druck (180 mm/Hg) über die linke Herzkammer perfundiert. Dazu wurde zunächst für 1-2 min mit 0,01 % Heparin in PBS perfundiert, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern und eine vollständige Perfusion des Gefäßsystems mit der Fixierlösung zu ermöglichen. Anschließend wurde für 3 min Fixierlösung PLP-Fixanz eingeleitet. Magen und Darm wurden entnommen, mit PBS gespült und auf Trockeneis in Kryotek eingebettet und an einem Kryostat geschnitten. Die Schnitte (10-16 μm) wurden in PLP-Fixans 2 min fixiert, 2x mit PBS gewaschen und 30 min in Blocklösung inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde in Blocklösung verdünnt und für 2 h bei RT auf die Zellen gegeben. Nach je einmaligem Waschen mit Hochsalz-PBS und PBS wurden die Schnitte für 15 min mit 3 % Ziegen Serum in PBS blockiert und anschließend 1 h bei RT im Dunkeln mit dem Sekundär-Antikörper (verdünnt in 0,1 % NP-40 in PBS) inkubiert. Nach 3x Waschen wurden die Schnitte mit Fluoromount-G (Southern Biotechnologies, UK) eingedeckelt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.10 Elektrophysiologische Methoden

2.10.1 Präparation und cRNA-Injektion von *Xenopus laevis* Oozyten

Weiblichen afrikanischen Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) wurden unter Totalanästhesie mit 0,17 % Tricain in Leitungswasser Teile des Ovars entnommen. Das Ovar wurde in kleine Fragmente gezupft und mit 2 mg/ml Kollagenase (Clostridiopeptidase A, Sigma) in OR-2 bei 17 °C unter sanftem Schütteln verdaut, bis die Follikelschicht von den Oozyten abfiel. Nach mehrmaligem Waschen mit OR-2 wurden Oozyten des Reifestadiums V oder VI ausgewählt und in

modifizierter Barth-Lösung inkubiert. Zur Injektion von cRNA wurden Glaspipetten (Drummond Scientific, Broomall, USA) mit einem Horizontal-Pipettenzieher von Sutter Instruments (Navato, USA) gezogen, mit Silikonöl DC 200 (Sigma) gefüllt und in eine Mikroinjektionspipette (Drummond) eingesetzt. Nach dem Aufsaugen der cRNA wurden pro Oozyte 50 nl cRNA injiziert, was einer Menge von 5–10 ng cRNA pro Oozyte entsprach.

2.10.2 Zwei-Elektroden Voltage clamp von *Xenopus laevis* Oozyten

Die injizierten Oozyten wurden nach 2–3 Tagen durch Messungen mit der Zwei-Elektroden *Voltage clamp* Technik untersucht (Stühmer, 1992). Dazu wurden mit 3 M KCl gefüllte Borosilikat-Glaselektroden (Clarke Electromedical Instruments, Reading, UK) verwendet, die mit einem Vertikal-Pipettenzieher (List Medical Instruments) so ausgezogen wurden, dass ihr Widerstand in der Badlösung (ND96) 0,3–1,2 M Ω betrug. Durch die Expression von Ionenkanälen in der Oozyte konnten Ströme evoziert werden, die über einen Turbotec-Verstärker (NPI electronic, Tamm) und einen Analog/Digitalkonverter (Digidata Series 1320, Axon Instruments, Union City, USA) mit einer Frequenz von 1 kHz aufgenommen und mit pClamp 8.0.2 Software visualisiert und ausgewertet wurden. Die Messkammer wurde über Agarbrücken (3 M KCl in 1 % Agarose) geerdet.

2.10.3 Patch clamp Messungen an transfizierten HEK293-Zellen

Transfizierte HEK293-Zellen wurden 7–8 h nach der Transfektion in geringer Dichte auf Deckgläschen (30 mm) ausgesät und 24–32 h nach der Transfektion mit der *Patch clamp* Technik in der Ganzzellkonfiguration (Hamill *et al.*, 1981) bei RT gemessen. Dazu wurden Pipetten aus Borosilikat-Glas (G200F, Hamill) verwendet, die mit einem Horizontal-Pipettenzieher (Zeitz, Augsburg) gezogen wurden. Die Pipetten wurden mit Pipettenlösung (HEK-Zellen) gefüllt und wiesen in der Badlösung einen Widerstand von 1,2–1,7 M Ω auf. Durch die Expression von Ionenkanal-cDNA konnten in den HEK293B-Zellen Ströme evoziert werden, die über einen Axopatch 200B-Verstärker (Axon Instruments) und einen Analog/Digitalkonverter (Digidata Series 1320, Axon Instruments) mit einer Frequenz von 5 kHz aufgenommen und mit pClamp 8.0.2 Software visualisiert und ausgewertet wurden. Die Messkammer wurde über eine Salzbrücke (1 M NaCl) geerdet.

2.10.4 Präparation der Maus-Cochlea

Elf bis vierzehn Tage alte Mäuse (P11–14) wurden durch zervikale Dislokation unter Äthernarkose getötet. Die temporalen Knochen wurden vom Schädel getrennt, beide Cochleae entnommen und in Präparationslösung auf Eis gelagert. Eine Cochlea wurde unter einem Binokular mit einer spitzen Pinzette durch das ovale Fenster geöffnet. Der Knochen wurde soweit entfernt, bis die äußerste apikale Windung der Cochlea aus der Knochenhöhle entnommen werden konnte. Für die Messungen an inneren Haarzellen wurde die Tektorialmembran

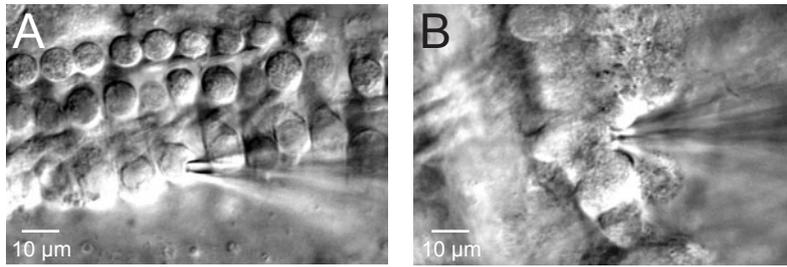


Abb. 2.2: *Patch clamp* Messungen an den basalen Enden von äußeren (A) und inneren (B) Haarzellen der Maus-Cochlea.

vorsichtig mit einer Pinzette vom Cortischen Organ abgezogen. Das Präparat wurde auf einem Deckglas mit einem Nylon-Netz fixiert und bei 22–26 °C ständig mit frischer Badlösung perfundiert.

2.10.5 *Patch clamp* Messungen an äußeren und inneren Haarzellen in der Maus-Cochlea

Die *Patch clamp* Messungen an den Haarzellen der Cochlea wurden an der basalen Seite der Zellen in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt (Abb. 2.2). Um die basalen Enden der äußeren bzw. inneren Haarzellen im Cortischen Organ freizulegen, wurden die umliegenden Stützzellen mit einer Saugpipette entfernt. Die optische Kontrolle erfolgte über die IR-DIC-Videomikroskopie (Dodt und Zieglgansberger, 1990) mit einer Infrarot-Videokamera (VX44, PCO). Es wurde ein aufrechtes Mikroskop (BX50WI, Olympus, Hamburg) mit einer zehnfachen und einer 40fachen Vergrößerung verwendet. Für die Manipulation der Pipette wurde ein elektrischer Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Ratingen) benutzt. Pipetten wurden aus Borosilikat-Glas (GC150-15, Clarke Electromedical Instruments) mit einem Horizontal-Pipettenzieher (Zeitz, Augsburg) gezogen. Die Messpipetten wurden mit Pipettenlösung (Haarzellen) gefüllt und hatten in der Badlösung einen Widerstand von 2,5–4 M Ω . Die evozierten Ströme wurden über einen Axopatch 200A-Verstärker (Axon Instruments) und einen Analog/Digitalkonverter (Digidata Series 1200, Axon Instruments) mit einer Frequenz von 5–10 kHz aufgenommen, mit 2 kHz (*Low-pass*) gefiltert und mit pClamp 8.1 Software visualisiert und ausgewertet. Nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration wurde gewartet, bis das Zellinnere mit der Pipettenlösung equilibriert war, um das Ruhemembranpotential zu messen. Zur Charakterisierung der gemessenen Ionenströme wurden verschiedene Ionenkanalblocker appliziert. XE991 (Neurosearch, Kopenhagen, Dänemark) und Linopirdin (Research Biochemicals International, Natick, USA) wurden als Stocklösungen in DMSO gelöst und in der Badlösung (Haarzellen) auf 0,5 μ M bzw. 10 μ M verdünnt. TEA (Merck) wurde vor jedem Versuch in einer Konzentration von 5 mM in der Badlösung gelöst. Die Messkammer wurde über einen chlorierten Silberdraht geerdet.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von KCNQ-Kaliumkanälen und ihren β -Untereinheiten. Im ersten Teil wurde die Lokalisation von KCNQ1 und verschiedenen β -Untereinheiten der KCNE-Familie im Gastrointestinalsystem untersucht. Der zweite Teil dieser Arbeit beinhaltet die Charakterisierung einer Punktmutation im Spannungssensor von KCNQ2. Hierbei wurde untersucht, warum diese Mutation nicht nur zur Neugeborenen-Epilepsie führt, sondern in den betroffenen Patienten zusätzlich Myokymie verursacht. Der dritte Teil der Arbeit bestand aus Messungen an Mausmodellen für die vererbte progrediente Ertaubung DFNA2, die durch Mutationen im *KCNQ4*-Gen verursacht wird. Die elektrophysiologischen Messungen charakterisieren Kaliumströme in äußeren und inneren Haarzellen KCNQ4-defizienter Mäuse bzw. transgener Mäuse mit einer dominant-negativen Mutation in diesem Gen.

3.1 KCNQ1 und seine β -Untereinheiten im Gastrointestinaltrakt

Der KCNQ1-Kaliumkanal kann mit verschiedenen β -Untereinheiten der KCNE-Familie assoziieren, die das Schalten des Kanals drastisch verändern. Während vor allem die Lokalisation von KCNQ1 und KCNE1 im Herzen und im Innenohr bekannt ist (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Neyroud *et al.*, 1997; Vetter *et al.*, 1996), wurde hier die Expression von KCNQ1 und seinen β -Untereinheiten im Gastrointestinalsystem untersucht.

3.1.1 Expression von KCNQ1, KCNE2 und KCNE3

Zur Lokalisation von KCNQ1 und den β -Untereinheiten der KCNE-Familie im Gastrointestinaltrakt wurde von Dr. Siegfried Waldegger ein Northern Blot durchgeführt. Dazu wurde Total-RNA aus dem Mausmagen, dem proximalen Jejunum, einem Dünndarmabschnitt, und dem *Colon descendens*, einem Dickdarmabschnitt, verwendet. Bei der Präparation der Gewebe wurde darauf geachtet, die Mukosa (Schleimhaut) des Darms zu erhalten und nicht von der glatten Muskulatur zu trennen. Der Northern Blot wurde mit genspezifischen cDNA-Sonden von KCNQ1 und allen fünf Mitgliedern der KCNE-Familie hybridisiert, wobei die Länge der Sonden ca. 200-500 bp umfasste. Die Sonden für KCNE1, KCNE4 und KCNE5 zeigten weder Signale im Magen noch in Dün- oder Dickdarm (Daten nicht gezeigt). KCNQ1 war im Maus-Magen stark exprimiert und zu einem geringeren Maß im Dün- und Dickdarm vorhanden (Abb. 3.1 A). Die KCNE3-Probe detektierte nahezu kein Transkript im Magen, jedoch eine

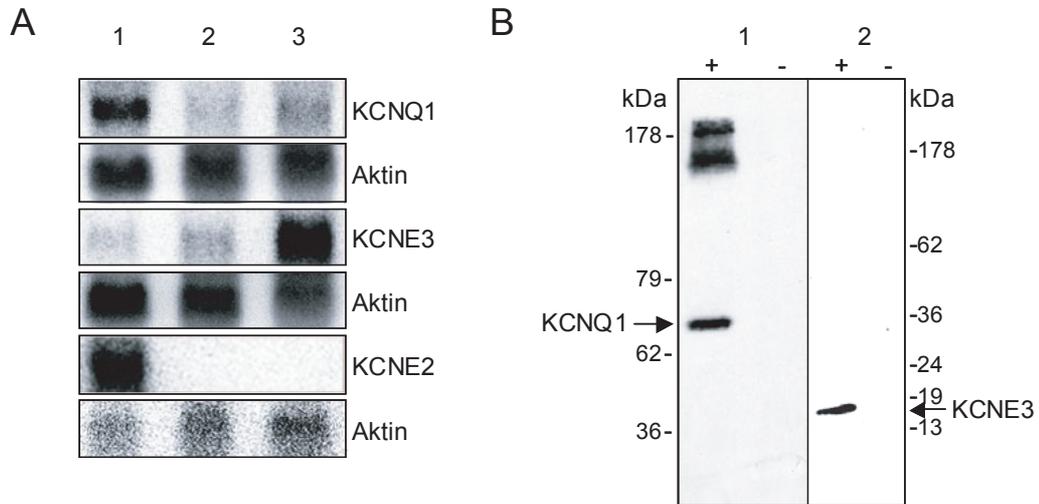


Abb. 3.1: Northern Blot von KCNQ1 und zwei KCNE-Untereinheiten im Gastrointestinaltrakt (A) und Charakterisierung der KCNQ1- und KCNE3-Antikörper im Western Blot (B). (A) Northern Blot von KCNQ1, KCNE3 und KCNE2 im Magen (1), Dünndarm (2) und Kolon (3) der Maus. Jede Spur wurde mit 25 μg Total-RNA beladen. Eine Aktinsonde diente als Kontrolle. KCNQ1 wurde stark im Magen, moderat im Kolon und nur schwach im Dünndarm exprimiert. Die Expression von KCNE3 war im Kolon am höchsten und im Dünndarm und Magen deutlich schwächer. Die KCNE2-Sonde zeigte ein deutliches Transkript im Magen, jedoch keine Signale in Kolon oder Dünndarm. (B) Western Blot von COS-Zellysaten mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen KCNQ1 (1) und KCNE3 (2). Der KCNQ1-Antikörper detektierte eine Bande von ca. 65 kDa in Extrakten von Zellen, die mit KCNQ1 transfiziert wurden (+), und keine Bande in nicht transfizierten COS7-Zellen (-). Die beiden zusätzlichen Banden mit höherem Molekulargewicht sind möglicherweise KCNQ1-Multimere, da diese Banden in nicht-transfizierten Zellen nicht detektiert wurden. Der KCNE3-Antikörper erkannte eine einzelne Proteinbande von ca. 14 kDa in Extrakten von Zellen, die mit KCNE3 transfiziert (+) wurden. Diese Bande fehlte in Extrakten nicht transfizierter COS7-Zellen (-). Die Pfeile entsprechen den Molekulargewichten der detektierten Proteine, 65 kDa für KCNQ1 und 14 kDa für KCNE3.

starke Expression im Kolon. Die KCNE3-Expression im Dünndarm war schwach (Abb. 3.1 A). KCNE2 war stark im Magen exprimiert. Die Sonde detektierte weder im Dün- noch im Dickdarm ein Signal (Abb. 3.1 A). Während KCNQ1 im Magen möglicherweise mit KCNE2 interagiert, bilden KCNQ1 und KCNE3 vermutlich im Kolon und im Dickdarm heteromere Kanäle.

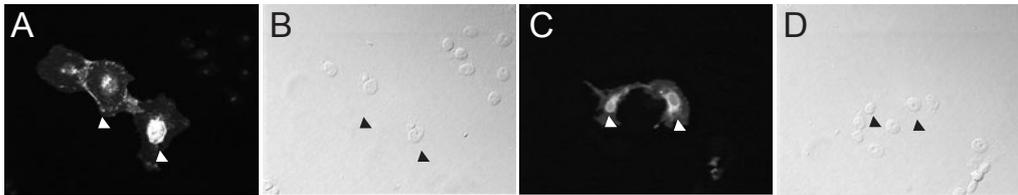


Abb. 3.2: Charakterisierung der KCNQ1- und KCNE3-Antikörper durch Immunfluoreszenz. CHO-K1-Zellen wurden mit KCNQ1- und KCNE3-cDNA transient transfiziert und mit den KCNQ1- (A) und (B) und den KCNE3-Antikörpern (C) und (D) inkubiert. Beide Antikörper gaben in der Immunfluoreszenz spezifische Signale. In (A) und (C) sind einige Zellen spezifisch gefärbt (Pfeile). Umliegende, vermutlich nicht transfizierte CHO-K1-Zellen wurden nicht markiert und waren unter Fluoreszenzlicht nicht sichtbar, konnten jedoch mit der Nomarski-Optik dargestellt werden (B) und (D). Die Pfeile in (B) und (D) bezeichnen Zellen, die in (A) und (C) positiv für KCNQ1 bzw. KCNE3 waren.

3.1.2 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von KCNQ1 und KCNE3 im Darm

Heteromere Kanäle aus KCNQ1 und KCNE3 vermitteln einen Strom, der eine lineare Spannungsabhängigkeit aufweist, durch cAMP aktivierbar und zeitunabhängig ist (Schroeder *et al.*, 2000b). Diese Eigenschaften legen die Vermutung nahe, dass KCNQ1 und KCNE3 zusammen für den transepithelialen Chloridtransport in Kryptenzellen des Dünndarms und des Dickdarms verantwortlich sind. Diese putative Funktion von KCNQ1 und KCNE3 erfordert eine basolaterale Lokalisation der Heteromere. Um die zelluläre und subzelluläre Lokalisation von KCNQ1 und KCNE3 im Dick- und Dünndarm zu untersuchen, wurden von Dr. Siegfried Waldegger polyklonale Antikörper gegen C-terminale Peptide aus KCNQ1 und KCNE3 in Kaninchen generiert (s. 2.9.2). Die Peptide wurden so gewählt, dass sie möglichst hydrophile Aminosäuren oder Proline enthielten, da diese Aminosäuren meist gut für Antikörper zugänglich sind (Harlow und Lane, 1988). Die Peptide wurden an Stellen mit geringer Homologie zu den anderen KCNQ- bzw. KCNE-Familienmitgliedern ausgewählt, um Kreuzreaktionen der Antikörper mit Mitgliedern der gleichen Kanalfamilie zu vermeiden.

Die affinitätsgereinigten Seren wurden zunächst in einem Western Blot auf ihre Spezifität getestet (Abb. 3.1 B). Die Antikörper erkannten in Proteinextrakten von COS7-Zellen, die mit KCNQ1 und KCNE3 transfiziert worden waren, Banden mit einer Größe von ca. 65 kDa (KCNQ1) und ca. 14 kDa (KCNE3). Diese Banden waren in Proteinextrakten nicht transfizierter COS7-Zellen nicht vorhanden. Die Größe der Banden entsprach dem prognostizierten Molekulargewicht der Monomere. Der KCNQ1-Antikörper detektierte zwei zusätzliche Banden von höherem Molekulargewicht, die möglicherweise von KCNQ1-Multimeren stammten, da sie in Extrakten nicht transfizierter COS7-Zellen fehlten.

Die KCNQ1- und KCNE3-Antikörper wurden außerdem in der Immunfluoreszenz auf ihre Spezifität getestet. Hierzu wurden mit KCNQ1 und KCNE3 transfizierte CHO-K1-Zellen

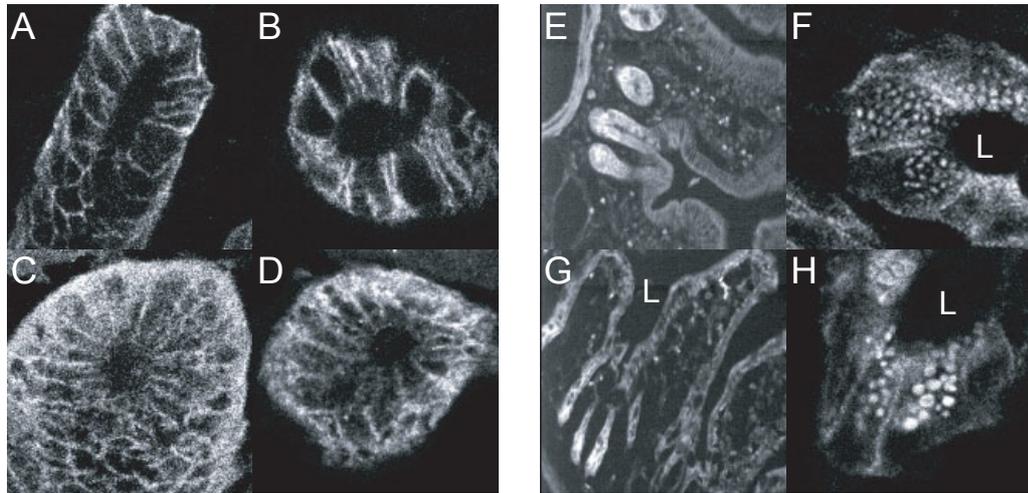


Abb. 3.3: Immunfluoreszenz mit KCNQ1- und KCNE3-Antikörpern an Kryoschnitten ($10\ \mu\text{m}$) von Kolon (A-D) und Dünndarm (E-H). (A, B, E und F) wurden mit KCNQ1-Antikörpern inkubiert und (C, D, G und H) mit Antikörpern gegen KCNE3. (B, D, F und H) zeigen stärkere Vergrößerungen. KCNQ1 und KCNE3 kolokalisieren in der basolateralen Membran von Kolon-Kryptzellen und in den Kryptbasen des Dünndarms, wie bereits von Schroeder *et al.* (2000) vermutet wurde. Die runden Strukturen in (F) und (H) waren auch ohne Erstantikörper sichtbar und sind daher Artefakte des Zweitantikörpers. L zeigt das Lumen vom Dünndarm an.

mit den affinitätsgereinigten Antikörpern inkubiert (Abb. 3.2). Die Antikörper erkannten spezifisch ihre Epitope. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte CHO-K1-Zellen, bei denen die Antikörper keine Signale zeigten.

Um die zelluläre Lokalisation von KCNQ1 und KCNE3 zu bestimmen, wurden $10\ \mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte vom Dün- und Dickdarm einer adulten Maus angefertigt und mit dem KCNQ1- bzw. KCNE3-Antikörper inkubiert. Da beide Antikörper im Kaninchen generiert wurden und somit den gleichen Zweitantikörper erforderten, waren Doppelfärbungen mit beiden Antikörpern nicht möglich. Stattdessen wurden konsekutive Schnitte mit jeweils einem Antikörper gefärbt. Die Immunfluoreszenz an Querschnitten des Mauskolons zeigte für KCNQ1 und KCNE3 eine basolaterale Lokalisation in den Kryptzellen (Abb. 3.3 A-D). Eine ähnliche Lokalisation in den Epithelzellen wurde im Dünndarm der Maus festgestellt, wo KCNQ1 und KCNE3 in den Krypten kolokalisierten. Auch hier färbten beide Antikörper die basolateralen Membranen der Kryptzellen an (Abb. 3.3 E-H). Diese Befunde stimmen gut mit der putativen Funktion von KCNQ1/KCNE3-Heteromeren bei der cAMP-stimulierten Chloridsekretion im Kolon und im Dünndarm überein.

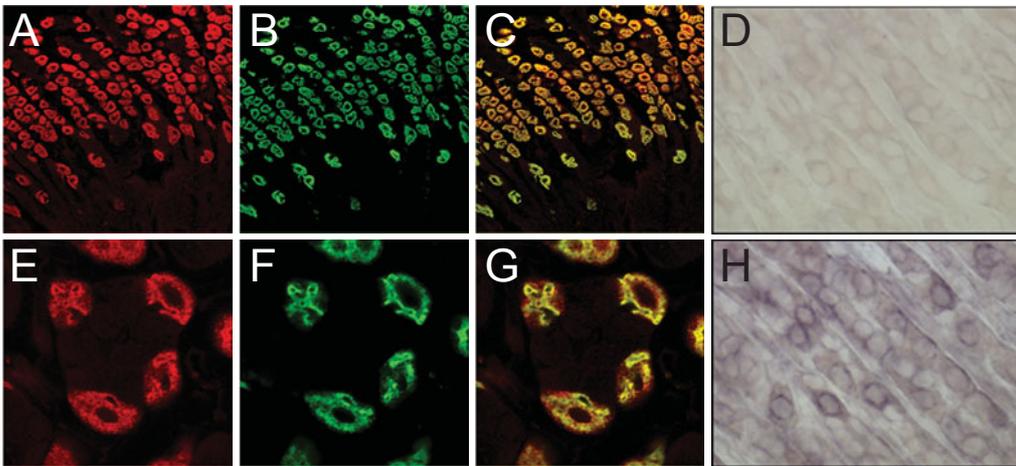


Abb. 3.4: Kryoschnitte ($10\ \mu\text{m}$) des Mausmagens wurden mit KCNQ1-Antikörpern (A, E) und einem monoklonalen Antikörper gegen die β -Untereinheit der H^+/K^+ -ATPase (B, F) gefärbt. Die Abbildungen E-G zeigen stärkere Vergrößerungen der Abbildungen A-C. Die Überlagerung der Antikörpersignale (C, G) zeigt die Kolo-kalisation der beiden Proteine in den Magensäure-sezernierenden Parietalzellen. Es wurde kein weiterer Zelltyp angefärbt. (D, H) *In situ* Hybridisierungen an Kryoschnitten ($8\text{-}10\ \mu\text{m}$) des Mausmagens mit einer Digoxigenin-markierten mKCNE2 *sense*- (D) und *antisense*-Sonde (H). Es sind nur Zellen am Hals und an der Basis der Magendrüsen gefärbt. Die *sense*-Probe ergab kein Signal (Kontrolle). Färbungen von konsekutiven Schnitten mit dem Antikörper gegen die H^+/K^+ -ATPase zeigten, dass die KCNE2-positiven Zellen wahrscheinlich Parietalzellen sind.

3.1.3 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von KCNQ1 und KCNE2 im Magen

Da die Northern Blot Analyse für KCNQ1 und KCNE2 jeweils ein deutliches Signal im Magen zeigte, wurde die zelluläre und subzelluläre Lokalisation beider Untereinheiten im Magen untersucht. Vom Magen einer adulten Maus wurden Kryoschnitte angefertigt und mit KCNQ1-Antikörpern inkubiert. Es wurde ein starkes Signal für KCNQ1 in einem einzelnen Zelltyp innerhalb der Magendrüsen detektiert (Abb. 3.4 A). Um diesen Zelltyp zu identifizieren, wurden Doppelfärbungen mit dem KCNQ1-Antikörper und einem Antikörper gegen die β -Untereinheit der H^+/K^+ -ATPase durchgeführt. Sowohl KCNQ1 als auch die H^+/K^+ -ATPase waren in den Magensäure-sezernierenden Parietalzellen exprimiert (Abb. 3.4 B, F). Höhere Vergrößerungen der Magenschnitte machten deutlich, dass die beiden Proteine auch subzellulär kolo-kalisieren (Abb. 3.4 C, G). Parietalzellen haben ein ausgeprägtes intrazelluläres tubulovesikuläres Kompartiment, das die H^+/K^+ -ATPase enthält. Die überlappende Färbung der beiden Antikörper füllte den größten Teil des Querschnitts einer Parietalzelle aus (Abb. 3.4 G). KCNQ1 befindet sich daher vermutlich zusammen mit der H^+/K^+ -ATPase in den tubulovesikulären Membranen der Parietalzellen.

Da die Northern Blot Analyse ein starkes Signal für KCNE2 im Magen zeigte, wurde die zelluläre Lokalisation von KCNE2 in diesem Organ untersucht. Es stand kein Antikörper gegen KCNE2 zu Verfügung. Daher wurde mit Hilfe von Dr. Susanne Fehr eine *in situ* Hybridisierung an Magenschnitten durchgeführt. Es wurde ein ca. 200 bp langes Fragment von KCNE2 aus der cDNA vom Mausmagen kloniert und während der *in vitro* RNA-Synthese mit Digoxigenin markiert. Mit dieser Sonde konnte ein spezifisches Signal in einer Klasse von Zellen detektiert werden, die sich an der Basis und am Hals der Magendrüsen befand (Abb. 3.4 H). Da das Signal den Färbungen mit Antikörpern gegen KCNQ1 und die β -Untereinheit der H^+/K^+ -ATPase ähnelte, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den gefärbten Zellen ebenfalls um Parietalzellen handelte. Färbungen von konsekutiven Schnitten mit dem Antikörper gegen die H^+/K^+ -ATPase zeigten, dass die gefärbten Zellen wahrscheinlich Magensäure-sezernierende Parietalzellen sind. Die Spezifität der *in situ* Hybridisierung wurde durch Kontrollen mit einer *sense* KCNE2-Sonde bestätigt (Abb. 3.4 D).

3.1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften von heteromeren Kaliumkanälen aus KCNQ1 und KCNE2

Um zu klären, ob KCNQ1 und KCNE2 heteromere Kaliumkanäle bilden können, wurden HEK293-Zellen entweder nur mit KCNQ1-cDNA transfiziert oder mit cDNA von KCNQ1 und KCNE2. 24–36 h nach der Transfektion wurden mit der *Patch clamp* Technik Ströme gemessen. Dabei wurde die Ganzzellkonfiguration gewählt, die es ermöglicht, die Summe der Aktivität aller Ionenkanäle in der Zellmembran, d. h. den Ganzzellstrom (*whole cell current*), zu messen. Von einem Haltepotential von -60 mV wurden die HEK293-Zellen für 1,5 s auf Werte zwischen -100 und $+60$ mV in $+20$ mV Schritten geklemmt. Jedem Spannungssprung folgte ein 10 ms langer Sprung auf 0 mV. Wie bereits beschrieben (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Wollnik *et al.*, 1997), vermittelten KCNQ1-Homomere Ströme, die bei Spannungen positiver als -40 mV langsam aktivierten. Die Deaktivierung homomerer KCNQ1-Kanäle war ebenfalls langsam (Abb. 3.5 A). Die Koexpression von KCNQ1 und KCNE2 führte zu einer dramatischen Veränderung der Stromeigenschaften. Ähnlich den Strömen von KCNQ1/KCNE3-Heteromeren (Schroeder *et al.*, 2000b), waren die Ströme von KCNQ1/KCNE2-Heteromeren nahezu zeitunabhängig (Abb. 3.5 B,D). Ihre fast lineare Spannungsabhängigkeit führte auch bei Potentialen negativer als -40 mV zu signifikanten Strömen. Im Unterschied zu Heteromeren aus KCNQ1 und KCNE3 war die Stromamplitude bei Koexpression von KCNQ1 und KCNE2 mit 0,75 nA bei $+60$ mV deutlich geringer als bei KCNQ1-Homomeren (1,1 nA bei $+60$ mV, Abb. 3.5 C). KCNQ1/KCNE2-Heteromere sind also vermutlich bei den negativen Ruhemembranpotentialen epithelialer Zellen geöffnet.

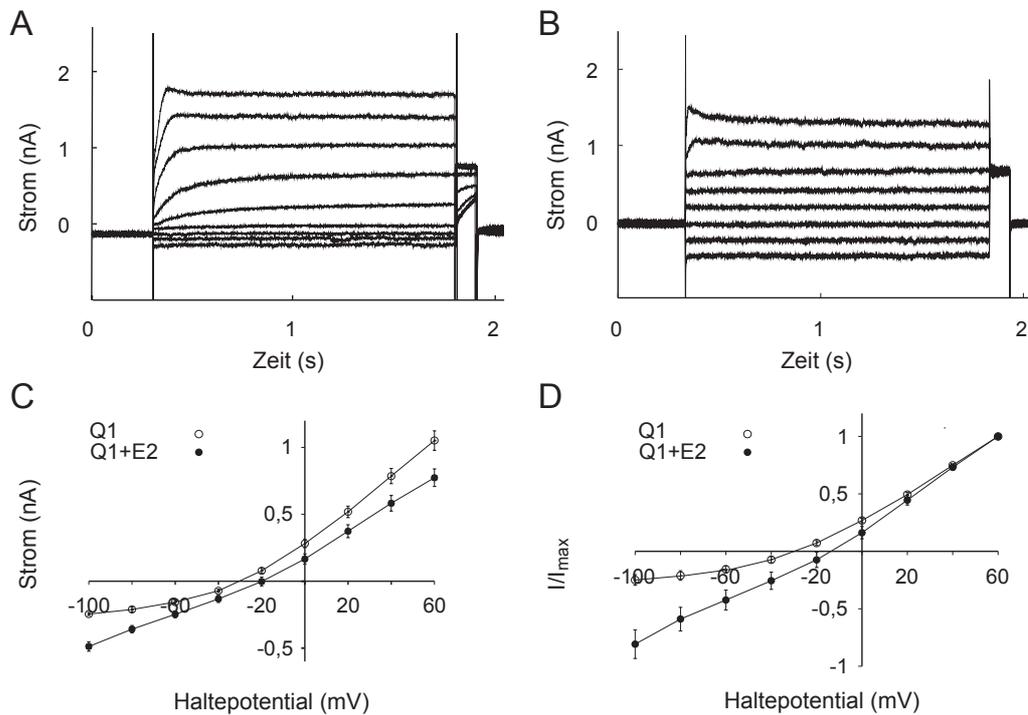


Abb. 3.5: Elektrophysiologische Eigenschaften von KCNQ1 und KCNE2, exprimiert in HEK293-Zellen. *Patch clamp* Messungen in der Ganzzellkonfiguration in HEK293-Zellen, die entweder mit KCNQ1 allein (A) oder zusammen mit KCNE2 (B) transfiziert wurden. In (A und B) sind repräsentative Ströme gezeigt. Von einem Haltepotential von -60 mV wurden die HEK293-Zellen für 1,5 s auf Werte zwischen -100 und $+60$ mV in $+20$ mV Schritten geklemmt. Jedem Spannungssprung folgte ein 10 ms langer Sprung auf 0 mV. Am Ende der Testpulse wurden die Stromamplituden im *steady state* gemessen und gegen das entsprechende Testpotential aufgetragen (C). In (D) wurden die Ströme auf $+60$ mV normalisiert und gegen das Testpotential aufgetragen. Für die Koexpression von KCNQ1 und KCNE2 ergab sich eine nahezu lineare Strom-Spannungskennlinie. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Für KCNQ1 ist $n = 12$ und für KCNQ1 + KCNE2 ist $n = 21$.

3.2 Untersuchung einer Mutation im Spannungssensor von KCNQ2

KCNQ2 und KCNQ3 sind zwei homologe Kaliumkanaluntereinheiten, die zu heterotetrameren Kanälen assoziieren können. Diese haben Eigenschaften des neuronalen M-Stroms, der eine wichtige Rolle bei der Regulation der neuronalen Erregbarkeit spielt. Mutationen in KCNQ2 oder KCNQ3 können zu BFNC führen, einer generalisierten, idiopathischen Epilepsie bei Neugeborenen, die autosomal dominant vererbt wird. Prof. Dr. Bernhard Kunath

vom Universitätsklinikum Carl-Gustav Carus in Dresden wurde 1994 erstmals auf eine Familie aufmerksam, deren Mitglieder nicht nur unter einer neonatalen Epilepsie litten, sondern auch eine Myokymie entwickelten, die bis ins Erwachsenenalter anhielt.

3.2.1 Klinische Charakterisierung der BFNC/Myokymie-Patienten

Die Mitglieder dieser Familie europäischen Ursprungs zeigten eine ungewöhnliche Kombination aus einer Hypererregbarkeit des ZNS (Epilepsie) und peripherer Nerven (Myokymie). Vier Familienmitglieder hatten eine anhaltende myokymische Muskelaktivität, die durch EMG (s. Abb. 3.6 B) bestätigt wurde. Das einzige Kind in der letzten Generation (V-1, Abb. 3.6 A)) zeigte bereits in einem Alter von einem Jahr spontane Entladungen in seinem EMG. Es ist also wahrscheinlich, dass der Junge ebenfalls eine Myokymie entwickelt. Die Patienten und Patientinnen der Generation IV und V (Abb. 3.6 A) hatten neonatale Krampfanfälle, und die Zwillingsschwestern (Abb. 3.6 A) erlitten zusätzlich einzelne Anfälle während der Kindheit. Weder Patientin II-1 noch Patient II-2 (Abb. 3.6 A) hatte eine epileptische oder myokymische Erkrankung. Das legt nahe, dass die Tochter der beiden von einer *de novo* Mutation betroffen wurde. Die Segregationsmuster in den folgenden Generationen lassen einen autosomal dominanten Erbgang sowohl für die Myokymie als auch für die neonatale Epilepsie vermuten. Im Folgenden werden die Patienten und Patientinnen einzeln klinisch charakterisiert.

Patientin III-2 Die 41-jährige Mutter der Zwillinge (s. Abb. 3.6 A) hatte eine normale psychomotorische Entwicklung und Verfassung. Seit früher Kindheit litt sie unter einer Myalgie, die durch moderate Bewegung induziert wurde, aber selten im Ruhezustand auftrat. Außerdem hatte sie eine generalisierte Myokymie mit spontanem Zucken der Finger. Krämpfe oder myotonische Muskelsteifheit wurden nicht beobachtet. Die myokymischen Muskelbewegungen traten sowohl nachts als auch tagsüber auf. Dabei waren die Muskeln des Rumpfes sowie der oberen und unteren Extremitäten betroffen, jedoch nicht die Gesichtsmuskeln. Die Symptome verschlimmerten sich mit Fieber und, mit zunehmendem Alter, bei Kälte, Alkohol und in den ersten Monaten der Schwangerschaft. Es trat keine Myotonie auf. Die Muskelstärke war erhöht. Das Elektromyogramm zeigte das spontane Auftreten einzelner oder wiederholter Entladungen des normalen Motorendplattenpotentials in den betroffenen Muskeln. Die spontane Aktivität blieb bei intravenöser Gabe von Kalzium oder Diazepam unverändert. Lidocain und Hexobarbitale blieben ebenfalls ohne Effekt, während die Aktivität mit den peripheren Muskelrelaxanzien Suxamethoniumchlorid und d-Tubocurarin zeitweise unterdrückt werden konnte. Die aktive Erregung der Muskeln führte zu leicht verkürzten Potentialen und einer erhöhten Polyphasie. Das Elektroneurogramm und die F-Welle zeigten eine normale Leitungsgeschwindigkeit, jedoch wiederholte späte Entladungen nach jeder Stimulation des Nervs. Sensorisch-evozierte Potentiale, Elektrokardiogramm, EEG, Aufnahmen von Thorax und Mediastinum mit Magnetresonanz sowie die Laborwerte waren unauffällig. Die Myokymie sowie die Muskelschmerzen wurden durch Carbamazepin verbessert. Die Frau hatte keine epileptischen Anfälle.

Patientin IV-2 Die 22-jährige Tochter von III-2 wurde eine Woche vor dem errechneten Geburtstermin geboren. An den Tagen sieben und 30 hatte sie mehrere Krampfanfälle mit tonischen und/oder klonischen Bewegungen der Extremitäten. Im Alter von zwei und zwölf Jahren hatte sie zwei *grand mal* Anfälle, von denen einer mit Fieber einher ging. Frühe EEG waren normal, später zeigten sich jedoch generalisierte diffuse Entladungen mit maximaler Amplitude in temporalen Bereichen des Gehirns. Im Alter von neun und 13 Jahren war das EEG ohne Befund. Im Vorschulalter klagte das Mädchen über eine Myalgie, die durch Bewegung induziert wurde. In der Pubertät trat die Myalgie nicht mehr auf. Krämpfe oder myotonische Muskelsteifheit wurden nicht beobachtet. Zur Behandlung der Epilepsie erhielt das Mädchen Phenobarbital. Im Alter zwischen acht und zehn Jahren entwickelte sie eine Myokymie der unteren und oberen Extremitäten. Die Myokymie, die sich unter Phenobarbital-Gabe nicht verbesserte, ging mit leichten unwillkürlichen Finger- und Zehenbewegungen einher, die sich bei Fieber verschlimmerten. Das EMG war im Alter von einem und sieben Jahren normal, zeigte jedoch seit einem Alter von acht Jahren spontane repetitive Entladungen der normalen Motor-Endplattenpotentiale von 20–60 ms Dauer. Das Elektroneurogramm und sensorisch-evozierte Potentiale waren im Alter von 13 Jahren normal.

Patientin IV-3 Die Zwillingsschwester von IV-2 (s. Abb. 3.6 A) hatte ab dem 10. Lebensstag neonatale Krampfanfälle. Im Alter von zwei und 12–13 Jahren hatte sie *grand mal* Anfälle, manchmal während fiebriger Infektionen. Die Anfälle wurden mit Phenobarbital behandelt. Im Vorschulalter klagte das Mädchen über eine Myalgie nach moderater Bewegung, die in der Pubertät nicht mehr vorhanden war. Krämpfe oder myotonische Muskelsteifheit wurden nicht beobachtet. Fieber verursachte zitternde Fingerbewegungen. Eine neurologische Untersuchung ergab eine Myokymie der oberen und unteren Extremitäten und unwillkürliches Zucken der Finger. Tiefe Sehnenreflexe waren schwach. Das EMG zeigte die gleichen pathologischen Muster wie in III-2. Das Elektroneurogramm entsprach dem von III-2 (Abb. 3.6 B). Sensorisch-evozierte Potentiale und EEG waren ohne Befund. Beide Zwillingsschwestern hatte eine leichte Lernschwäche.

Patientin IV-4 Die 18-jährige Halbschwester von IV-2 und IV-3 (s. Abb. 3.6 A) wurde zum errechneten Geburtstermin nach einer unauffälligen Schwangerschaft geboren. Am Tag vier hatte sie wiederkehrende neonatale Krampfanfälle mit tonischen und/oder klonischen Bewegungen der Extremitäten. Sie wurde mit Phenobarbital behandelt. Eine Myalgie, die durch moderate Bewegung induziert wurde, sowie zitternde Fingerbewegungen während Fieber traten im Alter von zwei Jahren auf. Das Mädchen entwickelte im Alter von drei Jahren eine Myokymie. Zwischenzeitlich wurde Carbamezepin zur Verbesserung der Muskelschmerzen und der Myokymie verabreicht. Das EMG entsprach dem von III-2. Das EEG und Elektroneurogramm waren normal. Das Mädchen wies niedrige IgA-Konzentrationen im Serum auf.

Patient V-1 Der einjährige Sohn von Patientin IV-2 wurde nach einer unkomplizierten Geburt normal geboren. Am dritten Tag nach der Geburt hatte er mehrere Krampfanfälle mit tonisch und/oder klonischen Charakteristika. Er hatte wiederholte Anfälle an den Tagen 30, 45 und 47 und wurde mit Antiepileptika (Phenobarbital, Phenytoin, Diazepam) behandelt. In der letzten Untersuchung des Jungen im Alter von einem Jahr ergaben sich keine neurologischen

oder klinischen Auffälligkeiten, vor allem keine Symptome von Myokymie. Das EMG zeigte jedoch spontane Entladungen gruppiert Motorendplattenpotentialen.

Die Familienmitglieder III-4 und III-6 wurden im Alter von 36 bzw. 34 Jahren untersucht. Sie hatten normale klinische und neurologische Befunde und ein normales EMG. Es wurde berichtet, dass die Patienten I-1, I-2 und II-2 weder Myokymie noch Krampfanfälle hatten. Es gab keine elterliche Blutsverwandtschaft.

3.2.2 Genetische Charakterisierung der BFNC/Myokymie-Patienten

Die Epilepsie, die in der betroffenen Familie beobachtet wurde, ist den gutartigen neonatalen Krampfanfällen (BFNC) ähnlich. Diese Krankheit wird durch Mutationen in *KCNQ2* oder *KCNQ3* verursacht, wobei bisher mehr Mutationen in *KCNQ2* als in *KCNQ3* bekannt sind. Daher wurde in Dr. Ortrud K. Steinleins Labor am Institut für Humangenetik in Bonn der gesamte offene Leserahmen des *KCNQ2*-Gens der beschriebenen Patientinnen und Patienten auf Mutationen untersucht. Mit Hilfe der Einzelstrangkonnformationsanalyse wurde in einem PCR-Fragment, das Exon 3 des *KCNQ2*-Gens enthielt, ein aberrantes Elektrophoresemuster gefunden (Abb. 3.6 C). Die Sequenzierung des Fragments zeigte einen Nukleotidaustausch (Abb. 3.6 E), der zu einer Aminosäuresubstitution von Arginin zu Tryptophan an Position 207 (R207W) im vierten Transmembransegment (S4) des *KCNQ2*-Proteins (Abb. 3.7) führte. Durch die Mutation wurde eine *AclI*-Restriktionsstelle in *KCNQ2* eingeführt (Abb. 3.6 D). Diese Restriktionsstelle wurde benutzt, um 190 Chromosomen von 95 gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen auf die R207W-Mutation zu untersuchen. Die Mutation wurde auf keinem der Kontrollchromosomen gefunden, so dass es sich bei der R207W-Mutation also nicht um einen Polymorphismus des *KCNQ2*-Gens handelt.

Fünf der zehn Familienmitglieder, von denen DNA für die Sequenzierung zur Verfügung stand, waren heterozygot für die R207W-Mutation. Alle Träger der Mutation litten an Myokymie, und alle außer der Patientin III-2 hatten neonatale Krampfanfälle. In der DNA der Eltern von Patientin III-2 wurde keine Mutation im *KCNQ2*-Gen gefunden. Die Mutter- und die Vaterschaft wurden jedoch durch die Mikrosatellitenanalyse von 19 unabhängigen Loci bestätigt. Die R207W-Mutation trat also in Individuum III-2 *de novo* auf und wurde dann an die folgenden Generationen weitergegeben.

3.2.3 Lokalisation von *KCNQ2* und *KCNQ3* im Rückenmark

Da die Myokymie der Patienten durch eine Übererregbarkeit von Motorneuronen verursacht sein kann, wurde die *KCNQ2*-Expression im Rückenmark untersucht. Bisher war bekannt, dass die Expression von *KCNQ2* auf das Gehirn beschränkt ist und es keine signifikante Expression im Muskel gibt (Schroeder *et al.*, 1998; Biervert und Steinlein, 1999; Tinel *et al.*, 1998). Da *KCNQ2* und *KCNQ3* heteromere Kaliumkanäle bilden können (Schroeder *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a; Yang *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000), wurde auch die Expression von *KCNQ3* im Rückenmark untersucht. Es wurden Kryoschnitte (10 μm) vom Rückenmark einer

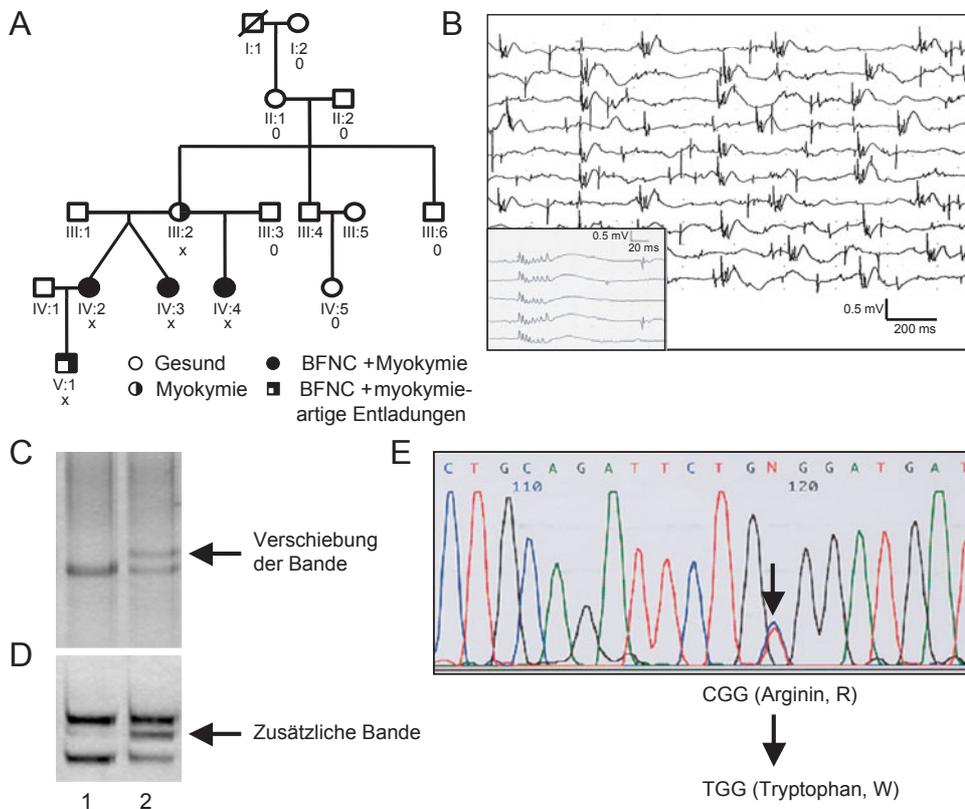


Abb. 3.6: Genetische und klinische Charakterisierung der BFNC/Myokymie-Familie. (A) Schematische Darstellung des Stammbaums. Die klinischen Symptome der einzelnen Familienmitglieder sind der Legende zu entnehmen. Familienmitglieder, die heterozygot für die R207W-Mutation sind, werden durch ein X markiert. Familienmitglieder, die nur die WT-Allele tragen, werden durch eine Null markiert. Nicht markierte Individuen standen für die genetische Analyse nicht zur Verfügung. (B) Das EMG von Patient IV-4 zeigte die typische spontane elektrische Aktivität vom *M. quadriceps* mit Bursts von Motorendplattenpotentialen sowie uniforme Multipllets (s. Inset). (C) Einzelstrang-Konformationsanalyse von Exon 3 des *KCNQ2*-Gens. Spur 1: nicht-betroffenes Individuum, Spur 2: BFNC/Myokymie-Patient, eine zusätzliche Bande ist sichtbar. (D) Diagnostischer Restriktionsverdau mit *AclI* von Exon 3 des *KCNQ2*-Gens. Spur 1: nicht-betroffenes Individuum, Restriktionsfragmente von 62 bp, 67 bp und 84 bp. Die 62 bp- und die 67 bp-Bande erscheinen als eine Bande. Spur 2: BFNC/Myokymie-Patient, die zusätzliche Bande hat eine Größe von 76 bp. (E) Sequenzierung des dritten Exons von beiden *KCNQ2*-Allelen in einem BFNC/Myokymie-Patienten. Die C/T-Punktmutation wird durch einen Pfeil gezeigt.

adulten Maus angefertigt, die mit radioaktiv-markierten *antisense* RNA-Sonden aus *KCNQ2* und *KCNQ3* hybridisiert wurden. Die Sonden umfassten ca. 400 bp aus dem C-Terminus von *KCNQ2* und *KCNQ3*, in einem Bereich, in dem die Homologie zwischen beiden Proteinen

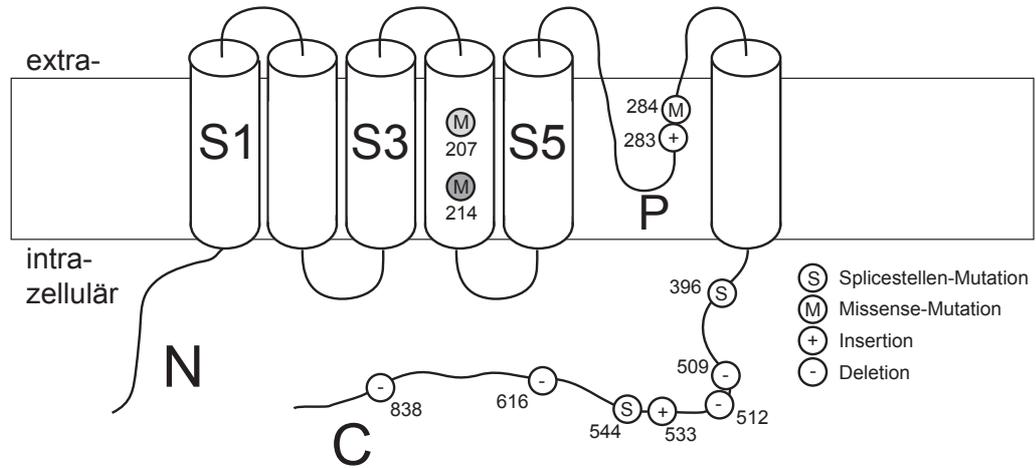


Abb. 3.7: Topologie-Modell des KCNQ2-Kanalproteins mit den Transmembransegmenten S1–6 und der Pore P. Gezeigt sind Mutationen in KCNQ2, die zu BFNC führen (Singh *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; Lerche *et al.*, 1999; Biervert und Steinlein, 1999; del Giudice *et al.*, 2000). Die Nummerierung bezieht sich auf den jeweils ersten mutierten Aminosäurerest. Die R207W-Mutation (hellgrau) betrifft ein Arginin in der Mitte des spannungssensitiven S4-Segments, während die kürzlich beschriebene R214W-Mutation (dunkelgrau) mehr zum Zytoplasma lokalisiert ist.

sehr gering ist. Hybridisierungssignale wurden für KCNQ2 im posterioren sowie im anterioren Horn und in der Zwischenzone detektiert (Abb. 3.8 A). Das Signal war im anterioren Horn, wo die Motoneurone lokalisiert sind, am stärksten. Die Hybridisierungssignale für KCNQ3 überlappten mit denen von KCNQ2 (Abb. 3.8 C). Allerdings schien die Färbung vor allem im anterioren Horn weniger intensiv als für KCNQ2. Als Kontrollen für die Spezifität der Signale dienten *sense* RNA-Sonden für KCNQ2 (Abb. 3.8 B) und KCNQ3 (Abb. 3.8 D).

3.2.4 Elektrophysiologische Analyse der R207W-Mutation in KCNQ2

Die R207W-Mutation betrifft die dritte von sechs positiven Ladungen im S4-Transmembransegment von KCNQ2. Dieses Transmembransegment stellt vermutlich den Spannungssensor in der Superfamilie der Kationenkanäle dar (Stühmer *et al.*, 1989). Erst kürzlich wurde eine andere S4-Mutation (R214W) in KCNQ2 beschrieben. Die Mitglieder der Familie mit dieser Mutation litten zwar an BFNC, erkrankten jedoch nicht an einer Myokymie (del Giudice *et al.*, 2000). Es wurden die Effekte der beiden Mutationen auf die KCNQ2-Ströme verglichen, um zu klären, ob unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften zu einer Assoziation der R207W-Mutation mit Myokymie führen könnten.

Beide S4-Mutationen wurden über gerichtete *in vitro* Mutagenese in die humane KCNQ2-cDNA eingeführt. Wildtyp (WT) und mutierte KCNQ2-Kanäle wurden in *Xenopus laevis* Oo-

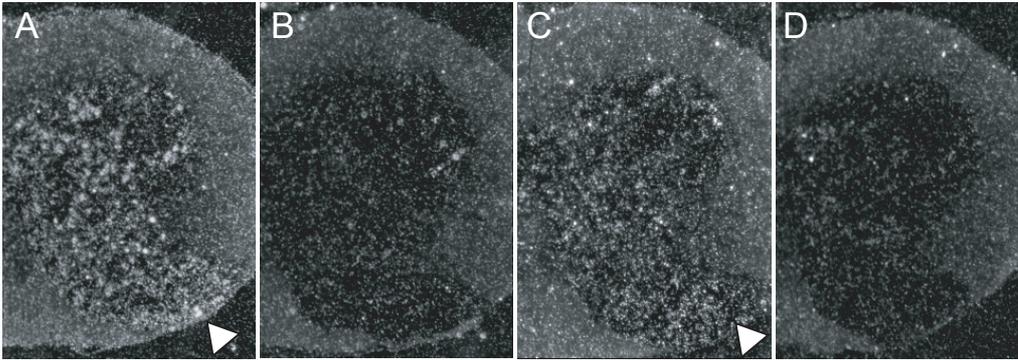


Abb. 3.8: *In situ* Hybridisierung an Rückenmarksschnitten der Maus. Gezeigt sind Hybridisierungen mit *antisense*-Proben (A und C) und *sense*-Kontrollen (B und D). (A und B) Die KCNQ2-Probe färbt die graue Substanz des Rückenmarks, mit starken Signalen im posterioren und anterioren Horn. (C und D) KCNQ3 wird ebenfalls im anterioren Horn exprimiert. Im posterioren Horn scheint die Expression schwächer als die von KCNQ2. Die Pfeile zeigen zum anterioren Horn des Rückenmarks.

zyten exprimiert. Dazu wurden sie entweder allein injiziert oder mit KCNQ3 koinjiziert. Ähnlich dem KCNQ2-WT (Abb. 3.9 A), ergaben beide S4-Mutanten Ströme, die bei Depolarisation aktivierten (Abb. 3.9 B, C). Verglichen mit KCNQ2-WT aktivierten die Ströme der R214W-Mutation und insbesondere die der R207W-Mutation jedoch erheblich langsamer. Die Aktivierung der R207W-Mutation erreichte selbst nach 2 s kein stabiles Gleichgewicht (*steady state*) (Abb. 3.9 B). Der zeitliche Verlauf der Kanalaktivierung bei Depolarisation wurde durch die Summe zweier Exponentialfunktionen ausgedrückt. Für einen Sprung auf +30 mV ergaben sich folgende Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 : $\tau_1 = 438 \pm 52$ ms und $\tau_2 = 74 \pm 4$ ms für KCNQ2-WT. $\tau_1 = 852 \pm 127$ ms und $\tau_2 = 187 \pm 7$ ms für R214W. $\tau_1 = 1566 \pm 111$ ms und $\tau_2 = 62 \pm 10$ ms für R207W. Außerdem wurde KCNQ2-WT mit der R207W-Mutation im cRNA-Verhältnis 1:1 exprimiert, um Heteromere aus KCNQ2-WT und -Mutante zu erzeugen, wie sie vermutlich in heterozygoten Patienten vorkommen. Die Kinetik der Aktivierung hatte eine mittlere Geschwindigkeit im Vergleich zu den Homomeren aus KCNQ2-WT und R207W-Mutante. Die Zeitkonstanten betragen $\tau_1 = 782 \pm 41$ ms und $\tau_2 = 84 \pm 2$ ms für KCNQ2-WT.

Des Weiteren wurde die scheinbare Offenwahrscheinlichkeit (p_{offen}) von KCNQ2-WT und beiden Spannungssensor-Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Oozyten bei einem Haltepotential von -80 mV in $+10$ mV Schritten auf Spannungen zwischen -80 und $+40$ mV geklemmt. Nach dieser Zeit hatte sich bei KCNQ2-WT und der R214W-Mutante ein Gleichgewicht eingestellt. Anschließend folgte ein Spannungssprung auf -30 mV, der sogenannte *tail currents* evoziert. Die unmittelbar nach dem Spannungssprung gemessene Amplitude der *tail currents* bei -30 mV ist proportional zur Anzahl der offenen Kanäle. Die *tail currents* wurden auf den Zeitpunkt $t = 0$ extrapoliert, indem sie mit monoexponentiellen Funktionen gefittet

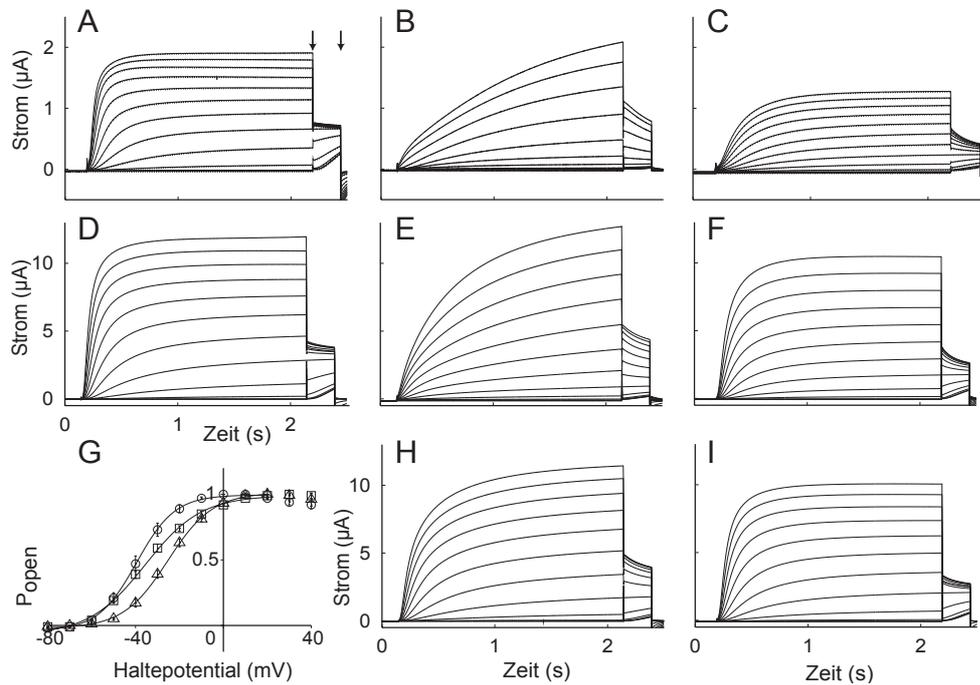


Abb. 3.9: Elektrophysiologische Eigenschaften von KCNQ2 und den beiden S4-Mutationen. KCNQ2 und seine Mutanten wurden entweder allein (A-C) oder zusammen mit KCNQ3 (D-I) in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Die Ströme wurden mit der Zwei-Elektroden *Voltage-clamp* Technik aufgenommen. Von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Oozyten für 2 s auf Spannungen zwischen -80 und $+40\text{ mV}$ in $+10\text{ mV}$ Schritten geklemmt. Es folgte ein Sprung auf -30 mV . (A-C) Typische Stromkurven von KCNQ2 (A) und seinen R207W- (B) und R214W-Mutanten (C). (D-F) Repräsentative Stromkurven bei Koexpression von KCNQ2 und seinen Mutanten mit KCNQ3 im cRNA-Verhältnis 1:1. Ähnliche Ströme wie in A-F wurden für jeweils mindestens 12 Oozyten aus 2-3 verschiedenen Oozytenpräparationen erhalten. (G) Scheinbare Offenwahrscheinlichkeit (p_{offen}) von KCNQ2/KCNQ3 als eine Funktion der Spannung, bestimmt durch Analyse der *tail currents* (s. Pfeile in A), nachdem sich die Ströme bei gegebener Spannung nicht mehr veränderten (*steady state*). Wegen der Unterschiede in der Aktivierungskinetik zwischen Wildtyp und Mutanten betrug die Dauer der Spannungssprünge 2 s für KCNQ2 und R214W und 6 s für die R207W-Mutante. Durch Boltzmann-Fits der Daten ergaben sich folgende Werte für V_{50} : KCNQ2/KCNQ3: $-38,4 \pm 1,2\text{ mV}$ (Kreise); R207W/KCNQ3: $-24,4 \pm 0,5\text{ mV}$ (Dreiecke); KCNQ2/R207W/KCNQ3: $-33,1 \pm 1\text{ mV}$ (Quadrate). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben, wobei $n \geq 7$, aus mindestens zwei verschiedenen Oozytenpräparationen. (H-I) Typische Stromkurven von KCNQ2 + R207W (H) und KCNQ2 + R214W (I) bei Koexpression mit KCNQ3 im cRNA-Verhältnis 1:1:2.

wurden. Die so erhaltenen Amplituden wurden auf die Maximalamplitude der Ströme, die bei 0 mV erreicht war, normiert. Auf diese Weise konnte die relative scheinbare Offenwahrschein-

lichkeit der Kanäle in Abhängigkeit von der Spannung bestimmt werden. Bei der R207W-Mutante war nach 2 s kein Gleichgewicht erreicht (Abb. 3.9 B), so dass die Dauer der Spannungssprünge auf 6 s verlängert und dann p_{offen} bestimmt wurde. Die Spannungsabhängigkeit der scheinbaren Offenwahrscheinlichkeit von KCNQ2 R207W war im Vergleich zu KCNQ2-WT um ca. 30 mV zu positiveren Potentialen verschoben. Heteromere aus KCNQ2-WT und R207W-Mutanten hatten eine mittlere Spannungsabhängigkeit verglichen mit den Homomeren. Spannungswerte der halbmaximalen Aktivierung (V_{50}) sind der Legende zu Abb. 3.9 zu entnehmen.

Da KCNQ2 und KCNQ3 heteromere Kanäle bilden können (Schroeder *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a; Yang *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000), wurde der Effekt der S4-Mutationen auch bei Koexpression mit KCNQ3 untersucht (Abb. 3.9 D-F). Wie bereits beschrieben (Schroeder *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a; Yang *et al.*, 1998; Schwake *et al.*, 2000), führte die Koinjektion von KCNQ2 und KCNQ3 zu einer starken Erhöhung der Stromamplitude (Abb. 3.9 D). Das traf auch für beide Spannungssensor-Mutanten zu (Abb. 3.9 E und F). Beide Mutationen verlangsamten auch bei Koexpression mit KCNQ3 die Aktivierung der Kanäle. Die halbmaximale scheinbare Offenwahrscheinlichkeit war bei Koexpression von R207W mit KCNQ3 um ca. 15 mV zu positiveren Potentialen verschoben (Abb. 3.9 G). Heteromere aus KCNQ2 und KCNQ3 können in heterozygoten Patienten sowohl WT als auch mutierte KCNQ2-Untereinheiten im selben tetrameren Kanalkomplex beinhalten. Um diese Situation zu simulieren, wurde KCNQ3 mit KCNQ2-WT und R207W koinjiziert. Das cRNA-Verhältnis betrug dabei 2:1:1 (Abb. 3.9 H und I). Für diese heteromeren Kanäle verschob sich die halbmaximale scheinbare Offenwahrscheinlichkeit um ca. +5 mV im Verhältnis zu KCNQ2-WT/KCNQ3-Heteromeren. Die Spannungswerte der halbmaximalen Aktivierung (V_{50}) sind der Legende zu Abb. 3.9 zu entnehmen. Die Aktivierung der Kanäle war auch bei dieser Koinjektion langsamer als bei KCNQ2-WT/KCNQ3-Heteromeren: Für einen Sprung auf +30 mV ergaben sich folgende Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 : $\tau_1 = 319 \pm 20$ ms und $\tau_2 = 47 \pm 4$ ms für KCNQ2-WT/KCNQ3. $\tau_1 = 819 \pm 53$ ms und $\tau_2 = 178 \pm 24$ ms für R207W/KCNQ3. $\tau_1 = 702 \pm 56$ ms und $\tau_2 = 88 \pm 9$ ms für KCNQ2-WT/R207W/KCNQ3 im Verhältnis 1:1:2.

Die R207W-Mutation hatte also zwei wesentliche Effekte: Erstens verschob sie die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen und zweitens verlangsamte sie die Aktivierung bei Depolarisation. Qualitativ ähnlich, aber weniger stark sind die Effekte bei Koexpression mit KCNQ2-WT und KCNQ3. Die R214W-Mutation hatte eine ähnliche, aber geringere Wirkung im Vergleich zur R207W-Mutation.

Das Ausmaß der Stromreduktion durch Kanäle mit der R207W-Mutante hängt stark von der Dauer der Depolarisation ab. Nach starken und langen Depolarisationen sind die Ströme nicht kleiner, sondern sogar größer als bei KCNQ2-WT (Abb. 3.9 C, F und I). Aber durch die deutlich langsamere Aktivierung der R207W-Mutante ist die Situation bei kurzen Depolarisationen, die physiologischer sind als lange Depolarisationen, anders. In Abb. 3.10 A-C wurden die Ströme für KCNQ2-WT und die beiden S4-Mutanten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Depolarisation betrachtet. Es wurden die Amplituden bei einer Spannung von 0 mV analy-

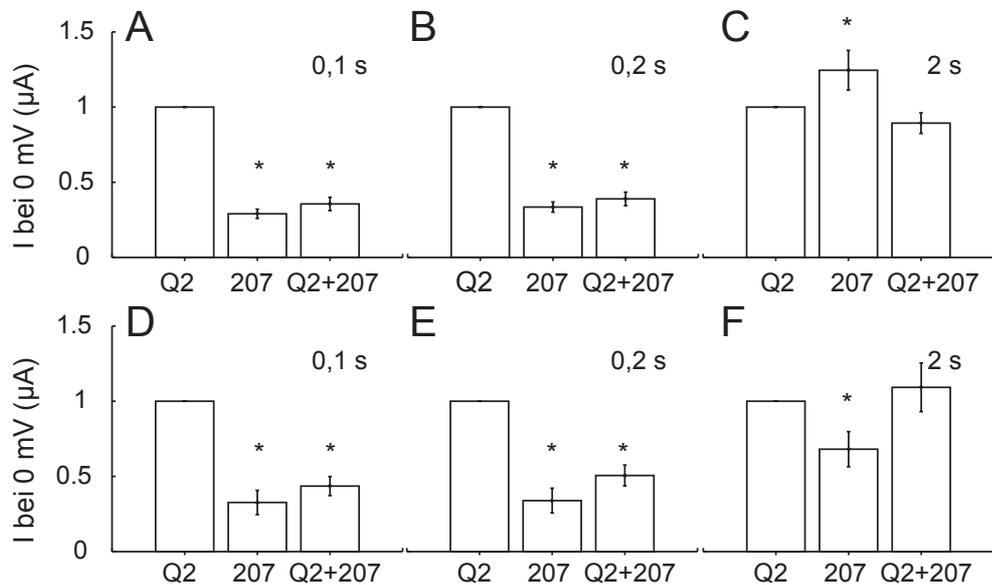


Abb. 3.10: Stromamplituden von KCNQ2 und den beiden S4-Mutationen. (A-C) Stromamplituden bei 0 mV, normalisiert auf KCNQ2, für KCNQ2 (links), R207W (mitte) und für KCNQ2/R207W (rechts) bei Koexpression im cRNA-Verhältnis 1:1. Gezeigt sind verschiedene Zeitpunkte nach Beginn der Depolarisation. Der Stromverlust durch die R207W-Mutation ist bei kurzen Depolarisationen größer als bei langen Depolarisationen. Hier hat die R207W-Mutation einen dominant-negativen Effekt auf den KCNQ2-Strom. Bei langen, starken Depolarisationen, z. B. nach 2 s (C), können die Ströme der R207W-Mutation größer als die WT-KCNQ2-Ströme sein. (D-F) ähnlich wie A-C, aber bei Koexpression mit KCNQ3 im Verhältnis 1:1, bzw. bei Koexpression von KCNQ2 und R207W zusammen mit KCNQ3 im Verhältnis 1:1:2, um den heterozygoten Zustand der Patienten zu simulieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Sterne bezeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu WT-Strömen.

siert, da diese Spannung *in vivo* während eines Aktionspotentials erreicht werden kann. Nach einer 2 s langen Depolarisation war bei Koexpression von KCNQ2-WT und R207W-Mutante nur eine leichte Abnahme der Amplitude zu beobachten (Abb. 3.10 C). Betrachtete man jedoch kürzere Zeitpunkte (100 und 200 ms) nach der Depolarisation, wie sie bei einer kurzen Serie von Aktionspotentialen vorkommen können, so war die Reduktion der Stromamplitude erheblich höher als bei allen anderen bisher untersuchten BFNC-Mutationen (Schroeder *et al.*, 1998). Da die R207W-Mutante die Stromamplitude auch in Koexpression mit KCNQ2-WT um mehr als 50 % reduzierte, handelt es sich um einen dominant-negativen Effekt der R207W-Mutante auf KCNQ2. Abb. 3.10 D-F zeigt ähnliche Experimente bei Koexpression mit KCNQ3. Auch hier ist die Stromreduktion durch die R207W-Mutante bei kurzen Depolarisationen stärker als bei langen. R207W hat auch bei Koexpression mit KCNQ3 einen dominant-negativen Effekt auf die Stromamplitude von KCNQ2-WT.

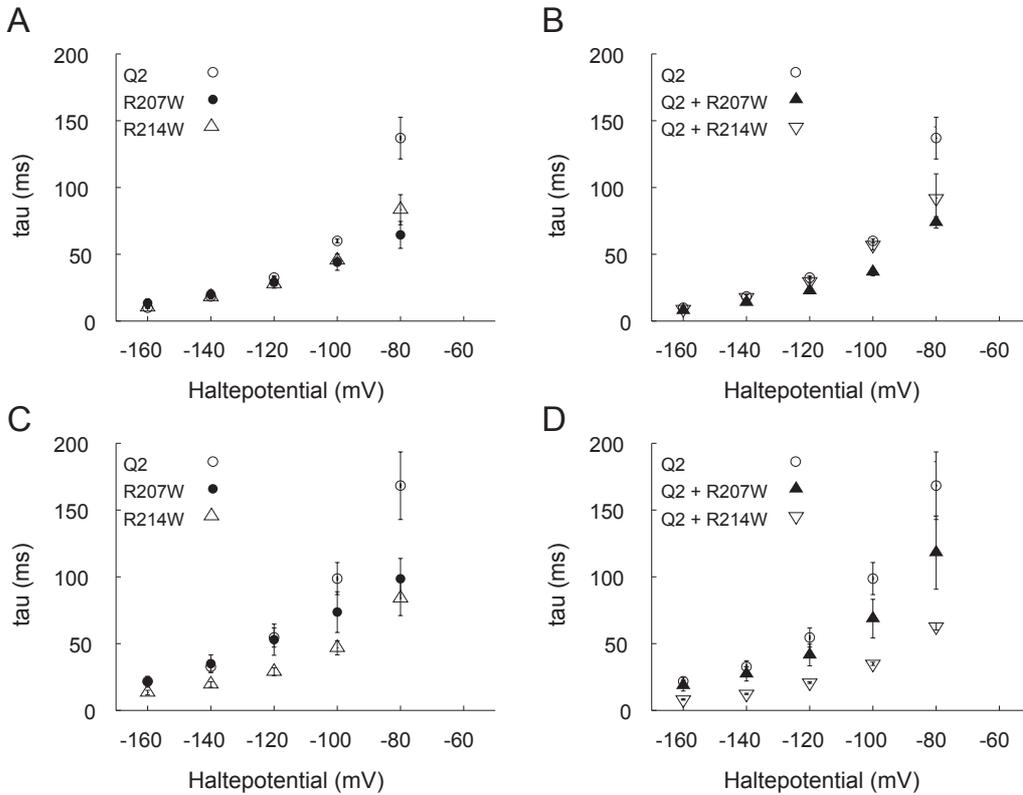


Abb. 3.11: Zeitkonstanten (τ) der Deaktivierung von KCNQ2 und den beiden S4-Mutationen R207W und R214W allein (**A** und **B**) oder bei Koexpression mit KCNQ3 (**C** und **D**). Bei Expression in *Xenopus* Oozyten ohne KCNQ3 deaktivierte die R207W-Mutation bei Spannungen von -100 und -80 mV am schnellsten (**A**). Bei Koexpression mit KCNQ3 wies die R214W-Mutation die niedrigste Zeitkonstante der Deaktivierung auf. Die R207W-Mutation hatte zwar bei Koexpression mit KCNQ3 bei -100 mV eine niedrigere Zeitkonstante als WT-KCNQ2 ($\tau = 99 \pm 12$ mV für KCNQ2-WT, $\tau = 74 \pm 15$ mV für R207W), die Deaktivierung war jedoch langsamer als bei der R214W-Mutation ($\tau = 47 \pm 5$ mV für R214W) (**C**). Die Koexpression der R207W- bzw. R214W-Mutation mit WT-KCNQ2 im Verhältnis 1:1 bzw. 1:1:2 bei Koexpression mit KCNQ3 verlangsamte die Deaktivierung beider Mutanten nicht (**B** und **D**). Die Zeitkonstanten wurden aus monoexponentiellen Fits der *tail currents* ermittelt, die durch folgendes Spannungsprotokoll erzeugt wurden: Vom Haltepotential bei -80 mV wurden die Oozyten für 2 s auf $+40$ mV gehalten und anschließend für 250 ms auf Werte von -160 mV bis -80 mV in $+20$ mV-Schritten geklemmt. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben, wobei $n \geq 7$, aus mindestens zwei verschiedenen Oozytenpräparationen.

Zusätzlich zur Aktivierungskinetik, Spannungsabhängigkeit und Stromgröße wurde die Deaktivierungskinetik von KCNQ2 und den Spannungssensor-Mutanten betrachtet. Die Zeitkonstanten wurden aus monoexponentiellen Fits der *tail currents* ermittelt, die durch folgendes

Spannungsprotokoll erzeugt wurden: Vom Haltepotential bei -80 mV wurden die Oozyten für 2 s auf $+40$ mV gehalten und anschließend für 250 ms auf Werte von -160 mV bis -80 mV in $+20$ mV-Schritten geklemmt. Homomere Kanäle aus den S4-Mutanten deaktivierten bei höheren Spannungen (-80 und -100 mV) schneller als Homomere aus KCNQ2-WT, wobei die Deaktivierung bei der R207W-Mutation am schnellsten erfolgte (Abb. 3.11 A). Ähnliches zeigte sich auch für die Koexpression von KCNQ2 mit beiden S4-Mutanten (Abb. 3.11 B). Koexprimierte man jedoch beide Spannungssensor-Mutanten mit KCNQ3, wiesen Kanäle mit der R214W-Mutation bei Depolarisationen ab -140 mV die schnellste Deaktivierungskinetik auf (Abb. 3.11 C). Heteromere aus KCNQ3 und R207W deaktivierten erst ab einer Spannung von -100 mV schneller als KCNQ2-WT/KCNQ3-Heteromere und waren dabei langsamer als Heteromere mit R214W (Abb. 3.11 C). Auch bei Koexpression von KCNQ3, KCNQ2-WT und R214W im cRNA-Verhältnis 2:1:1 war die Deaktivierungskinetik deutlich schneller als bei den WT-Heteromeren (Abb. 3.11 D). Ähnliches galt auch für Koexpressionsexperimente gleicher Art mit der R207W-Mutante (Abb. 3.11 D).

3.2.5 Oberflächenexpression der R207W-Mutation in KCNQ2

Wie unter 3.2.4 dargestellt, führte die R207W-Mutation im Spannungssensor von KCNQ2 bei kurzen Depolarisationen zu verringerten Stromamplituden im Vergleich zu KCNQ2-WT (Abb. 3.10). Einerseits könnte diese Verringerung der Stromamplitude mit der langsamen Aktivierung der Kanäle sowie der geänderten Spannungsabhängigkeit der scheinbaren Offenwahrscheinlichkeit zusammenhängen. Andererseits könnte auch eine verringerte Oberflächenexpression der mutierten Proteine für die Verringerung der Stromamplitude verantwortlich sein. Denn die Stromamplitude von makroskopischen Strömen hängt von drei Faktoren ab: 1. der Offenwahrscheinlichkeit der Einzelkanäle, 2. der Leitfähigkeit der Einzelkanäle und 3. der Anzahl der Kanäle in der Membran. Schwake *et al.* (2000) konnten zeigen, dass KCNQ2 mit einer BFNC-Mutation, die das Protein im C-terminalen Bereich verkürzt, nicht an die Oberfläche der Oozytenmembran gelangt, was zur Verringerung der Stromamplitude im heterozygoten Patienten führt. Bei *Missense*-Mutationen im Porenbereich bzw. 6. Transmembransegment von KCNQ2 bzw. KCNQ3 war die Oberflächenexpression der mutierten Proteine hingegen mit der der WT-Kanäle vergleichbar.

Um den Einfluss der beiden Spannungssensor-Mutanten auf die Oberflächenexpression von KCNQ2 zu klären, wurde eine Oberflächenbiotinylierung von *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Dabei wurden KCNQ2-WT und die beiden S4-Mutanten mit KCNQ3 koexprimiert, in das ein extrazelluläres HA-Epitop eingefügt wurde (KCNQ3-HA). Da KCNQ2 und KCNQ3 *in vitro* mit einer Stöchiometrie von 1:1 Heteromere bilden (Schwake *et al.*, 2000), entspricht die Oberflächenexpression von KCNQ3-HA der von KCNQ2. Um eventuelle Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften von KCNQ3 wie Spannungsabhängigkeit, Ionenselektivität, Schalten und Gleichrichtung zu vermeiden, die das Einfügen des Epitops zwischen die Transmembransegmente S3 und S4 bzw. S5 und S6 verursachen könnte, wurde das HA-Epitop zwischen die Transmembransegmente S1 und S2 eingefügt. Der extrazelluläre Bereich zwischen

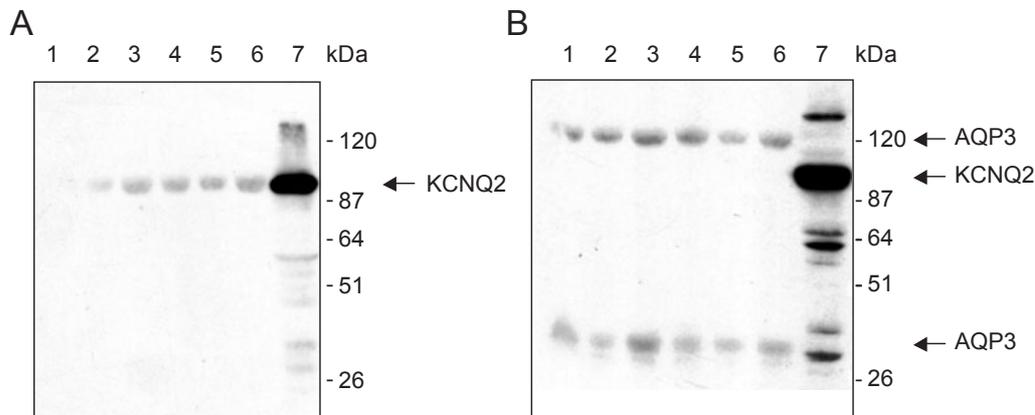


Abb. 3.12: Oberflächenexpression von KCNQ2 und den beiden S4-Mutationen R207W und R214W bei Koexpression mit KCNQ3, in das ein HA-Epitop eingeführt wurde (KCNQ3-HA). Bei Koexpression von KCNQ2-WT und den S4-Mutationen mit KCNQ3-HA war das RNA-Verhältnis 1:1, bei Koexpression von KCNQ2-WT mit den S4-Mutationen und KCNQ3-HA betrug das RNA-Verhältnis 1:1:2. Es wurden jeweils insgesamt 10 ng RNA injiziert. (A) Nach der Biotinylierung von Oberflächenproteinen in der Membran von *Xenopus* Oozyten wurde ein Western Blot durchgeführt und mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop inkubiert. Es wurden ca. 1,25 Oozyten pro Spur (1-6) geladen. Der monoklonale HA-Antikörper (3F10, Boehringer) erkannte eine Bande mit einer Größe von ca. 98 kDa, was dem Molekulargewicht von KCNQ2 entspricht. Als Negativkontrolle (1) dienten Oozyten, die mit KCNQ2 und KCNQ3 ohne HA-Epitop injiziert wurden. Hier detektierte der HA-Antikörper keine Bande. Als Positivkontrolle (7) wurde ein Totallysat aus COS7-Zellen verwendet, die mit KCNQ2 und KCNQ3-HA transfiziert wurden. Die Oberflächenexpression bei Koexpression mit KCNQ3-HA ist für KCNQ2 und die S4-Mutanten etwa gleich. (B) Um die Ladung gleicher Proteinmengen zu kontrollieren, wurde der Western Blot gestrippt und mit einem Antikörper gegen Aquaporin 3 (AQP3) inkubiert, da AQP3 in der Zellmembran von *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wird (Schreiber *et al.*, 2000). Der Antikörper detektierte zwei Banden, wobei erste (ca. 31 kDa) wahrscheinlich dem AQP3-Monomer und die zweite (ca. 120 kDa) wahrscheinlich dem Tetramer von AQP3 entsprach (Roudier *et al.*, 2002). Die Bande von KCNQ3-HA war in dem Totallysat aus COS7-Zellen (Spur 7) so stark, dass sie dem Strippen des Western Blots widerstand. Der AQP3-Antikörper detektierte hier keine Bande. 1: KCNQ2 + KCNQ3; 2: KCNQ2 + KCNQ3-HA; 3: KCNQ2 R207W + KCNQ3-HA; 4: KCNQ2 R214W + KCNQ3-HA; 5: KCNQ2 + KCNQ2 R207W + KCNQ3-HA; 6: KCNQ2 + KCNQ2 R214W + KCNQ3-HA; 7: KCNQ2 + KCNQ3-HA.

S1 und S2 ist bei KCNQ3 mit neun Aminosäuren sehr kurz. Daher wurden zusätzliche Aminosäuren an beiden Seiten des Epitops angehängt, um die Zugänglichkeit des Epitops für den Antikörper zu gewährleisten. Diese Aminosäuren stammten aus der extrazellulären Domäne des humanen Chloridkanals ClC-5, da dieser Kanal mit einem HA-Epitop in diesem Abschnitt elektrophysiologische Eigenschaften hat, die denen des Wildtyps entsprechen (Schwake *et al.*,

2001). Bei Koexpression von KCNQ2-WT und KCNQ3-HA waren die wesentlichen Eigenschaften der Heteromere, wie Aktivierung, Rektifizierung und Ionenselektivität, unverändert. Allerdings erreichten KCNQ2-WT/KCNQ3-HA-Heteromere nur 50–70 % der Stromamplitude von KCNQ2-WT/KCNQ3-Heteromeren (Schwake *et al.*, 2000).

Bei der Oberflächenbiotinylierung von *Xenopus* Oozyten bindet Biotin kovalent an die Oberflächenproteine der Oozytenmembran. Die biotinylierten Proteine wurden über Streptavidin-Beads aufgereinigt, mit einer SDS-PAGE getrennt und über einen Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das eingefügte HA-Epitop detektiert. Als Negativ-Kontrolle wurden Oozyten mit KCNQ2-WT und KCNQ3 ohne HA-Epitop injiziert (Abb. 3.12 A, Spur 1). Der monoklonale HA-Antikörper detektierte keine Bande. Als Positiv-Kontrolle diente ein Totallysate aus COS7-Zellen, die mit KCNQ2 und KCNQ3-HA transfiziert worden waren (Abb. 3.12 A, Spur 7). Hier erkannte der HA-Antikörper eine Bande mit einer Größe von ca. 98 kDa. Das entspricht etwa dem Molekulargewicht von KCNQ3. Die Koexpression von KCNQ3-HA mit den Spannungssensor-Mutanten von KCNQ2 (Abb. 3.12 A, Spur 3 und 4) änderte die Oberflächenexpression von KCNQ3-HA im Vergleich zur Koexpression mit KCNQ2-WT (Abb. 3.12 A, Spur 2) nicht. Heteromere aus R207W und KCNQ3-HA wiesen in etwa die gleiche Oberflächenexpression auf wie Heteromere aus R214W und KCNQ3-HA. Auch die Koexpression der Mutanten mit KCNQ2-WT und KCNQ3-HA im cRNA-Verhältnis 1:1:2 hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der KCNQ3-HA-Kanäle an der Zelloberfläche (Abb. 3.12 A, Spur 5 und 6). Um auszuschließen, dass unterschiedliche Proteinmengen geladen wurden und etwaige Unterschiede in der Oberflächenexpression der Kaliumkanaluntereinheiten verdeckten, wurde der Western Blot mit einem Antikörper gegen Aquaporin 3 (AQP3) inkubiert (Abb. 3.12 B). AQP3 wird in der Zellmembran von *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert (Schreiber *et al.*, 2000) und ist daher als Kontrolle für gleiche Proteinmengen (Spuren 1–6) gut geeignet. Es wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Menge an geladenem Protein festgestellt (Abb. 3.12 B).

3.2.6 Effekt der S4-Mutation auf die Offenwahrscheinlichkeit anderer KCNQ-Kanäle

Zusammen mit der kürzlich beschriebenen R214W-Mutation (del Giudice *et al.*, 2000) ist die R207W-Mutation die einzige bekannte KCNQ2-Mutation, die sich im Spannungssensor (S4) von KCNQ2 befindet (Abb. 3.7). Beide Mutationen substituieren positiv geladene Arginine, die über große hydrophobe Reste direkt das elektrische Feld über der Membran detektieren (Stühmer *et al.*, 1989). Entsprechend führen beide Mutationen zu einer Veränderung des spannungsabhängigen Schaltens von KCNQ2. Der Effekt der zentraler gelegenen R207W-Mutation (Abb. 3.7) ist dabei stärker als die Auswirkung von R214W (Abb. 3.9). R207W führt zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu positiveren Potentialen und zu einer drastischen Verlangsamung der Aktivierung von KCNQ2. Oberflächlich ähnelt der Effekt der R207W-Mutation auf KCNQ2 der Modulation des KCNQ1-Stroms durch die β -Untereinheit KCNE1. KCNE1 bewirkt eine starke Verlangsamung der Aktivierung von KCNQ1 und eine

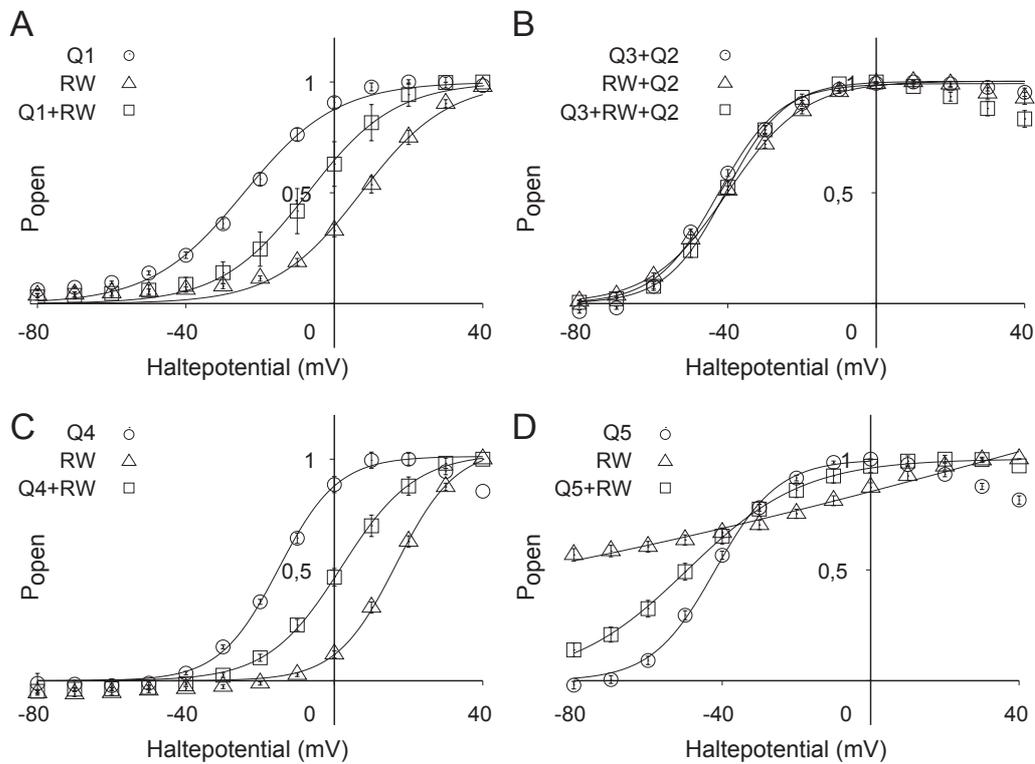


Abb. 3.13: Effekt der S4-Mutation auf die scheinbare Offenwahrscheinlichkeit von KCNQ1, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5. Die S4-Mutation R207W in KCNQ2 wurde an homologer Stelle in die anderen KCNQ-Kanäle eingeführt. Daraus entstanden folgende Konstrukte: KCNQ1 R142W, KCNQ3 R236W, KCNQ4 R213W und KCNQ5 R170W. Diese Konstrukte wurden entweder allein oder zusammen mit den WT-Kanälen in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Ströme wurden mit der Zwei-Elektroden- *Voltage-clamp*-Technik aufgenommen. Von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Oozyten für 2 s auf Spannungen zwischen -80 und $+40$ mV in $+10$ mV Schritten geklemmt. Es folgte ein Sprung auf -30 mV, aus dem die scheinbare Offenwahrscheinlichkeit (p_{offen}) als eine Funktion der Spannung bestimmt wurde. Die S4-Mutation führte in KCNQ1 und KCNQ4 (A und C) zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu positiveren Potentialen. Eine solche Verschiebung war bei KCNQ3 nicht zu beobachten. Bei Koexpression der S4-Mutation mit KCNQ2-WT änderte sich die scheinbare Offenwahrscheinlichkeit im Vergleich zum Wildtyp nicht (B). In KCNQ5 führte die S4-Mutation zu einem permanent offenen Kanal (D). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben, wobei $n \geq 5$ aus mindestens zwei verschiedenen Oozytenpräparationen. RW bezeichnet die jeweilige S4-Mutation.

Erhöhung der Stromamplitude bei langanhaltenden Depolarisationen. So bilden Heteromere aus KCNQ1 und KCNE1 den langsam-aktivierenden einwärts-gleichrichtenden Kaliumstrom I_{Ks} in Herzmuskelzellen (Sanguinetti *et al.*, 1996; Barhanin *et al.*, 1996) und den Marginalzellen der *Stria vascularis* (Sakagami *et al.*, 1991). Wegen dieser Analogie lag es nahe, den Effekt

der R207W-Mutation auf die anderen Mitglieder der KCNQ-Familie zu überprüfen. Dazu wurde die R207W-Mutation an homologer Stelle durch gerichtete *in vitro* Mutagenese in die cDNA von KCNQ1, KCNQ3, KCNQ4 und KCNQ5 eingeführt. Daraus entstanden folgende Konstrukte: KCNQ1 R142W, KCNQ3 R236W, KCNQ4 R213W und KCNQ5 R170W. Diese Konstrukte wurden entweder allein oder zusammen mit den WT-Kanälen in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Es wurden die Aktivierungskinetik sowie die scheinbare Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle (s. 3.2.4) bestimmt. Unerwarteterweise verhielt sich die Spannungssensor-Mutation in den verschiedenen KCNQ-Kanälen nicht uniform. In KCNQ1 R142W und KCNQ4 R213W war die Aktivierung des Kanals leicht verlangsamt, und die Spannungsabhängigkeit beider Kanäle war deutlich zu positiveren Potentialen verschoben (Abb. 3.13 A und C). Das war auch bei Koexpression der mutierten Untereinheiten mit den WT-Homomeren der Fall. KCNQ3 wurde zusammen mit KCNQ2-WT exprimiert, da KCNQ3 allein in *Xenopus laevis* Oozyten nur sehr kleine Ströme liefert (Schroeder *et al.*, 1998). In KCNQ3, dessen Schaltverhalten im Vergleich zu KCNQ2 schnell ist, veränderte die R236W-Mutation die Spannungsabhängigkeit des Kanals nicht (KCNQ2/KCNQ3-WT: $V_{50} = 43 \pm 0,4$ mV, KCNQ2/KCNQ3 R236W: $V_{50} = 41 \pm 0,5$ mV). Lediglich die Aktivierung war leicht durch die R236W-Mutation verlangsamt (KCNQ2/KCNQ3-WT: $\tau_1 = 374 \pm 35$ ms, $\tau_2 = 67 \pm 4$ ms; KCNQ2/KCNQ3 R236W: $\tau_1 = 455 \pm 15$ ms, $\tau_2 = 51 \pm 1$ ms für einen Sprung auf +30 mV). In KCNQ5 R170W, dessen Schaltverhalten langsam im Vergleich zu KCNQ2 oder KCNQ3 ist, verhinderte die Mutation das Schalten des Kanals nahezu vollständig. Die Expression von KCNQ5 R170W führte zu einem Kanal mit einer nahezu linearen Spannungsabhängigkeit (Abb. 3.13) und einer zeitunabhängigen Aktivierung.

3.3 Elektrophysiologische Analyse von Mausmodellen für eine progrediente Ertaubung (DFNA2)

Der Kaliumkanal KCNQ4 wird vor allem im Innenohr und im Gehirn exprimiert (Kubisch *et al.*, 1999). Im Gehirn ist die Expression im wesentlichen auf bestimmte Kerne im Hirnstamm reduziert, die eine Rolle im zentralen auditorischen Verarbeitungsweg spielen (Kharkovets *et al.*, 2000). Im Innenohr lokalisiert KCNQ4 einerseits in Vestibularzellen des Typ I und andererseits im Cortischen Organ (Kharkovets *et al.*, 2000). Dabei ist umstritten, ob KCNQ4 sowohl in äußeren als auch in inneren Haarzellen des Cortischen Organs vorkommt (Beisel *et al.*, 2000), oder ob die Expression von KCNQ4 weitgehend auf die äußeren Haarzellen beschränkt ist (Kubisch *et al.*, 1999; Kharkovets *et al.*, 2000). In den äußeren Haarzellen konstituiert KCNQ4 möglicherweise den sogenannten $I_{K,n}$ -Strom, der eine starke K^+ -Leitfähigkeit in Nähe des Ruhemembranpotentials aufweist (Housley und Ashmore, 1992; Marcotti und Kros, 1999).

Mutationen in KCNQ4 führen zu einer autosomal dominant vererbten Form progredienter Ertaubung (DFNA2) (Coucke *et al.*, 1999; Kubisch *et al.*, 1999; Talebizadeh *et al.*, 1999; Van Hauwe *et al.*, 1999a), die bei den Betroffenen mit einer Schwerhörigkeit bei hohen Frequenzen beginnt und innerhalb von zehn Jahren nach Krankheitsbeginn zu einer absoluten

Taubheit führt (Kubisch *et al.*, 1999). Dabei wirken sich die Mutationen vermutlich dominant-negativ auf den Kaliumstrom aus. So führte die Koexpression von KCNQ4-WT und einer G285S-Mutation in der Pore des KCNQ4-Kanals zu einer 90%igen Reduktion des Kaliumstroms in *Xenopus* Oozyten (Kubisch *et al.*, 1999). Der genaue Pathomechanismus der Ertaubung ist ungeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass der Verlust von KCNQ4 in den äußeren Haarzellen zu einem verringerten basalen Efflux von K^+ führt, das durch apikale mechanosensitive Kanäle in die Zelle gelangt. Daraus könnte eine Überladung mit K^+ resultieren, die schließlich zur Degeneration der äußeren Haarzellen führt (Kharkovets *et al.*, 2000; Jentsch, 2000).

Um den Pathomechanismus der progredienten Ertaubung aufzuklären, wurden von Tatjana Kharkovets verschiedene Mausmodelle für DFNA2 hergestellt. Dabei handelt es sich erstens um eine KCNQ4-defiziente Maus ($KCNQ4^{-/-}$), bei der die Exone 6-8 von $KCNQ4$ deletiert wurden. Die Deletion führte zu einem Verlust der Porenregion, des 6. Transmembransegments und einem Bereich des angrenzenden C-Terminus. Zweitens wurde eine transgene Maus mit einer dominant-negativen Mutation (G285S) in der Pore des KCNQ4-Proteins hergestellt, um ein Modell zu generieren, das direkt der menschlichen Mutation entspricht (mit zwei mutierten Allelen: $KCNQ4-DN^{+/+}$; mit einem mutierten und einem gesunden Allel: $KCNQ4-DN^{+/-}$).

3.3.1 Erscheinungsbild und Hörvermögen

Das Erscheinungsbild der KCNQ4-defizienten und der transgenen Mäuse mit einer dominant-negativen KCNQ4-Mutation war normal. Die Tiere waren fertil, zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten und wiesen weder eine veränderte Geburtenrate noch eine geänderte Sterblichkeit im Vergleich zu den WT-Tieren auf. Insbesondere wurde kein vestibulärer Phänotyp, wie etwa das *circling behaviour*, festgestellt. Das Verhalten in einem Rotarod-Versuch, der als Maß für motorische und vestibuläre Fähigkeiten diente, war normal.

In Messungen am auditorischen Hirnstamm, die Dr. Hannes Maier an anästhesierten Mäusen durchführte, wurde jedoch ein signifikanter Hörverlust im Frequenzbereich von 5 kHz bei homozygoten KCNQ4-defizienten und transgenen Tieren ab einem Alter von ca. vier Wochen festgestellt. In diesem Alter wiesen die Tiere bereits Hörschwellen von ca. 55 dB ($KCNQ4^{-/-}$) bzw. 65 dB ($KCNQ4-DN^{+/+}$) auf, während die Hörschwellen von $KCNQ4^{+/+}$ und $KCNQ4^{+/-}$ bei ca. 25 dB lagen (Abb. 3.14 A). In $KCNQ4-DN^{+/-}$ war bei diesem Alter der Hörverlust noch nicht so prominent (ca. 30 dB) (Abb. 3.14 B). $KCNQ4-DN^{+/-}$ - und $KCNQ4^{-/-}$ -Tiere waren ab einem Alter von etwa sechs Monaten sehr schwerhörig (Abb. 3.14 A und B). In $KCNQ4-DN^{+/-}$ erfolgte die progrediente Ertaubung um ca. einen Monat langsamer (Abb. 3.14 B). In einem Alter von ca. zehn Monaten waren $KCNQ4^{-/-}$, $KCNQ4-DN^{+/-}$ - und $KCNQ4-DN^{+/+}$ -Tiere nahezu taub. Sie wiesen ca. 50-60 dB höhere Hörschwellen auf als die WT-Tiere. Dabei waren die Hörschwellen für $KCNQ4^{-/-}$ -Tiere signifikant niedriger als für die $KCNQ4-DN^{+/+}$. Die Ausschaltung des $KCNQ4$ -Gens sowie die Einführung einer dominant-negativen KCNQ4-Mutation haben also zu Mausmodellen für die progrediente autosomal dominant vererbte Ertaubung DFNA2 geführt.

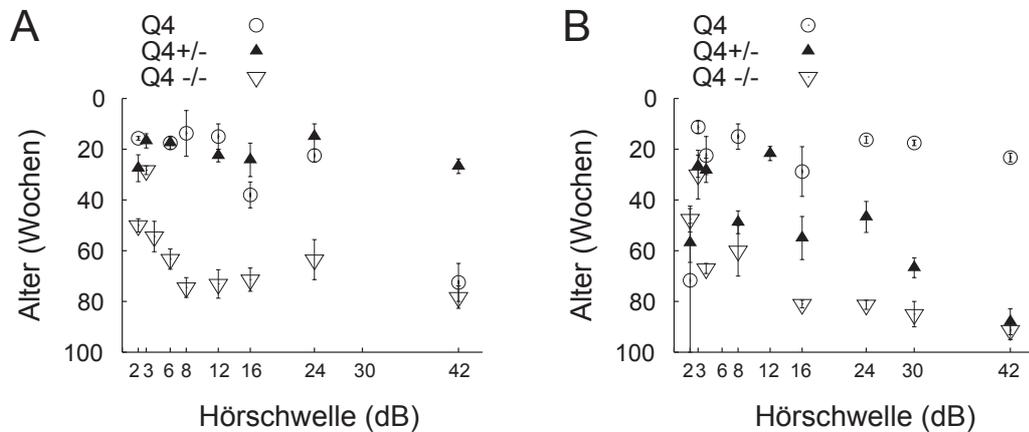


Abb. 3.14: Hörschwellen, gemessen von Dr. Hannes Maier, in Abhängigkeit vom Alter von *KCNQ4*^{+/+}-, *KCNQ4*^{+/-}- und *KCNQ4*^{-/-}-Tieren (A) und *KCNQ4*^{+/+}-, *KCNQ4-DN*^{+/-}- und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tieren (B). Die Hörschwellen wurden durch Messungen am auditorischen Hirnstamm bestimmt, die einen Frequenzbereich von 2-5 kHz abdeckten. Die Hörschwellen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Ab einem Alter von vier Wochen wiesen *KCNQ4*^{-/-}- und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tiere einen signifikanten Hörverlust auf, der sich mit zunehmendem Alter fast bis zur Taubheit verschlimmerte. Bei *KCNQ4-DN*^{+/-}-Tieren erfolgte der Hörverlust langsamer. Die Hörschwellen für 42 Wochen alte *KCNQ4*^{-/-}-Tiere waren signifikant niedriger als für *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tiere. Übernommen von Dr. Hannes Maier.

3.3.2 Expression von KCNQ4 im Cortischen Organ

Die Expression von KCNQ4 im Cortischen Organ der Mausmodelle wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen KCNQ4 untersucht (Kharkovets *et al.*, 2000). Durch Immunfluoreszenz an Kryoschnitten der Cochlea wurde von Tatjana Kharkovets die Lokalisation von KCNQ4 in WT-Tieren und in *KCNQ4*-defizienten Tieren überprüft (Abb. 3.15). Wie bereits beschrieben (Kharkovets *et al.*, 2000), lokalisierte KCNQ4 in WT-Tieren an den basalen Enden der äußeren Haarzellen im Cortischen Organ. Immunoreaktivität konnte in diesen Tieren weder in den umliegenden Stützzellen (Deiterszellen und Hensenzellen) noch in den inneren Haarzellen detektiert werden (Abb. 3.15 A und B). An Kryoschnitten der Cochlea von *KCNQ4*^{-/-}-Tieren wurde kein Signal des Antikörpers festgestellt (Abb. 3.15 C). Das bestätigte, dass die Deletion der Exone 6-8 im *KCNQ4*-Gen zu einem Verlust des KCNQ4-Proteins geführt hatte.

3.3.3 Das Ruhemembranpotential in den äußeren Haarzellen der Cochlea

Mehrere Untersuchungen legen nahe, dass KCNQ4 den $I_{K,n}$ der äußeren Haarzellen vermittelt. Zum einen ist $I_{K,n}$ ab dem postnatalen Tag P8 in den Zellen nachweisbar (Marcotti und Kros, 1999), was gut mit dem zeitlichen Expressionsmuster von KCNQ4 in den äußeren Haarzellen übereinstimmt (Kharkovets *et al.*, 2000). Zum anderen ist $I_{K,n}$ in sehr geringen Dosen

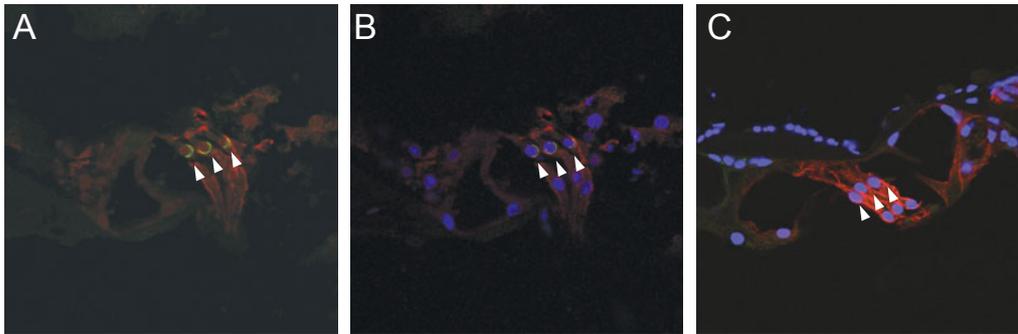


Abb. 3.15: Kryoschnitte der Cochlea wurden mit KCNQ4-Antikörpern (grün) und einem Antikörper gegen den Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC4 (rot) inkubiert. In (B und C) wurde zusätzlich eine TOTO-Färbung durchgeführt. Der KCNQ4-Antikörper färbte in 14 Tage alten *KCNQ4*^{+/+}-Tieren die basolaterale Membran der äußeren Haarzellen (A, Pfeile). Es wurde kein Signal in der inneren Haarzelle des Cortischen Organs entdeckt. In 21 Tage alten *KCNQ4*^{-/-}-Mäusen fehlte die Färbung in den äußeren Haarzellen. Die TOTO-Färbung zeigte jedoch sowohl in *KCNQ4*^{+/+}- als auch in *KCNQ4*^{-/-}-Mäusen die Zellkerne der drei äußeren Haarzellen (B und C, Pfeile). Wie bereits beschrieben, lokalisierte KCC4 in den Deiterszellen (Boettger *et al.*, 2002), die die äußeren Haarzellen umgeben und stützen. Übernommen von Tatjana Kharkovets.

($K_D = 0,7 \mu\text{M}$) durch den spezifischen KCNQ-Kanalblocker Linopirdin blockierbar. Unter Applikation dieses Inhibitors verschiebt sich das Ruhemembranpotential der äußeren Haarzellen zu stärker depolarisierten Potentialen (Marcotti und Kros, 1999). Wenn KCNQ4 den $I_{K,n}$ der äußeren Haarzellen vermittelt, sollte das Ruhemembranpotential der äußeren Haarzellen bei KCNQ4-defizienten Mäusen verändert sein. Um dies zu überprüfen wurden *Patch clamp* Messungen an den basalen Enden der äußeren Haarzellen durchgeführt. Dazu wurde die äußerste apikale Windung der Maus-Cochlea präpariert. Die Messungen erfolgten am semi-intakten Gewebe, wobei die Deiters- und Hensenzellen, die die äußeren Haarzellen umgeben und stützen, mit einer Saugpipette entfernt wurden. Nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration wurde gewartet, bis das Zellinnere mit der *Patch*-Pipettenlösung equilibrierte, und das Ruhemembranpotential bei konstanter Perfusion des Präparats mit 5,8 mM K^+ -haltiger Lösung gemessen. Abb. 3.16 zeigt die Ruhemembranpotentiale von äußeren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle. *KCNQ4*^{+/+} und *KCNQ4*^{+/-} wiesen nahezu die gleichen Ruhepotentiale in 5,8 mM K^+ auf ($V_R = -54 \pm 1 \text{ mV}$ bzw. $V_R = -53 \pm 1 \text{ mV}$). Die KCNQ4-defizienten und die transgenen Tiere mit der dominant-negativen Mutation im *KCNQ4*-Gen hatten jedoch ein um ca. 10-17 mV positiveres Ruhemembranpotential. Die Unterschiede zwischen diesen drei Genotypen ($V_R = -41 \pm 1 \text{ mV}$ für *KCNQ4*^{-/-}; $V_R = -43 \pm 2 \text{ mV}$ für *KCNQ4-DN*^{+/-} und $V_R = -37 \pm 2 \text{ mV}$ für *KCNQ4-DN*^{+/+}) waren nicht signifikant. Der Verlust von funktionellen KCNQ4-Kanälen führte also in den Mausmodellen für DFNA2 zu einer Depolarisation der äußeren Haarzellen. Die dominant-negative Mutation hatte dabei einen ähnlichen Effekt wie der totale Verlust des funktionellen Kanalproteins im *KCNQ4*^{-/-}. Das

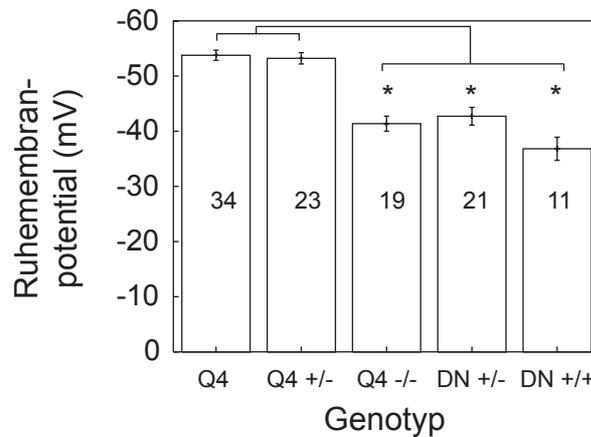


Abb. 3.16: Ruhemembranpotential von äußeren Haarzellen in 5,8 mM K^+ bei verschiedenen Mausmodellen für DFNA2. Mit der *Patch clamp* Technik wurde nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration gewartet, bis das Zellinnere mit der Pipettenlösung equilibriert war, um das Ruhemembranpotential zu messen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben, die Sterne bezeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$). Die Zahl der Zellen pro Genotyp ist den Balken zu entnehmen. Äußere Haarzellen von $KCNQ4^{+/+}$ und $KCNQ4^{+/-}$ wiesen signifikant niedrigere Ruhemembranpotentiale auf als $KCNQ4^{-/-}$, $KCNQ4-DN^{+/-}$ und $KCNQ4-DN^{+/+}$. Die Unterschiede zwischen den drei letztgenannten Genotypen waren nicht signifikant.

deutet darauf hin, dass $KCNQ4$ eine Leitfähigkeit darstellt, die einen wesentlichen Anteil am Ruhestrom der äußeren Haarzellen hat. Dabei reicht ein intaktes $KCNQ4$ -Allel in $KCNQ4^{+/-}$ -Tieren offenbar aus, um eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials zu verhindern.

3.3.4 Ströme in den äußeren Haarzellen der Cochlea

Um zu klären, ob die Veränderung im Ruhemembranpotential der äußeren Haarzellen mit dem Verlust einer Kaliumleitfähigkeit einhergeht, wurden mit der *Patch clamp* Technik Ganzzellströme am basalen Ende der Zellen gemessen. Falls $KCNQ4$ mit $I_{K,n}$ identisch ist, sollte der Verlust von funktionellen $KCNQ4$ -Kanälen zu einer Änderung der Leitfähigkeiten an der basalen Seite der äußeren Haarzellen führen. Der spezifische $KCNQ$ -Kanalkblocker XE991, ein Derivat des oben erwähnten Linopirdin, sollte auf äußere Haarzellen $KCNQ4$ -defizienter Tiere keinen Effekt haben, $I_{K,n}$ in den WT-Tieren jedoch blockieren.

In den äußeren Haarzellen von 11-13 Tage alten WT-Mäusen wurden durch Depolarisation langsam-aktivierende und teilweise inaktivierende spannungsabhängige Auswärtsströme gemessen (Abb. 3.17 A). Hyperpolarisierende Spannungssprünge erzeugten einwärtsgerichtete Ströme, die instantan begannen und dann inaktivierten. Wie bereits beschrieben (Marcotti und Kros, 1999), blockierte XE991 (0,5 μ M) diesen hyperpolarisationsaktivierten Einwärtsstrom in den äußeren Haarzellen von WT-Mäusen und verringerte die Amplitude der Auswärtsströme

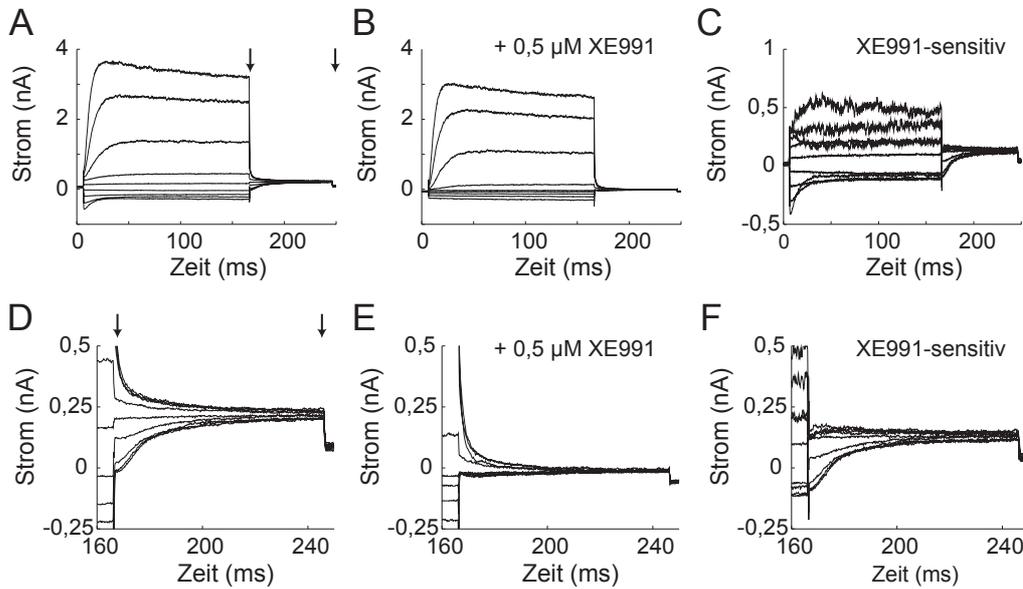


Abb. 3.17: Effekt des KCNQ-Blockers XE991 auf K^+ -Ströme in äußeren Haarzellen von $KCNQ4^{+/+}$ -Mäusen. An der basolateralen Seite der äußeren Haarzellen wurden Ganzzellströme mit der *Patch clamp* Technik aufgenommen. Die Zellen wurden von einem Haltepotential von -60 mV in $+20$ mV-Schritten für 160 ms auf Spannungen zwischen -130 mV und $+30$ mV geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu erzeugen. (A) und (B) zeigen repräsentative Ganzzellströme einer äußeren Haarzelle vor (A) und nach der Zugabe des KCNQ-Kanalblockers XE991 ($0,5 \mu\text{Mol}$) (B). Ähnliche Ströme wurden für mindestens 8 weitere äußere Haarzellen gemessen. In (C) wurde der XE991-sensitiven Stromanteil durch Subtraktion der Ströme vor und nach Blockerzugabe berechnet. (D-F) zeigen jeweils eine Vergrößerung der evozierten *tail currents* (Pfeile) aus (A-C). Die Zugabe von XE991 führte zu der Blockierung eines Kaliumeinwärtsstroms, der bei Hyperpolarisation aktiviert, und eines auswärtsgerichteten Kaliumstroms, der bei Depolarisation aktiviert (C und F).

(Abb. 3.17 B). Der XE991-sensitiven Strom, der durch Subtraktion der Ströme vor und nach der Zugabe von XE991 berechnet wurde, ist in Abb. 3.17 C gezeigt. An den *tail currents*, die durch einen Sprung auf -45 mV hervorgerufen wurden, ist der Effekt von XE991 besonders gut zu erkennen (Abb. 3.17 D-F). Aus diesen *tail currents* wurde die Spannungsabhängigkeit des XE991-sensitiven Stroms berechnet und gegen die Testspannungen aufgetragen (Abb. 3.22 D). In äußeren Haarzellen der WT-Tiere aktivierten Ströme vor der Applikation von XE991 bei einem Potential von -100 mV. Nach Applikation des KCNQ-Kanalblockers aktivierten die Ströme erst bei einem Potential von -40 mV (Abb. 3.22 A). Der errechnete XE991-sensitiven Strom (Abb. 3.22 D) aktivierte bereits bei Potentialen um -120 mV und wies eine halbmaximale Aktivierung V_{50} von $-86 \pm 1,6$ mV auf. Die halbmaximale Aktivierung des XE991-insensitiven Stroms war um ca. 70 mV zu positiveren Potentialen verschoben ($V_{50} = -12 \pm 1$ mV, $n = 9$).

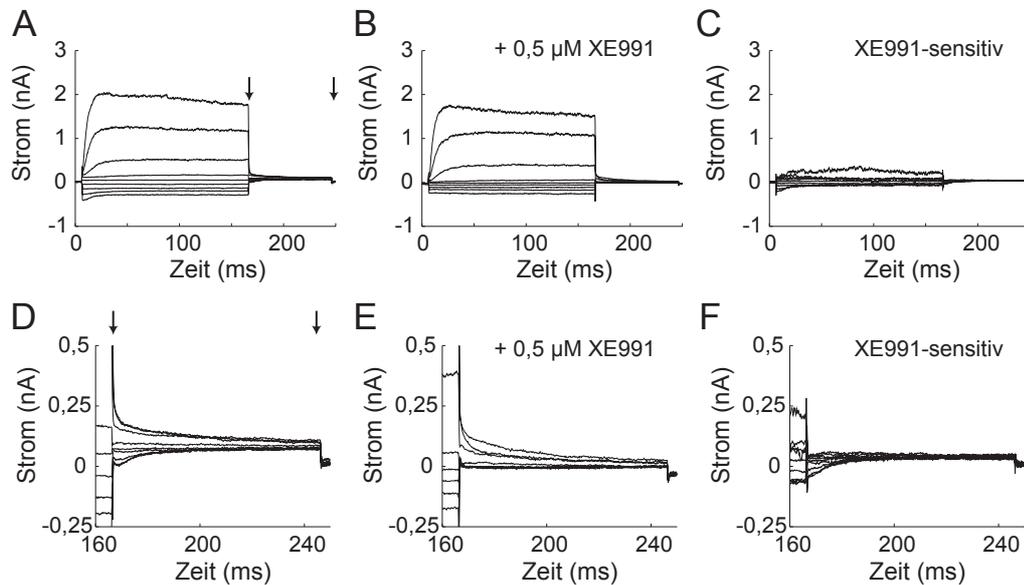


Abb. 3.18: Effekt des KCNQ-Blockers XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von $KCNQ4^{+/-}$ -Mäusen. An der basolateralen Seite der äußeren Haarzellen wurden Ganzzellströme mit der *Patch clamp* Technik aufgenommen. Die Zellen wurden von einem Haltepotential von -60 mV in $+20$ mV-Schritten für 160 ms auf Spannungen zwischen -130 mV und $+30$ mV geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu erzeugen. (A) und (B) zeigen repräsentative Ganzzellströme einer äußeren Haarzelle vor (A) und nach der Zugabe des KCNQ-Kanalblockers XE991 ($0,5 \mu\text{Mol}$) (B). Ähnliche Ströme wurden für mindestens 6 weitere äußere Haarzellen gemessen. In (C) wurde der XE991-sensitive Stromanteil durch Subtraktion der Ströme vor und nach Blockerzugabe berechnet. (D-F) zeigen jeweils eine Vergrößerung der evozierten *tail currents* (Pfeile) aus (A-C). Die hyperpolarisationsaktivierte Komponente der Kaliumströme war in äußeren Haarzellen der $KCNQ4^{+/-}$ -Maus geringer als bei $KCNQ4^{+/+}$. Auch der XE991-sensitive Auswärtsstrom war kleiner als in äußeren Haarzellen von $KCNQ4^{+/+}$.

Der XE991-sensitive Strom war demnach der Strom, der in Nähe des Ruhemembranpotentials äußerer Haarzellen (-54 mV, s. Abb. 3.16) aktiv war. Wie bereits beschrieben (Marcotti und Kros, 1999), war die Blockierung des XE991-sensitiven Stroms in WT-Zellen stets von einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials um ca. 10 - 15 mV zu positiveren Potentialen begleitet.

In äußeren Haarzellen von $KCNQ4^{+/-}$ -Mäusen war der Anteil des XE991-sensitiven Stroms am Gesamtstrom erheblich geringer als in WT-Tieren (Abb. 3.18). Der XE991-sensitive Strom wies jedoch mit einer halbmaximalen Aktivierung von $V_{50} = -85 \pm 2$ mV eine ähnliche Spannungsabhängigkeit auf wie bei WT-Tieren (Abb. 3.22 B). In den äußeren Haarzellen von $KCNQ4^{+/-}$ -Mäusen führte die Applikation von XE991 ebenfalls zu einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials (-53 mV, s. Abb. 3.16) um 10 - 15 mV zu positiveren Potentialen.

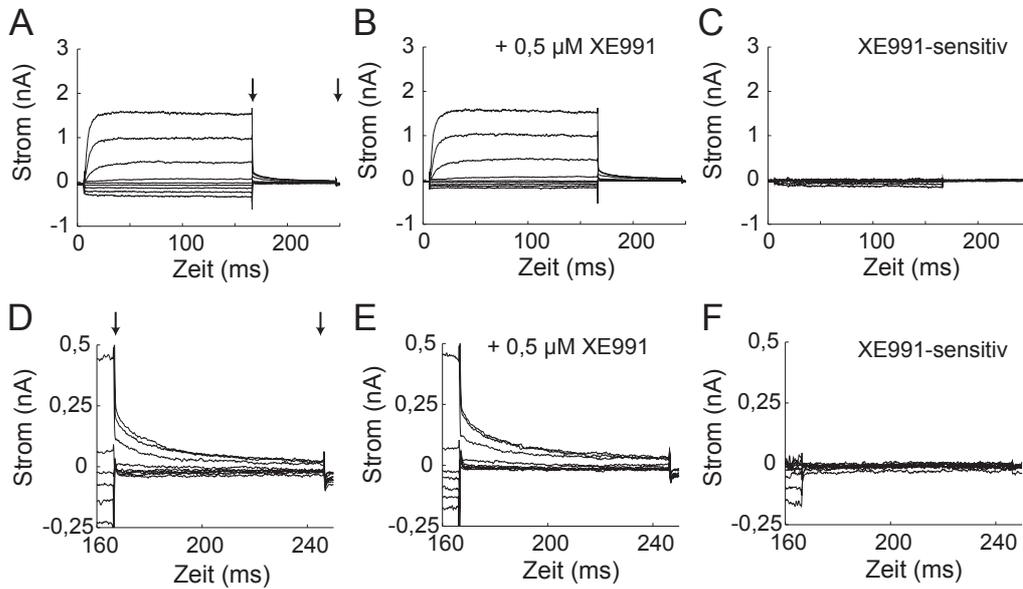


Abb. 3.19: Effekt des KCNQ-Blockers XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von *KCNQ4*^{-/-}-Mäusen. An der basolateralen Seite der äußeren Haarzellen wurden Ganzzellströme mit der *Patch clamp* Technik aufgenommen. Die Zellen wurden von einem Haltepotential von -60 mV in $+20$ mV-Schritten für 160 ms auf Spannungen zwischen -130 mV und $+30$ mV geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu erzeugen. (A) und (B) zeigen repräsentative Ganzzellströme einer äußeren Haarzelle vor (A) und nach der Zugabe des KCNQ-Kanalblockers XE991 ($0,5 \mu\text{Mol}$) (B). Ähnliche Ströme wurden für mindestens 6 weitere äußere Haarzellen gemessen. In (C) wurde der XE991-sensitive Stromanteil durch Subtraktion der Ströme vor und nach Blockerzugabe berechnet. (D-F) zeigen jeweils eine Vergrößerung der evozierten *tail currents* (Pfeile) aus (A-C). Die hyperpolarisationsaktivierte Komponente der Kaliumströme fehlte in äußeren Haarzellen der *KCNQ4*^{-/-}-Maus. Die Amplitude des Auswärtsstroms war kleiner als in äußeren Haarzellen von *KCNQ4*^{+/+}-Mäusen. Es gab keinen XE991-sensitiven Stromanteil (C und F).

In den KCNQ4-defizienten Mäusen *KCNQ4*^{-/-} konnte kein XE991-sensitiver Strom gemessen werden. XE991 hatte weder einen Effekt auf die Amplituden der Aus- und Einwärtsströme (Abb. 3.19) noch auf die Spannungsabhängigkeit der Ströme (Abb. 3.22 C). Die halbmaximale Aktivierung betrug vor und nach Zugabe des KCNQ-Kanalblockers etwa -19 ± 1 mV. Die oben beschriebene instantane hyperpolarisationsaktivierte Stromkomponente fehlte in diesen Zellen (Abb. 3.19 A). Die Auswärtsströme, die auf Depolarisation aktivierten, wiesen deutlich kleinere Amplituden auf als in äußeren Haarzellen von *KCNQ4*^{+/+}-Mäusen (Abb. 3.22 A und C). Zusätzlich hatte die Applikation von XE991 keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential der äußeren Haarzellen, das vor und nach der Zugabe von XE991 bei etwa -42 mV lag.

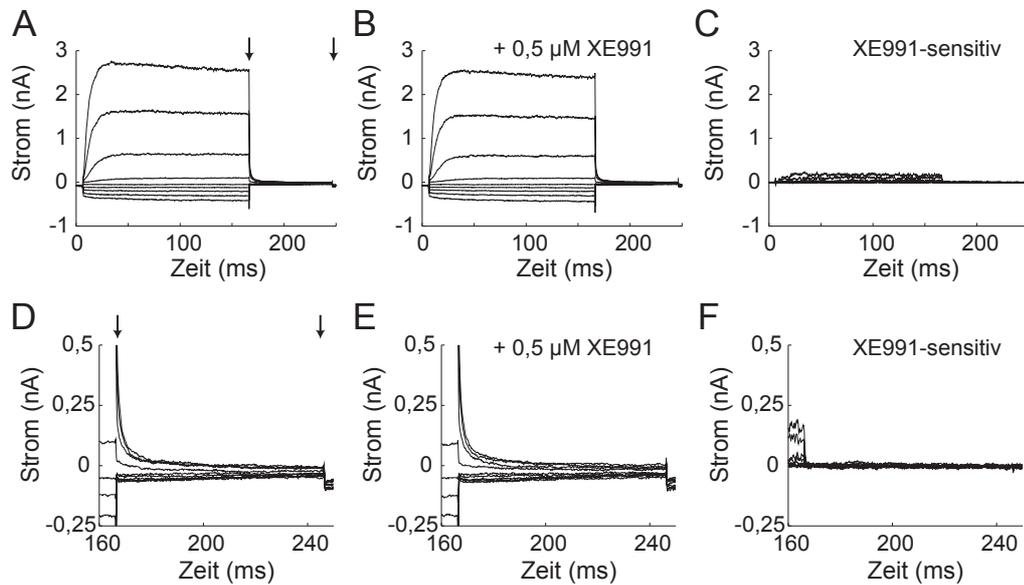


Abb. 3.20: Effekt des KCNQ-Blockers XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von *KCNQ4-DN^{+/+}*-Mäusen. An der basolateralen Seite der äußeren Haarzellen wurden Ganzzellströme mit der *Patch clamp* Technik aufgenommen. Die Zellen wurden von einem Haltepotential von -60 mV in $+20$ mV-Schritten für 160 ms auf Spannungen zwischen -130 mV und $+30$ mV geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu erzeugen. (A) und (B) zeigen repräsentative Ganzzellströme einer äußeren Haarzelle vor (A) und nach der Zugabe des KCNQ-Kanalblockers XE991 ($0,5 \mu\text{Mol}$) (B). Ähnliche Ströme wurden für mindestens 5 weitere äußere Haarzellen gemessen. In (C) wurde der XE991-sensitive Stromanteil durch Subtraktion der Ströme vor und nach Blockerzugabe berechnet. (D-F) zeigen jeweils eine Vergrößerung der evozierten *tail currents* (Pfeile) aus (A-C). Es gab keinen XE991-sensitiven Stromanteil (C und F).

Sehr ähnliche Ergebnisse wurden für die äußeren Haarzellen aus Tieren erhalten, die homozygot für die dominant-negative KCNQ4-Mutation waren (*KCNQ4-DN^{+/+}*). Wie in den KCNQ4-defizienten Tieren war XE991 ohne Effekt auf die Spannungsabhängigkeit und die Amplitude der Ströme (Abb. 3.22 und 3.20). XE991 hatte keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential, das vor und nach der Blockerapplikation bei jeweils ca. -37 mV lag (Abb. 3.16). Die Amplitude der Auswärtsströme war bereits vor Applikation von XE991 im Vergleich zum *KCNQ4^{+/+}* reduziert und entsprach etwa der Amplitude von *KCNQ4^{-/-}*. Eine hyperpolarisationsaktivierte Stromkomponente war nicht messbar (Abb. 3.20 A).

In den äußeren Haarzellen von Tieren, die heterozygot für die dominant-negative Mutation waren und daher noch ein WT-Allel des Gens trugen (*KCNQ4-DN^{+/-}*), war ein geringer XE991-sensitiver Strom messbar. In Abb. 3.21 A ist ein hyperpolarisationsaktivierter, instantaner Strom sichtbar, der durch XE991 blockiert werden konnte. Die Amplitude der Auswärtsströme war bereits vor Applikation von XE991 im Vergleich zu WT-Zellen und Zellen

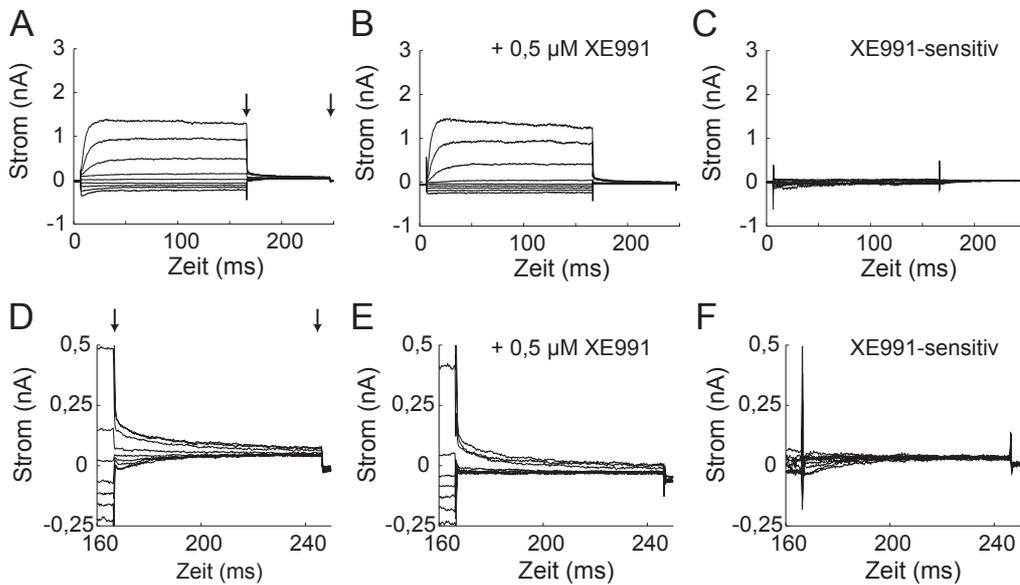


Abb. 3.21: Effekt des KCNQ-Blockers XE991 auf Ströme in äußeren Haarzellen von *KCNQ4-DN^{+/-}*-Mäusen. An der basolateralen Seite der äußeren Haarzellen wurden Ganzzellströme mit der *Patch clamp* Technik aufgenommen. Die Zellen wurden von einem Haltepotential von -60 mV in $+20$ mV-Schritten für 160 ms auf Spannungen zwischen -130 mV und $+30$ mV geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu erzeugen. (A) und (B) zeigen repräsentative Ganzzellströme einer äußeren Haarzelle vor (A) und nach der Zugabe des KCNQ-Kanalblockers XE991 ($0,5 \mu\text{Mol}$) (B). Ähnliche Ströme wurden für mindestens 6 weitere äußere Haarzellen gemessen. In (C) wurde der XE991-sensitive Stromanteil durch Subtraktion der Ströme vor und nach Blockerzugabe berechnet. (D-F) zeigen jeweils eine Vergrößerung der evozierten *tail currents* (Pfeile) aus (A-C). Die hyperpolarisationsaktivierte Komponente der Kaliumströme und die Amplitude des auswärtsgerichteten Stroms waren erheblich kleiner als in äußeren Haarzellen der *KCNQ4^{+/+}*-Maus. Der XE991-sensitive Stromanteil (C und F) war kaum zu erkennen.

aus *KCNQ4^{+/-}* reduziert. Die Stromamplitude war jedoch größer als bei *KCNQ4^{-/-}* und *KCNQ4-DN^{+/+}* (Abb. 3.22) und verringerte sich bei Applikation von XE991. Die Spannungsabhängigkeit der Ströme verschob sich durch die XE991-Zugabe zu positiveren Potentialen. Das Ruhemembranpotential blieb durch XE991 jedoch unbeeinflusst (-43 mV, Abb. 3.16). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in *KCNQ4-DN^{+/-}*-Mäusen eine geringe Anzahl funktionaler KCNQ4-Kanäle assoziiert und einen Beitrag zu den Ganzzellströmen leistet. Dieser Beitrag scheint jedoch nicht groß genug, um einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials entgegenzuwirken.

Der XE991-sensitive Strom in äußeren Haarzellen von *KCNQ4^{+/+}*- und *KCNQ4^{+/-}*-Mäusen trägt alle Charakteristika von $I_{K,n}$ in äußeren Haarzellen. Die halbmaximale Aktivierung beträgt ca. -82 mV und liegt damit in Nähe des Ruhemembranpotentials der WT-Zellen.

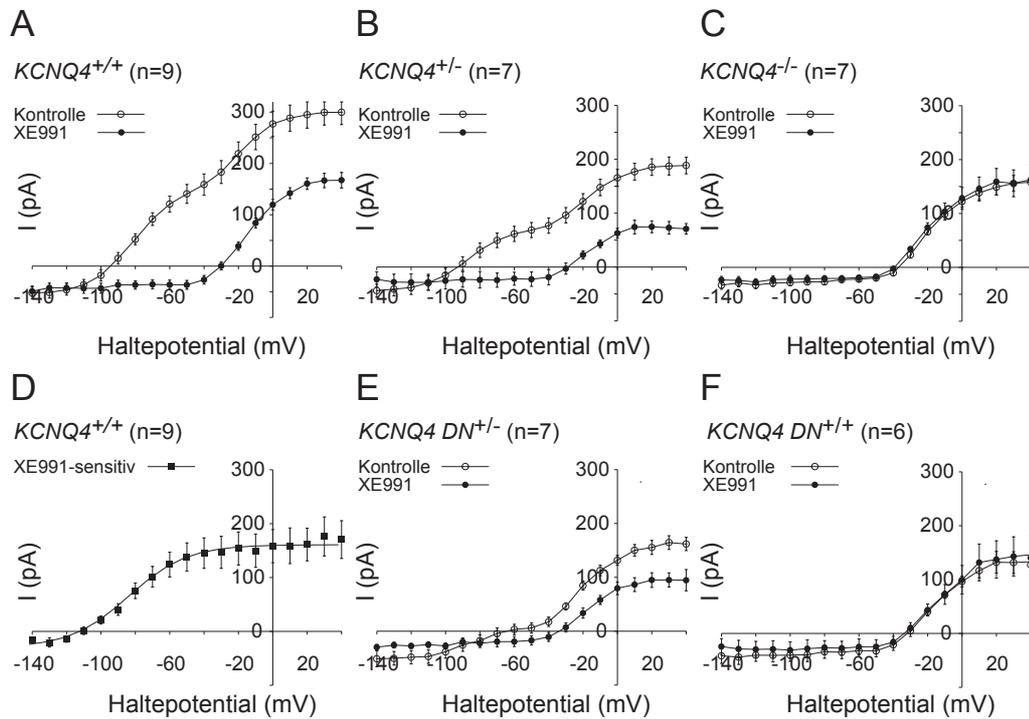


Abb. 3.22: Effekt von XE991 auf die Spannungsabhängigkeit der Ströme in äußeren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle für DFNA2. Die äußeren Haarzellen wurden für 160 ms von einem Haltepotential von -60 mV auf Werte zwischen -140 und $+40$ mV in $+10$ mV Schritten geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV. Aus den *tail currents* wurden absolute Ströme zum Zeitpunkt $t = 0$ berechnet, jeweils vor und nach Zugabe von XE991 ($0,5 \mu\text{M}$) für äußere Haarzellen von *KCNQ4*^{+/+}- (A), *KCNQ4*^{+/-}- (B), *KCNQ4*^{-/-}- (C), *KCNQ4-DN*^{+/-}- (E) und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tieren (F). Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. (D) zeigt zum Vergleich die Spannungsabhängigkeit der XE991-sensitiven Komponente aus Ganzzellströmen von *KCNQ4*^{+/+}, berechnet durch die Subtraktion der Spannungskurven vor und nach Zugabe von XE991. Durch Boltzmann-Fits der absoluten Daten ($n = 9$) ergaben sich folgende Werte für die halbmaximale Aktivierung V_{50} des XE991-sensitiven Stroms (D): $-82 \pm 1,6$ mV; für den XE991-insensitiven Strom (A, schwarze Kreise): $-14 \pm 0,6$ mV.

Der XE991-sensitive Strom ist, wie $I_{K,n}$, bei Depolarisation auswärts- und bei Hyperpolarisation einwärtsrektifizierend, wobei der Einwärtsstrom unmittelbar mit dem Spannungssprung beginnt und dann inaktiviert. $I_{K,n}$ ist durch XE991 inhibierbar, was zu einem Anstieg des Ruhemembranpotentials in den äußeren Haarzellen führt. Da der KCNQ-Kanalblocker XE991 in Zellen von KCNQ4-defizienten Tieren bzw. Tieren mit einer dominant-negativen Mutation in KCNQ4 keinen Effekt hat und gleichzeitig äußere Haarzellen dieser Tiere ein depolarisiertes Ruhemembranpotential aufweisen, kann daraus geschlossen werden, dass KCNQ4 und $I_{K,n}$

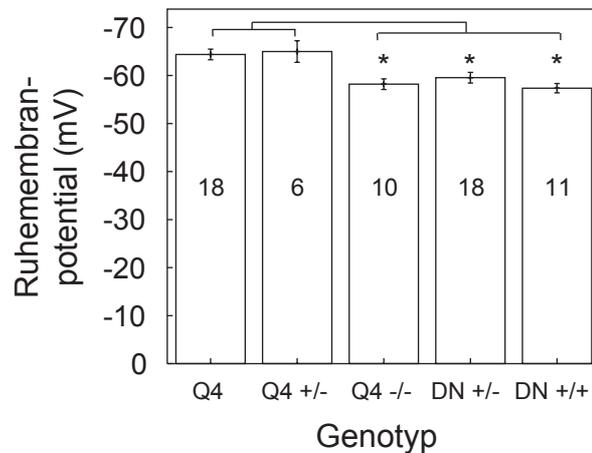


Abb. 3.23: Ruhemembranpotential von inneren Haarzellen in 5,8 mM K^+ . Mit der *Patch clamp* Technik wurde nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration gewartet, bis das Zellinnere mit der Pipettenlösung equilibriert war, um das Ruhemembranpotential zu messen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben, die Sterne bezeichnen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,005$). Die Zahl der Zellen pro Genotyp ist den Balken zu entnehmen. Innere Haarzellen von $KCNQ4^{+/+}$ und $KCNQ4^{+/-}$ wiesen signifikant niedrigere Ruhemembranpotentiale auf als $KCNQ4^{-/-}$, $KCNQ4-DN^{+/-}$ und $KCNQ4-DN^{+/+}$. Die Unterschiede zwischen den drei letztgenannten Genotypen waren nicht signifikant.

identisch sind.

3.3.5 Das Ruhemembranpotential in den inneren Haarzellen der Cochlea

Um die Rolle von $KCNQ4$ in den inneren Haarzellen der Cochlea zu klären, wurde zunächst das Ruhemembranpotential der inneren Haarzellen von WT- und $KCNQ4$ -defizienten Tieren (P12-P14) untersucht (s. 3.3.3). Abb. 3.23 zeigt die Ruhemembranpotentiale von inneren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle. Innere Haarzellen aus $KCNQ4^{+/+}$ - und $KCNQ4^{+/-}$ -Mäusen wiesen mit $V_R = -64,4 \pm 1,1$ mV bzw. $V_R = -65 \pm 2,3$ mV nahezu die gleichen Ruhemembranpotentiale auf. Im Vergleich dazu hatten die $KCNQ4$ -defizienten und die transgenen Tiere mit einer Mutation in $KCNQ4$ ein um ca. 6-8 mV positiveres Ruhemembranpotential. Die Unterschiede zwischen den $KCNQ4$ -defizienten und den transgenen Tieren ($V_R = -58,2 \pm 1,1$ mV für $KCNQ4^{-/-}$; $V_R = -59,6 \pm 1,1$ mV für $KCNQ4-DN^{+/-}$ und $V_R = -57,4 \pm 1,1$ mV für $KCNQ4-DN^{+/+}$) waren nicht signifikant. Im Vergleich zu den äußeren Haarzellen war das Ruhemembranpotential der inneren Haarzellen in allen Genotypen deutlich negativer, wobei die Unterschiede zwischen den WT-Tieren und den Mausmodellen für DFNA2 erheblich geringer waren als bei den äußeren Haarzellen.

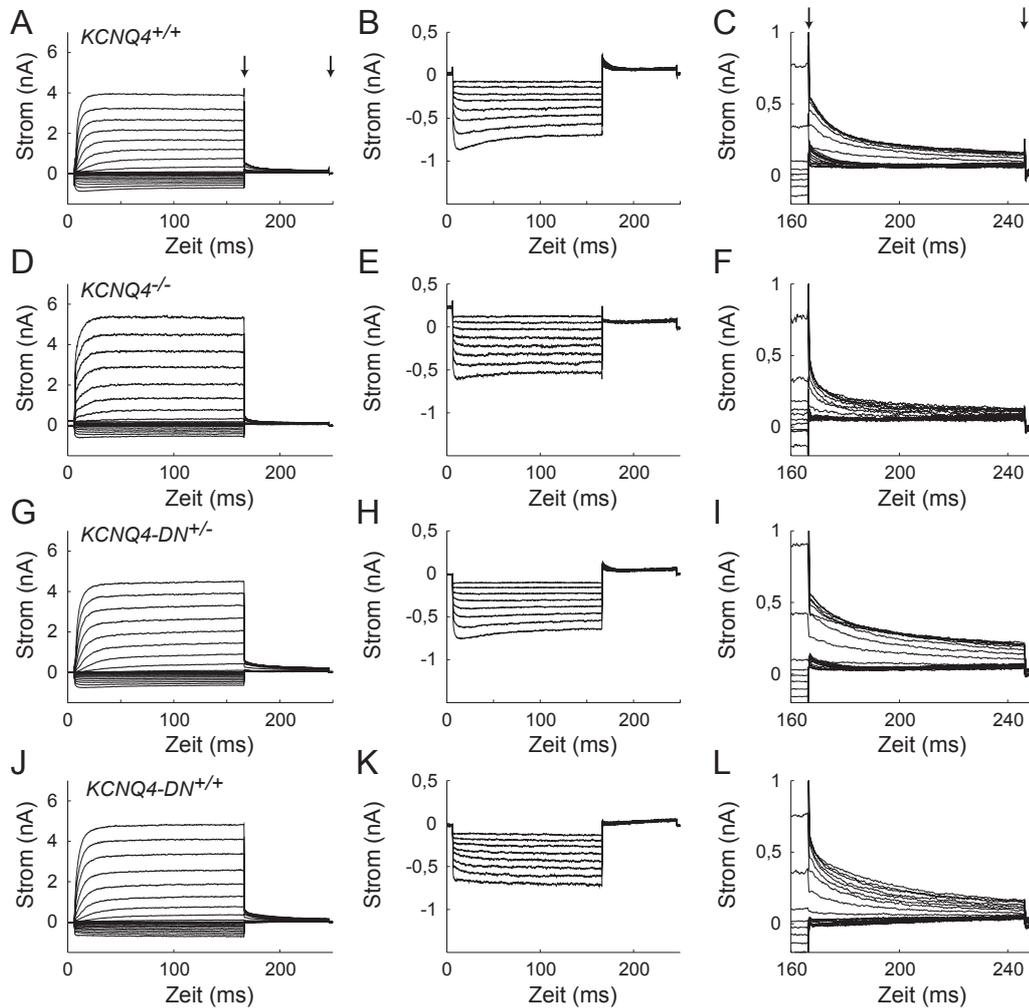


Abb. 3.24: Ströme in inneren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle für DFNA2, aufgenommen mit der *Patch clamp* Technik in der Ganzzellkonfiguration. Die inneren Haarzellen wurden für 160 ms von einem Haltepotential von -60 mV auf Werte zwischen -150 und $+40$ mV in $+10$ mV Schritten geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu evozieren. (A, D, G, J) zeigen repräsentative Ganzzellströme von inneren Haarzellen aus $KCNQ4^{+/+}$ - (A), $KCNQ4^{-/-}$ - (D), $KCNQ4-DN^{+/-}$ - (G) und $KCNQ4-DN^{+/+}$ -Tieren (J). Durch Depolarisation wurden Auswärtsströme erzeugt, die langsam aktivierten. (B, E, H, K) zeigen die Ströme bei Hyperpolarisation in inneren Haarzellen der entsprechenden Genotypen. Innere Haarzellen aus $KCNQ4^{-/-}$ - und $KCNQ4-DN^{+/+}$ -Tieren wiesen geringere Ströme bei Hyperpolarisation auf (E und K) als Haarzellen aus $KCNQ4^{+/+}$ - und $KCNQ4-DN^{+/-}$ -Tieren. In (C, F, I, L) sind die evozierten *tail currents* (Pfeile) für die entsprechenden Genotypen vergrößert dargestellt. Leichte Unterschiede waren nur bei Antworten auf Hyperpolarisation zu erkennen.

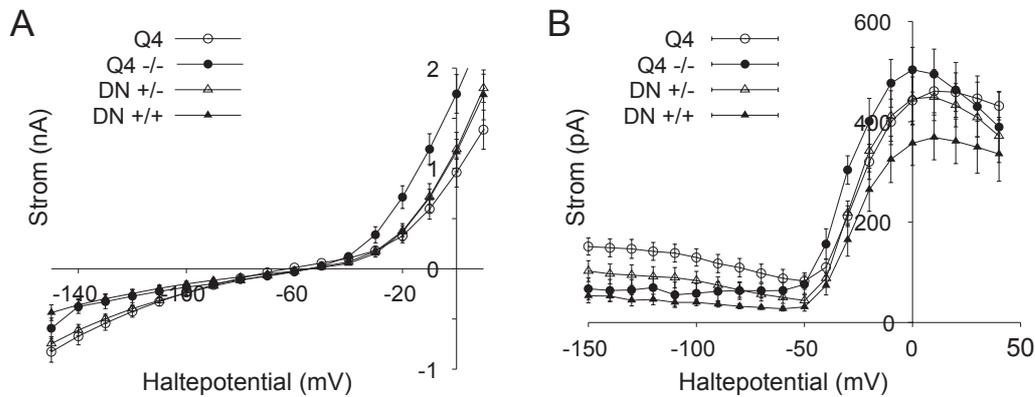


Abb. 3.25: Spannungsabhängigkeit der Ströme in inneren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle für DFNA2. Die inneren Haarzellen wurden für 160 ms von einem Haltepotential von -60 mV auf Werte zwischen -150 und $+40$ mV in $+10$ mV Schritten geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu evozieren. **(A)** Spannungsabhängigkeit der Ströme, gemessen 11 ms nach Beginn der Spannungsänderung, für innere Haarzellen aus den verschiedenen Mausmodellen. $KCNQ4^{+/-}$ -Tiere wurden nicht berücksichtigt, da sie $KCNQ4^{+/+}$ entsprachen. Innere Haarzellen aus $KCNQ4-DN^{+/+}$ - und $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren wiesen bei Hyperpolarisation geringere Einwärtsströme auf als Haarzellen aus $KCNQ4^{+/+}$. **(B)** Spannungsabhängigkeit der Ströme berechnet aus den *tail currents* zum Zeitpunkt $t = 0$. Innere Haarzellen aus $KCNQ4-DN^{+/+}$ - und $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren wiesen bei Hyperpolarisation geringere Ströme auf als Haarzellen aus $KCNQ4^{+/+}$. Die Amplitude der Auswärtsströme war für innere Haarzellen aus $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren höher als bei $KCNQ4-DN^{+/+}$ -Tieren. $KCNQ4^{+/+}$ und $KCNQ4-DN^{+/+}$ wiesen in etwa ähnliche Amplituden bei den Auswärtsströmen auf. Die Werte sind jeweils als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben, wobei $n = 5-11$.

3.3.6 Ströme in den inneren Haarzellen der Cochlea

In inneren Haarzellen der Cochlea sind bisher drei verschiedene K^+ -Ströme ($I_{K,f}$, $I_{K,s}$ und I_{K1}) beschrieben worden. $I_{K,f}$ wird von einem kalzium- und spannungsabhängigen BK-Kanal vermittelt, ist TEA-sensitiv und weist eine sehr schnelle Aktivierungskinetik auf (Kros und Crawford, 1990; Kros *et al.*, 1998). $I_{K,s}$ wird möglicherweise durch einen K_v -Kanal repräsentiert, der eine langsamere Kinetik aufweist als $I_{K,f}$ und durch 4-Aminopyridin inhibierbar ist (Kros *et al.*, 1998). $I_{K,f}$ und $I_{K,s}$ sind jeweils auswärtsgerichtete Kaliumkanäle, die die Spannungsantwort und das Ruhemembranpotential von inneren Haarzellen bestimmen (Kros *et al.*, 1998). I_{K1} stellt hingegen eine einwärtsgerichtete Leitfähigkeit dar, die in inneren Haarzellen transient exprimiert wird (Marcotti *et al.*, 1999).

Um zu prüfen, ob $KCNQ4$ einen Anteil an den Strömen in den inneren Haarzellen hat, wurde zunächst der Effekt von XE991, als spezifischem $KCNQ$ -Blocker, auf die Ströme in inneren Haarzellen untersucht. XE991 hatte jedoch in Konzentrationen bis zu $5 \mu\text{M}$ keinen Einfluss auf die Einwärts- oder Auswärtsströme in inneren Haarzellen von 12-14 Tage alten

WT-Mäusen. Unter Applikation von XE991 wurde jedoch eine geringfügige Verschiebung des Ruhemembranpotentials um 3-5 mV zu positiveren Potentialen festgestellt. Falls KCNQ4 an Strömen in inneren Haarzellen beteiligt ist, sollten die Leitfähigkeiten von $KCNQ4^{+/+}$ -Tieren Unterschiede zu KCNQ4-defizienten Tieren aufweisen. Dazu wurden Ganzzellströme von der basalen Seite der inneren Haarzellen mit der *Patch clamp* Technik gemessen (Abb. 3.24). Die Haarzellen wurden von einem Haltepotential von -60 mV für 160 ms auf Werte zwischen -150 mV und $+40$ mV in $+10$ mV Schritten geklemmt. Es folgte ein 80 ms langer Sprung auf -45 mV, um *tail currents* zu evozieren. In allen Genotypen evozierten hyperpolarisierende Spannungssprünge Einwärtsströme, die jedoch bei $KCNQ4-DN^{+/+}$ - und $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren kleiner waren als in WT- und $KCNQ4-DN^{+/-}$ -Mäusen. Depolarisierende Spannungssprünge erzeugten in allen Genotypen große Auswärtsströme, deren Amplitude bei $KCNQ4-DN^{+/+}$ -Tieren am niedrigsten und bei $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren am höchsten war (Abb. 3.24 B, D und Abb. 3.25 B). Da sich die Ströme von inneren Haarzellen der verschiedenen Genotypen in der transienten Antwort auf Hyperpolarisation unterschieden, wurde die Spannungsabhängigkeit 11 ms nach Beginn der Spannungsänderung berechnet (Abb. 3.25 A). Auch dabei wurde deutlich, dass innere Haarzellen aus $KCNQ4-DN^{+/+}$ - und $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren bei Hyperpolarisation geringere Einwärtsströme aufwiesen als Haarzellen aus $KCNQ4^{+/+}$. Aus den evozierten *tail currents* wurden ebenfalls Stromspannungskurven berechnet (Abb. 3.25 B). Die Antworten auf Hyperpolarisation waren in $KCNQ4^{+/+}$ -Tieren größer als in $KCNQ4-DN^{+/+}$ - und $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren. Hyperpolarisationsaktivierte Ströme aus inneren Haarzellen von $KCNQ4-DN^{+/-}$ -Tieren hatten eine mittlere Amplitude verglichen mit den anderen Genotypen (Abb. 3.25 B). Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den Ganzzellströmen von inneren Haarzellen erheblich geringer als in Strömen von äußeren Haarzellen (3.3.4). Zudem wurde keine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu positiveren Potentialen festgestellt. Die Unterschiede in den Stromamplituden der verschiedenen Genotypen waren in Nähe des Ruhemembranpotentials (-60 bis -65 mV) sehr gering (Abb. 3.25).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Charakterisierung von KCNQ-Kanälen und ihren β -Untereinheiten lieferte folgende Ergebnisse:

1. KCNQ1 und seine β -Untereinheiten im Gastrointestinaltrakt:
 - * KCNQ1 und KCNE3 kolokalisieren in den basolateralen Membranen der Kryptzellen von Kolon und Dünndarm.
 - * KCNQ1 wird im Magen in den Parietalzellen exprimiert und kolokalisiert dort mit der H^+/K^+ -ATPase.
 - * KCNE2 wird im Magen in einem spezifischen Subtyp von Zellen exprimiert, die wahrscheinlich Parietalzellen darstellen.

- * Die heterologe Koexpression von KCNQ1 und KCNE2 führt in HEK293-Zellen zu einem zeitunabhängigen Strom mit einer linearen Spannungsabhängigkeit.
2. Charakterisierung einer Familie mit einer Form neonataler Epilepsie (BFNC) und Myokymie:
- * Das neue BFNC/Myokymie-Syndrom wird durch eine Mutation in KCNQ2 verursacht: R207W.
 - * KCNQ2 und KCNQ3 werden im anterioren Horn im Rückenmark exprimiert.
 - * Die R207W-Mutation führt zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von KCNQ2 und zu einer dramatischen Verlangsamung der Aktivierung bei Depolarisation.
 - * Bei kurzen Depolarisationen hat die R207W-Mutation einen dominant-negativen Effekt auf KCNQ2- und KCNQ2/3-Ströme.
 - * Die R207W-Mutation beschleunigt die Deaktivierung von KCNQ2, sowohl als Homomer als auch bei Koexpression mit KCNQ3.
 - * Die Oberflächenexpression von KCNQ2 und KCNQ3 bleibt durch die R207W-Mutation unbeeinflusst.
 - * In den anderen KCNQ-Kanälen hat die homologe Mutation des dritten Arginins im Spannungssensor unterschiedliche Effekte. In KCNQ1 und KCNQ4 führt die Mutation zu einer geringfügigen Verlangsamung der Aktivierung und einer deutlichen Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu positiveren Potentialen. In KCNQ3 verursacht die Mutation eine geringfügige Verlangsamung der Aktivierung und lässt die Spannungsabhängigkeit des Kanals unbeeinflusst. KCNQ5 hingegen wird durch die Mutation in einen permanent offenen Zustand versetzt.
3. *Patch clamp* Messungen an äußeren und inneren Haarzellen von Mausmodellen für die autosomal dominant vererbte, nichtsyndromische progrediente Taubheit DFNA2:
- * In Messungen am auditorischen Hirnstamm, die Dr. Hannes Maier an anästhesierten Mäusen durchführte, wurde ein signifikanter Hörverlust bei homozygoten KCNQ4-defizienten und transgenen Tieren ab einem Alter von ca. vier Wochen festgestellt. *KCNQ4-DN*^{+/+}- und *KCNQ4*^{-/-}-Tiere waren ab einem Alter von etwa sechs Monaten sehr schwerhörig. In *KCNQ4-DN*^{+/-} erfolgte die progrediente Ertaubung um einen Monat langsamer. Die Ausschaltung des *KCNQ4*-Gens sowie die Einführung einer dominant-negativen KCNQ4-Mutation haben also zu Mausmodellen für die progrediente autosomal dominant vererbte Ertaubung DFNA2 geführt.
 - * Das Ruhemembranpotential der äußeren Haarzellen von homozygoten KCNQ4-defizienten und transgenen Tieren war im Vergleich zu WT-Mäusen und heterozygoten KCNQ4-defizienten Mäusen um ca. 10-17 mV erhöht.

- * *Patch clamp* Messungen an äußeren Haarzellen zeigten, dass in *KCNQ4*^{-/-}- sowie in *KCNQ4-DN*^{+/-} und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tieren eine basale, XE991-sensitive Kaliumleitfähigkeit fehlte. Diese Leitfähigkeit war bei Spannungen um -82 mV in WT-Mäusen halbmaximal aktiviert und war somit in Nähe des Ruhemembranpotentials äußerer Haarzellen aktiv. Die XE991-sensitive Kaliumleitfähigkeit trug alle Charakteristika des $I_{K,n}$ -Stroms äußerer Haarzellen.
- * Das Ruhemembranpotential der inneren Haarzellen von homozygoten *KCNQ4*-defizienten und transgenen Tieren war im Vergleich zu WT-Mäusen und heterozygoten *KCNQ4*-defizienten Mäusen um ca. 6-8 mV erhöht.
- * XE991 hatte keinen deutlichen Effekt auf die basolateralen Kaliumleitfähigkeiten von inneren Haarzellen.
- * Innere Haarzellen von *KCNQ4*^{-/-}- und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tieren wiesen bei Hyperpolarisation geringere Einwärtsströme auf als innere Haarzellen von WT-Mäusen.

4 Diskussion

Der erste Teil der Diskussion befasst sich mit der Lokalisation von KCNQ1 und seinen β -Untereinheiten im gastrointestinalen System. Dabei werden Modelle vorgestellt, wie KCNQ1 und die beteiligten β -Untereinheiten zur epithelialen Chlorid- und zur Magensäuresekretion beitragen könnten. Im zweiten Teil der Diskussion werden die Auswirkungen der Spannungssensor-Mutation in KCNQ2 auf den Kaliumstrom von KCNQ2 oder KCNQ2/KCNQ3-Heteromeren betrachtet und diskutiert, warum die Mutation im Spannungssensor nicht nur zu neonataler Epilepsie, sondern auch zu Myokymie führt. Der dritte Teil der Diskussion behandelt die Analyse von Mausmodellen für die vererbare, progrediente Ertaubung DFNA2. Die elektrophysiologischen Messungen an den äußeren und inneren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle werden diskutiert und der Pathomechanismus von DFNA2 erörtert.

4.1 KCNQ1 und seine β -Untereinheiten im Gastrointestinaltrakt

4.1.1 KCNQ1 und KCNE3 vermitteln den basolateralen cAMP-abhängigen Kaliumstrom in Kryptzellen

Im Kolon ist eine basolaterale cAMP-abhängige Kaliumleitfähigkeit an der transepithelialen Chloridsekretion beteiligt. Dieser Kanal recycelt Kaliumionen, die über einen basolateralen NaK2Cl-Kotransporter in die Zelle transportiert wurden (Abb. 4.1). Auf diese Weise stimuliert der Kanal die basolaterale Aufnahme von Cl^- und hyperpolarisiert die Zelle. Dadurch erhöht sich die elektrochemische Triebkraft für die apikale Chloridsekretion durch den CFTR-Chloridkanal (Abb. 4.1). Die Pharmakologie des basolateralen Kaliumkanals, insbesondere seine Sensitivität für Chromanol 293B, deutete auf eine Beteiligung von KCNQ1 an dieser Leitfähigkeit hin (Devor *et al.*, 1997; Diener *et al.*, 1996; Greger *et al.*, 1997; MacVinish *et al.*, 1998; Mall *et al.*, 1998; Rufo *et al.*, 1997; Warth *et al.*, 1996). Allerdings legte die Spannungsabhängigkeit sowohl der homomeren KCNQ1-Kanäle als auch der KCNQ1/KCNE1-Heteromere nahe, dass diese Kanäle bei negativen Spannungen über der Membran geschlossen sind. Außerdem hatten elektrophysiologische Messungen gezeigt, dass die basolaterale Kaliumleitfähigkeit im Kolon eine lineare Spannungsabhängigkeit aufweist (Diener *et al.*, 1996; Rufo *et al.*, 1997), was weder für KCNQ1-Homomere noch für Heteromere aus KCNQ1 und KCNE1 zutrifft. Eine Lösung dieses Problems ergab sich, als gezeigt werden konnte, dass Heteromere aus KCNQ1 und KCNE3 einen zeitunabhängigen Strom mit einer linearen Span-

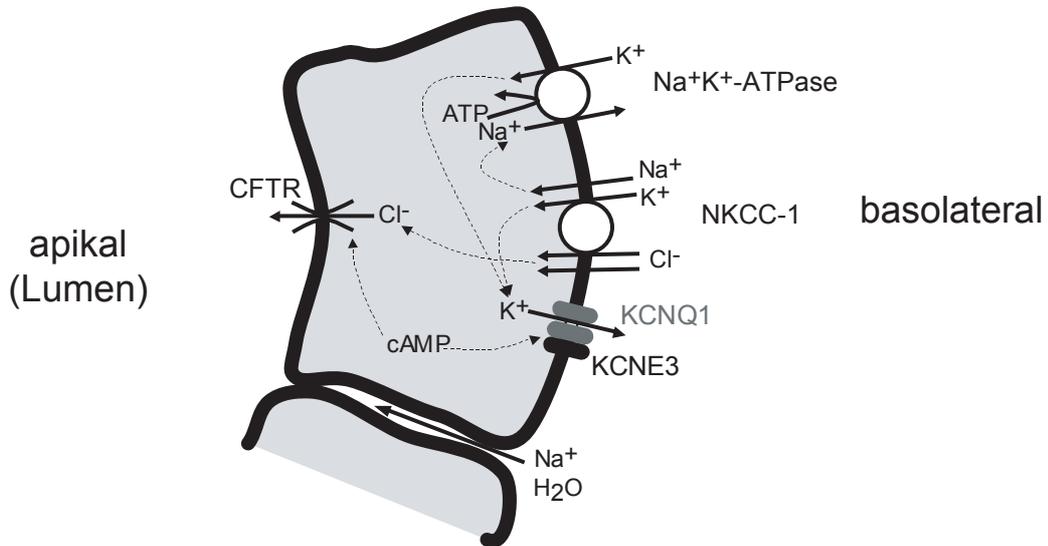


Abb. 4.1: Transportmodell für die transepitheliale Chloridsekretion in Kryptzellen des Darms. Cl⁻ wird mit Na⁺ und K⁺ über einen NKCC-Kotransporter an der basolateralen Membran in die Zelle transportiert. Na⁺ verlässt die Zelle über eine Na⁺/K⁺-ATPase. K⁺ wird über einen basolateralen Kaliumkanal recycelt, der vermutlich aus KCNQ1/KCNE3-Heteromeren besteht. Dieser permanent offene, zeitunabhängige Kaliumkanal kann durch cAMP aktiviert werden, das auch auf die apikale Chloridleitfähigkeit wirkt. Da der NKCC-Kotransporter Cl⁻ gegen den elektrochemischen Gradienten transportiert und der basolaterale Kaliumkanal die basolaterale Membran hyperpolarisiert, existiert eine große Triebkraft für die apikale Chloridsekretion durch CFTR. Das durch die Chloridsekretion entstehende transepitheliale Potential sorgt für eine parallele parazelluläre Sekretion von Na⁺. Die erhöhte luminal NaCl Konzentration verursacht einen parazellulären Nachstrom von Wasser.

nungsabhängigkeit vermitteln, der durch cAMP aktivierbar sowie durch Chromanol 293B und Clotrimazol inhibierbar ist (Schroeder *et al.*, 2000b). KCNQ1 und KCNE3 wurden durch *in situ* Hybridisierung in den Kryptzellen des Kolons und des Dünndarms detektiert (Schroeder *et al.*, 2000b). Das stimmte gut mit der Beobachtung überein, dass in den Kryptzellen der größte Teil der Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion im Dünndarm stattfindet (Welsh *et al.*, 1982). Während KCNQ1/KCNE1-Heteromere in der apikalen Membran der *Stria vascularis* lokalisieren (Vetter *et al.*, 1996), erfordert das Transportmodell für den Dünndarm eine basolaterale Lokalisation von KCNQ1 und KCNE3 (Abb. 4.1). Durch die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Immunfluoreszenz-Daten konnte erstmals die basolaterale Kollokalisierung der beiden Untereinheiten bestätigt werden (Abb. 3.3). Abbott *et al.* (2001) äußerten Zweifel über die Expression von KCNE3 im Darm, da einige Northern Blots kein KCNE3-Signal im Kolon ergaben. Das Fehlen von KCNE3 in kommerziell erhältlichen Northern Blots ist vermutlich auf die Präparation des Materials zurückzuführen. Wenn die RNA aus Darmgewebe gewonnen

wurde, bei dem die Mukosa fehlt, ist auch die RNA der KCNE3-exprimierenden Kryptzellen nicht mehr vorhanden.

4.1.2 KCNQ1 und KCNE2 lokalisieren in einem Subtyp von Magendrüzenzellen

Kürzlich wurde durch RT-PCR und *in situ* Hybridisierung gezeigt, dass KCNQ1 im Magen exprimiert wird (Demolombe *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000a). Die hier vorgelegten Immunfluoreszenzdaten zeigten eine deutliche KCNQ1-Expression in den Magensäure-sezernierenden Parietalzellen. Allerdings färbte der KCNQ1-Antikörper nicht die gastrischen, Pepsinogenproduzierenden Hauptzellen, in denen Lee *et al.* (2000a) KCNQ1 durch RT-PCR nachwies. Die Immunfluoreszenzsignale für KCNQ1 und die β -Untereinheit der H^+/K^+ -ATPase überlappten nahezu vollständig in einem Bereich, der den größten Teil des Querschnitts einer Parietalzelle abdeckte. Das lässt vermuten, dass KCNQ1, im Gegensatz zu den intestinalen Kryptzellen, nicht in der basolateralen Membran von Parietalzellen exprimiert wird, sondern parallel zur H^+/K^+ -ATPase im ausgedehnten System der tubulovesikulären und kanalikulären Membranen arbeitet. Bei den hier gezeigten Immunfluoreszenzbildern von Parietalzellen handelte es sich vermutlich um Parietalzellen im Ruhezustand, da der Magen vor der Präparation nicht stimuliert wurde. Die Parietalzellen des Magens verändern mit der Stimulation ihre Morphologie, indem sie die tubulovesikulären Strukturen im Zytoplasma umbauen und die Mikrovilli in den Kanalikuli sowie die exzellulären Mündungen der Kanalikuli vergrößern (Schmidt und Thews, 1987). KCNQ1 könnte in den Parietalzellen, analog zu seiner Funktion in intestinalen Kryptzellen, das Recycling von Kaliumionen vermitteln, die durch die H^+/K^+ -ATPase in die Parietalzelle transportiert werden (Helander und Keeling, 1993; Hagen *et al.*, 2000). Die Analogie zur Funktion von KCNQ1/KCNE3-Heteromeren in intestinalen Kryptzellen warf die Frage auf, ob KCNQ1 auch im Magen mit einer β -Untereinheit assoziiert. Daher wurde mit Hilfe eines Northern Blots die Expression von KCNE-Untereinheiten im Magen untersucht. Durch *in situ* Hybridisierung detektierten Demolombe *et al.* (2001) KCNQ1 und KCNE1 im Magen, wobei beide Proteine nicht kolokalisierten. Zusätzlich wurde keine β -Galaktosidase-Färbung in Magenschnitten von Mäusen detektiert, die *lacZ* unter der Kontrolle eines nativen *KCNE1*-Promotors exprimierten (Demolombe *et al.*, 2001). Grahammer *et al.* (2001) detektierten eine starke Expression von KCNE2 und KCNE3 im Magen. Der hier vorgelegte Northern Blot zeigte hingegen keine signifikante Expression von KCNE1 oder KCNE3 im Mausmagen (Abb. 3.1). Stattdessen wurde eine starke Expression von KCNE2 detektiert. Da kein Antikörper gegen KCNE2 zur Verfügung stand, konnte leider keine Kolokalisation von KCNE2 mit der H^+/K^+ -ATPase durchgeführt werden. Die Färbung für KCNE2 in *in situ* Hybridisierungen von Magenschnitten legte jedoch nahe, dass es sich bei dem Subtyp von Zellen, die positiv für KCNE2 waren, um Parietalzellen handelte.

In Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Ergebnissen detektierten Demolombe *et al.* (2001) keine KCNE1-Expression in RNA-Präparationen vom Mausdarm. Allerdings stehen diese Ergebnisse im Kontrast zu Berichten von Takumi *et al.* (1988), die eine KCNE1-

Expression im Dünndarm von Ratten feststellten. Diese Unterschiede im Expressionsmuster sind möglicherweise auf eine Variabilität der KCNE1-Expression zwischen verschiedenen Arten zurückzuführen.

4.1.3 KCNE2 moduliert den Strom von KCNQ1

Abbott *et al.* (1999) berichteten, dass KCNE2 zwar das Schalten des HERG-Kanals beeinflusst, aber keinen Einfluss auf die Mitglieder der KCNQ-Familie hat. In der vorliegenden Arbeit führte die Koexpression von KCNQ1 und KCNE2 in HEK-Zellen dagegen zu einer drastischen Veränderung des Schaltens von KCNQ1. Der Strom von KCNQ1/KCNE2-Heteromeren war nahezu zeitunabhängig und nur schwach auswärtsrektifizierend (Abb. 3.5). Während die vorgelegten Ergebnisse ermittelt wurden, demonstrierten Tinel *et al.* (2000a) ähnliche Ergebnisse für die Modulation von KCNQ1 durch KCNE2. Außerdem zeigten sie leichte Effekte von KCNE2 auf Heteromere aus KCNQ2 und KCNQ3 (Tinel *et al.*, 2000). Die nahezu lineare Spannungsabhängigkeit von Strömen aus KCNQ1/KCNE2-Heteromeren ähnelt der von Strömen aus KCNQ1/KCNE3-Heteromeren. Allerdings vermitteln KCNQ1/KCNE3-Heteromere, zumindest in *Xenopus laevis* Oozyten, erheblich größere Ströme als Heteromere aus KCNQ1 und KCNE2 (Schroeder *et al.*, 2000b).

4.1.4 KCNQ1/KCNE2-Heteromere sind möglicherweise an der Magensäure-Sekretion beteiligt

KCNQ1/KCNE2-Heteromere sind vermutlich aufgrund ihrer linearen Spannungsabhängigkeit beim Ruhepotential von Parietalzellen geöffnet. Sie könnten in der apikalen Parietalzellmembran als Recyclingweg für die Kaliumionen dienen, die durch die apikale H^+/K^+ -ATPase aktiv in die Zelle gelangen (Abb. 4.2). Diese Hypothese wird durch ein kürzlich veröffentlichtes *Knockout*-Modell für *KCNQ1* unterstützt (Lee *et al.*, 2000a). Zusätzlich zur erwarteten Innenohrtaubheit zeigten *KCNQ1*^{-/-}-Mäuse eine dramatische Hyperplasie der gastrischen Mukosa sowie vakuolisierte Parietalzellen. Außerdem wiesen die Mäuse eine Achlorhydrie auf, d. h. sie verloren die Fähigkeit, ihren Magen anzusäuern. Ganz ähnliche Defekte wurden bei Mäusen beobachtet, in denen die α - bzw. β -Untereinheit der gastrischen H^+/K^+ -ATPase deletiert wurden (Spicer *et al.*, 2000; Scarff *et al.*, 1999). Während es keine offensichtliche Erklärung für die morphologischen Veränderungen in den *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen gibt, unterstützt die Achlorhydrie die Hypothese, dass KCNQ1 (möglicherweise als KCNQ1/KCNE2-Heteromer) für die Sekretion von Magensäure notwendig ist, indem der Kanal einen Recyclingweg für Kaliumionen in der apikalen Membran bereitstellt. Dies wird inzwischen außerdem von Untersuchungen von Grahammer *et al.* (2001) unterstützt, die zeigten, dass die Inhibition von KCNQ1 im Magen durch Chromanol 293B zu einer vollständigen Inhibition der Magensäure-Sekretion führt. Zusätzlich beschrieben Grahammer *et al.* (2001), dass Heteromere aus KCNQ1 und KCNE2 einen pH-abhängigen Strom vermitteln, während der Strom von KCNQ1/KCNE3-Heteromeren pH-unabhängig ist (Grahammer *et al.*, 2001). Neben der H^+/K^+ -ATPase stel-

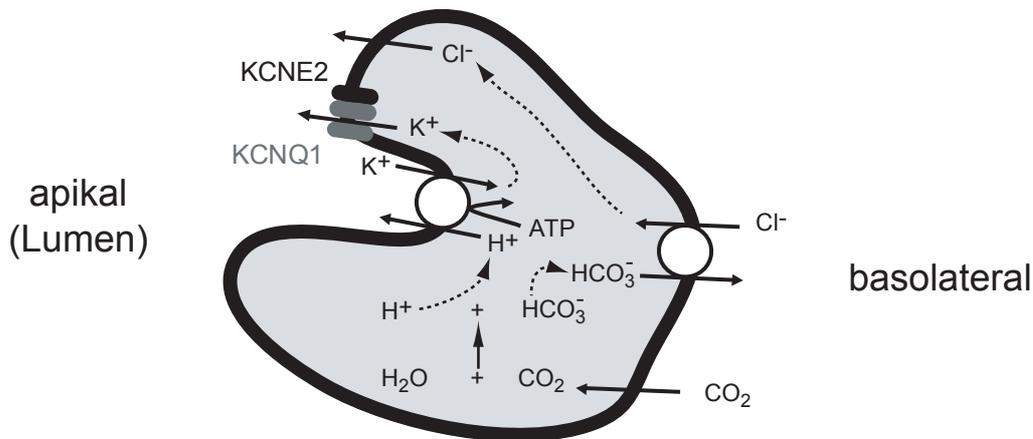


Abb. 4.2: Transportmodell für die Magensäure-Sekretion in den Parietalzellen des Magens. CO_2 diffundiert über die Membran in die Zelle und wird durch das Enzym Karboanhydrase mit Wasser in Protonen und HCO_3^- umgewandelt. HCO_3^- verlässt die Zelle über einen basolateralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, der gleichzeitig Cl^- in die Zelle transportiert, das auf der apikalen Seite der Membran ins Lumen entlassen wird. Die molekulare Identität des gastrischen Chloridkanals ist nicht bekannt. An der apikalen Membran pumpt die gastrische H^+/K^+ -ATPase die Protonen im Austausch gegen K^+ aus der Zelle. K^+ verlässt die Parietalzelle über eine Kaliumleitfähigkeit, die möglicherweise von KCNQ1 oder KCNQ1/KCNE2-Heteromeren vermittelt wird. Auf diese Weise akkumulieren Parietalzellen bis zu 150 mM HCl im Magenlumen. Nicht eingezeichnet sind eine Na^+/K^+ -ATPase und ein Na^+/H^+ -Austauscher auf der basolateralen Seite der Membran (Schultheis *et al.*, 1998).

len KCNQ1 und möglicherweise KCNE2 nützliche pharmakologische Ziele dar, um die Magensäure-Sekretion zu steuern und therapeutisch zu beeinflussen.

4.1.5 Ausblick

Um die Funktion von KCNE2 im Magen und möglicherweise auch in anderen Geweben genauer zu untersuchen, könnte man eine KCNE2-defiziente Mauslinie generieren. Mit ihr könnte die Hypothese, dass KCNQ1/KCNE2-Heteromere an der Magensäure-Sekretion beteiligt sind, überprüft werden. Ein KCNE2-defizientes Mausmodell würde zusätzlich Einblicke in die Pathophysiologie des LQT-Syndroms ermöglichen, da Mutationen in *KCNE2* diese Repolarisationsstörung des Herzens verursachen und vor allem bei Medikamenten-induzierter Herzarrhythmie eine Rolle spielen.

KCNQ1 assoziiert in verschiedenen Geweben mit unterschiedlichen KCNE- β -Untereinheiten und lokalisiert in einigen Geweben apikal, in anderen basolateral. Dabei ist unklar, was die polare Lokalisation determiniert und wie die Interaktion zwischen KCNQ1 und den verschiedenen β -Untereinheiten reguliert wird, denn in einigen Geweben kann KCNQ1 mit mehreren KCNE-Untereinheiten (z. B. im Herzen mit KCNE1, KCNE3 und KCNE5) heteromere Kanäle

bilden. Mit Expressionsstudien an polarisierten Zellen könnte untersucht werden, wie die Lokalisation von KCNQ1/KCNE-Heteromeren gesteuert wird. Durch Koexpressionsstudien in heterologen Expressionssystemen könnte man außerdem evaluieren, ob die verschiedenen KCNE-Untereinheiten um eine Bindungsstelle an KCNQ1 kompetitieren.

Melman *et al.* (2002) grenzten durch *in vitro* Mutagenese den Proteinbereich, der für das unterschiedliche Schalten von KCNQ1/KCNE1- und KCNQ1/KCNE3-Heteromeren verantwortlich ist, auf eine Aminosäure im Transmembransegment der KCNE-Untereinheit ein. Mit welchen Domänen im KCNQ1-Protein die KCNE-Untereinheiten interagieren und wie der heteromere Kanalkomplex gebildet wird, ist jedoch unklar und bedarf weiterer Mutagenesestudien.

4.2 Analyse einer Mutation im Spannungssensor von KCNQ2

Epilepsie ist eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit wiederkehrenden Episoden aberranter neuronaler Überregbarkeit, die ca. 0,5 % der Bevölkerung betrifft (Noebels, 1996). Während epileptischer Anfälle kommt es zeitgleich zu kurzen, hochfrequenten Serien von Aktionspotentialen in allen Neuronen eines Gehirnareals. Epileptische Erkrankungen, die auf dem Defekt eines einzelnen Gens beruhen, machen nur einen Bruchteil der idiopathischen Epilepsien beim Menschen aus. Trotzdem sind die Identifizierung von genetischen Veränderungen und das Studium deren funktioneller Konsequenzen bei vererbaren Epilepsien wichtig für die Klärung der Pathophysiologie von epileptischen Erkrankungen und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze (Steinlein, 1998). Unter den monogenen Epilepsien repräsentiert BFNC eines der am besten untersuchten Krankheitsmodelle für generalisierte, idiopathische Epilepsien (Hirsch *et al.*, 1999). Daher ist die Untersuchung der molekularen Mechanismen, mit denen die genetischen Veränderungen betroffener Patienten zu BFNC führen, auch für die Behandlung von generalisierten, idiopathischen Epilepsien in der erwachsenen Bevölkerung von fundamentaler Bedeutung (Castaldo *et al.*, 2002).

4.2.1 Myokymie und BFNC werden durch eine Mutation im Spannungssensor von KCNQ2 verursacht

Die Kosegregation der neonatalen Epilepsie und der Myokymie in der untersuchten Familie ließ eine gemeinsame Ätiologie für beide Symptome vermuten. Neonatale Krämpfe sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit unterschiedlicher Ätiologie und unterschiedlichem Verlauf. Unter diesen Erkrankungen wird BFNC durch ein familiäres Vorkommen, eine normale psychomotorische Entwicklung der Betroffenen und durch eine geringe Rate von nachfolgenden Epilepsien im Erwachsenenalter (12–15 %) charakterisiert. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt ca. 1 bei 100 000 Neugeborenen (Rogawski, 2000). Multifokale oder generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle starten typischerweise am dritten Tag nach der Geburt und verschwinden spontan nach wenigen Wochen oder Monaten (Ronen *et al.*, 1993; Wakai *et al.*, 1994). Der Hauptlokus für BFNC befindet sich auf Chromosom 20q13.3 (Leppert

et al., 1989). Mutationen im Kaliumkanalgen *KCNQ2* wurden als Ursache für BFNC identifiziert (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). *KCNQ2* war daher ein sehr gutes Kandidatengen für das BFNC/Myokymie-Syndrom. Es wurde ein Aminosäureaustausch im 4. Transmembransegment, dem putativen Spannungssensor, des *KCNQ2*-Proteins gefunden. *KCNQ2*-Proteine zeigen die typische Struktur spannungsabhängiger Kaliumkanäle mit sechs Transmembransegmenten (S1–6) und einem Poren-Loop zwischen S5 und S6 (Abb. 3.7). Der lange intrazelluläre C-Terminus des Proteins enthält eine Region (A-Domäne), die unter den *KCNQ*-Proteinen stark konserviert ist (Schwabe *et al.*, 2000). Die meisten BFNC-Mutationen befinden sich entweder in der Pore, in S6 oder der A-Domäne (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Biervert und Steinlein, 1999; Lee *et al.*, 2000b). Bis zu dieser Arbeit wurden Mutationen in *KCNQ2* nur in Familien mit klassischem BFNC gefunden, bei denen die Epilepsie nicht mit anderen neurologischen Erkrankungen oder Beschwerden einherging. Der hier beschriebene Arginin zu Tryptophan Austausch an Position 207 (R207W) verursacht jedoch eine Erkrankung, die nicht auf das Gehirn beschränkt ist und nicht nur episodische, sondern auch kontinuierliche Symptome aufweist. Im BFNC/Myokymie-Syndrom werden anfänglich neonatale Krämpfe beobachtet, später leiden die Patienten und Patientinnen an unwillkürlicher, wiederholter generalisierter Muskelaktivität.

KCNQ2 ist nicht das einzige Kaliumkanalgen, in dem eine Mutation zu Myokymie führen kann. Punktmutationen im Gen für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.1 (*KCNA1*) führen zur episodischen Ataxie des Typs 1, einer autosomal dominant vererbten neurologischen Erkrankung, die durch episodische Attacken zerebellarer Ataxie, anhaltende Myokymie und selten Epilepsie gekennzeichnet ist (Browne *et al.*, 1994). Einige Mutationen führen zu Epilepsie und Myokymie ohne Episoden von Ataxie, andere Mutationen verursachen nur Myokymie. Dies zeigt Unterschiede in der Sensitivität des zentralen und peripheren Nervensystems gegenüber erhöhter neuronaler Erregbarkeit, die durch Mutationen in *KCNA1* verursacht wird (Eunson *et al.*, 2000).

Das gemeinsame Vorkommen von neonatalen Krämpfen und Myokymie in einem Patienten wurde bereits in einer anderen Familie berichtet (Auger *et al.*, 1984). Anders als bei der hier untersuchten Familie, wiesen die drei Patienten von Auger *et al.* (1984) nicht nur wellenförmige Muskelaktivitäten der oberen und unteren Extremitäten, sondern auch der Gesichtsmuskeln auf. Außerdem wurde während Phasen langanhaltender Krämpfe ein verstärktes Schwitzen der Betroffenen beobachtet. Dies ist ein typisches Symptom für erworbene Neuromyotonie. Trotzdem gibt das Vorkommen von BFNC und Myokymie in drei Familienmitgliedern eher einen Hinweis auf einen genetischen Hintergrund der Erkrankung als auf eine erworbene Autoimmunerkrankung. Bedauerlicherweise stand die Familie nicht für eine genetische Analyse zur Verfügung.

4.2.2 Die Myokymie entsteht vermutlich durch die Übererregbarkeit der unteren Motoneurone

Generalisierte Myokymie ist ein Charakteristikum des Isaacs-Syndroms (Isaacs, 1961), der episodischen Ataxie des Typ 1 (Brunt und van Weerden, 1990) und des Morvan-Syndroms (Lee *et al.*, 1998). Myokymie kann sowohl von Störungen im peripheren als auch im zentralen Nervensystem verursacht werden. Einer der häufigsten pathophysiologischen Mechanismen der Übererregbarkeit peripherer Nerven in Myokymie ist die Suppression von auswärtsgerichteten Kaliumströmen. So wurden in Patienten mit dem Isaacs-Syndrom, einer Autoimmunerkrankung mit Neuromyotonie, Muskelkrämpfen und exzessivem Schwitzen, Antikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle gefunden (Newsom-Davis und Mills, 1993; Shillito *et al.*, 1995). Seren dieser Patienten supprimierten auswärtsgerichtete spannungsabhängige Kaliumströme in PC-12-Zellen und induzierten wiederholtes Feuern von Aktionspotentialen in posterioren Ganglionzellen (Shillito *et al.*, 1995). Auch bei der hier vorgestellten Familie liegt die Ursache der muskulären Übererregbarkeit nicht in der Muskelmembran, sondern wird vermutlich durch eine veränderte Erregbarkeit der unteren Motoneurone verursacht. Dies zeigt sich vor allem dadurch, dass die Symptome von Myokymie in Patient III-2 durch Suxamethoniumchlorid und d-Tubocurarin unterdrückt werden konnten. Diese beiden Substanzen inhibieren die synaptische Übertragung an der Motorendplatte. Obwohl verschiedene Arbeiten zeigten, dass KCNQ2 sehr breit im Gehirn exprimiert wird (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), war nicht bekannt, ob KCNQ2 auch in den unteren Motoneuronen des Rückenmarks vorkommt. Die hier gezeigte *in situ* Hybridisierung lässt vermuten, dass KCNQ2 in diesen Motoneuronen exprimiert wird. Allerdings waren im anterioren Horn, wo die Motoneurone lokalisiert sind, nicht alle Zellen positiv für KCNQ2. Daher kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass es sich bei den KCNQ2-Signalen um andere Zelltypen handelt.

Verschiedene KCNQ-Kanaluntereinheiten können funktionell zu heteromeren Kanälen assoziieren (Jentsch, 2000). KCNQ2 kann mit KCNQ3 assoziieren, jedoch vermutlich nicht mit KCNQ1 (Schroeder *et al.*, 1998), KCNQ4 (Kubisch *et al.*, 1999) oder KCNQ5 (Schroeder *et al.*, 2000a), um funktionelle Kanäle mit neuen Eigenschaften zu bilden (Schroeder *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a; Yang *et al.*, 1998; Schwake *et al.*, 2000). Die Assoziation von KCNQ2 und KCNQ3 wurde nicht nur *in vitro* nachgewiesen, sondern auch durch Koimmunpräzipitationen von Cooper *et al.* (2000) *in vivo* bestätigt. Die Eigenschaften dieser Kanäle ähneln den physiologisch wichtigen M-Strömen (Wang *et al.*, 1998a), die auch durch andere Kombinationen von KCNQ-Untereinheiten, z. B. KCNQ3/KCNQ5-Heteromere (Schroeder *et al.*, 2000a; Lerche *et al.*, 2000), generiert werden können. KCNQ2 und KCNQ3 werden im Gehirn nicht immer im gleichen Verhältnis exprimiert (Schroeder *et al.*, 1998; Tinel *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000). Das könnte darauf hinweisen, dass, neben homomeren KCNQ2- und KCNQ3-Kanälen, verschiedene Stöchiometrien von KCNQ2/KCNQ3-Heteromeren vorkommen können. Die vorliegende Arbeit lässt vermuten, dass wenigstens einige Motoneurone KCNQ2/KCNQ3-Heteromere exprimieren. Motoneurone weisen verschiedene Kaliumleitfähigkeiten auf: transiente A-Typ Kaliumkanäle, nicht inaktivierende, verzögert gleichrichtende Kaliumkanäle sowie

Kalzium-abhängige Kaliumkanäle (Gao und Ziskind-Conhaim, 1998; Wolff *et al.*, 1998; Mills und Pitman, 1999; Martin-Caraballo und Greer, 2000). Erst kürzlich zeigten Alaburda *et al.* (2002), dass ein auswärtsgerichteter Kaliumstrom, ähnlich dem M-Strom, die Erregbarkeit von Rückenmarksmotoneuronen in der adulten Schildkröte reguliert (Alaburda *et al.*, 2002). So könnten *KCNQ2* oder *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromere zumindest teilweise für die verzögert gleichrichtenden Kaliumströme in Motoneuronen verantwortlich sein. Jede Veränderung in der Spannungsabhängigkeit und der Aktivierungskinetik dieser Ströme könnte zu einer erhöhten Erregbarkeit der Motoneuronen führen und dadurch unregelmäßige Entladungen der Motorendplattenpotentiale verursachen.

4.2.3 Die R207W-Mutation in *KCNQ2* hat einen dominant-negativen Effekt auf *KCNQ2*-Ströme

Der stark regulierte M-Strom, der durch *KCNQ2/KCNQ3*-Kanäle vermittelt wird, ist für die Regulation neuronaler Erregbarkeit und die Adaptation der Aktionspotentialfrequenz in Neuronen von entscheidender Bedeutung (Marrion, 1997). Eine Inhibition des M-Stroms durch Neurotransmitter oder Pharmaka führt zu neuronaler Übererregbarkeit. Dazu passt, dass Mutationen in *KCNQ2* oder *KCNQ3* BFNC verursachen. Obwohl BFNC eine autosomal dominant vererbte Erkrankung ist, wurden bisher keine dominant-negativen Effekte der *KCNQ2*- oder *KCNQ3*-Mutationen beschrieben (Schroeder *et al.*, 1998). Im Gegenteil, der Stromverlust bei *KCNQ2/KCNQ3*-Heteromeren durch die BFNC-verursachenden Mutationen wurde auf lediglich 25 % geschätzt (Schroeder *et al.*, 1998). Dieser schmale Spielraum ist vermutlich eine Konsequenz aus der regulatorischen Rolle des M-Stroms: Um die neuronale Erregbarkeit sensitiv zu regulieren, muss eine moderate Verringerung des Stroms ausreichen, die neuronale Erregbarkeit unter physiologischen Bedingungen zu erhöhen (Jentsch, 2000). Es wurde spekuliert, dass dominant-negative Mutationen in *KCNQ2* oder *KCNQ3* zu einem schwereren Krankheitsbild führen (Jentsch, 2000), was durch die perinatale Lethalität der *KCNQ2*^{-/-}-Maus unterstützt wird (Watanabe *et al.*, 2000). Allerdings sterben die *KCNQ2*^{-/-}-Mäuse nicht an einem *Status epilepticus*, sondern an einem Defekt der Atmung. In Übereinstimmung mit dem BFNC-Phänotyp von heterozygoten Patienten ist die Schwelle für pharmaka-induzierte Epilepsieanfälle in *KCNQ2*^{+/-}-Mäusen herabgesetzt (Watanabe *et al.*, 2000).

Warum verursacht die hier beschriebene Mutation R207W Myokymie und BFNC, während alle bisher bekannten Mutationen, auch die bisher einzige andere Mutation im Spannungssensor R214W (del Giudice *et al.*, 2000), keine Symptome in Muskeln hervorrufen? Die Antwort könnte in der sehr starken Verlangsamung der spannungsabhängigen Aktivierung der Kanäle durch die R207W-Mutation liegen. Diese Mutation verursacht eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des *KCNQ2*-Kanals zu positiveren Potentialen, eine Beschleunigung der Deaktivierung und eine dramatische Verlangsamung der Aktivierung, ohne die Oberflächenexpression, die *steady state* Amplitude oder die Ionenselektivität zu beeinflussen. Zusammen mit der kürzlich beschriebenen R214W-Mutation ist die R207W-Mutation die einzige *KCNQ2*-Mutation, die im Spannungssensor S4 des Proteins lokalisiert ist. Der Span-

nungssensor S4 reagiert auf Veränderungen im Membranpotential und initiiert Konformationsänderungen, die zum Öffnen des Kanals und damit zum Ionenfluss durch die Kanalpore führen. Die Hauptbewegung des S4-Segments ist eine Drehung um die Längsachse der Helix, bei der positiv geladene Aminosäuren über die Membran bewegt werden (Cha *et al.*, 1999; Glauner *et al.*, 1999). Für K_v-Kanäle wurde gezeigt, dass drei Arginin-Reste im Spannungssensor einen starken Beitrag zur Bewegung von Ladungen über die Membran leisten (Seoh *et al.*, 1996), dies sind die Arginine R365, R368 und R371. Wang *et al.* (2000) haben außerdem berichtet, dass Mutationen in R368 und R371 in dem S4-Segment des *Shaker*-Kanals ausreichend sind, um die feste Kopplung zwischen dem Spannungssensor und dem Öffnen des Kanals zu zerstören, ohne die Permeation der Ionen zu beeinflussen (Wang *et al.*, 2000). Die R207W- und die R214W-Mutation substituieren im Spannungssensor jeweils ein positiv geladenes Arginin durch einen großen hydrophoben Aminosäurerest, wobei die R207W-Mutation das dritte von sechs Argininen in KCNQ2 ersetzt und homolog zu R368 im *Shaker*-Kanal ist. Konsistent mit der Rolle von S4 als Spannungssensor beeinflussen beide Mutationen das spannungsabhängige Schalten des KCNQ2-Kanals. Der Effekt der stärker zentral gelegenen R207W-Mutation ist dabei größer als der Effekt der R214W-Mutation. Castaldo *et al.* (2002) haben in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit ebenfalls die R214W-Mutation in KCNQ2 untersucht. In Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigten sie, dass KCNQ2-Kanäle mit der R214W-Mutation langsamer aktivierten und schneller deaktivierten als die WT-Kanäle. Es wurde, wie in den hier vorgestellten Ergebnissen, keine Veränderung in der Oberflächenexpression des KCNQ2-Proteins festgestellt (Castaldo *et al.*, 2002). Der größere Effekt der R207W-Mutation auf das Schalten des KCNQ2-Kanals erklärt möglicherweise, warum nur die R207W-Mutation mit Myokymie assoziiert ist.

Die R207W-Mutation führt zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung des Kanals zu positiveren Potentialen und einer dramatischen Verlangsamung der Aktivierung. Oberflächlich betrachtet ähnelt dieser Effekt der R207W-Mutation dem Einfluss der KCNE1-Untereinheit auf das Schalten von KCNQ1, das sich durch KCNE1 dramatisch verlangsamt. Angeregt durch diese Analogie wurde der Effekt der äquivalenten Mutationen in den anderen KCNQ-Kanälen getestet. Erstaunlicherweise ergaben sich daraus keine einheitlichen Ergebnisse. So wurde die Aktivierung von KCNQ1 und KCNQ4 leicht verlangsamt und deren Spannungsabhängigkeit deutlich zu positiveren Potentialen verschoben. In KCNQ3, dessen Schalten verglichen mit den anderen KCNQ-Kanälen sehr schnell ist, hatte die Mutation keinen Effekt auf die Spannungsabhängigkeit des Kanals, sondern führte lediglich zu einer leichten Verlangsamung der Aktivierung. In KCNQ5, dessen Schalten im Vergleich zu KCNQ2 und KCNQ3 langsamer erfolgt, schien der Aminosäureaustausch das Schalten des Kanals zu verhindern. Der Kanal befand sich in einem permanent offenen Zustand, was möglicherweise dadurch verursacht wurde, dass die Bewegung des Spannungssensors durch die große hydrophobe Aminosäure Tryptophan verhindert wurde.

Die dramatisch verlangsamte Aktivierung von Kanälen, die KCNQ2 R207W-Untereinheiten enthalten, führt zu einem Verlust des Kaliumstroms, dessen Größe stark vom Muster und zeitlichen Verlauf der Depolarisation abhängt. Bei kurzen Depolarisationen, wie sie bei

einzelnen Aktionspotentialen oder einer kurzen Folge von Aktionspotentialen vorkommen, ist der Verlust des Stroms größer als in allen bisher untersuchten BFNC-Mutationen (Schroeder *et al.*, 1998). Anders als diese Mutationen hat die R207W-Mutation in KCNQ2 einen dominant-negativen Effekt bei kurzen Depolarisationen. Sie führt zu einer Reduktion der Stromamplitude um ca. 70 % im Vergleich zum WT-Strom (Abb. 3.10). Im Gegensatz dazu werden die mutierten Kanäle bei längeren Depolarisationen, wie sie bei langen (≥ 1 s) Folgen von Aktionspotentialen vorkommen können, signifikant aktiviert und können sogar die Stromamplituden von WT-Kanälen erreichen (Abb. 3.10). Allerdings sollte man dabei berücksichtigen, dass die hier dargestellten Ergebnisse in einem heterologen Expressionssystem ermittelt wurden und die Situation *in vivo* nicht genau wiedergeben können. Trotzdem ist der zeitabhängige dominant-negative Effekt der R207W-Mutation eine attraktive Hypothese, um zu erklären, warum die Myokymie mit BFNC assoziiert ist, wobei die Symptome der Epilepsie in den hier vorgestellten Patienten und Patientinnen nicht stärker waren als bei BFNC, das durch andere KCNQ2-Mutationen hervorgerufen wurde. Diese Hypothese basiert auf der Annahme, dass die Aktivität von Motoneuronen bei Myokymie von längeren ruhigen Phasen unterbrochen wird als die Aktivität der (bisher weitgehend unbekannt) Neuronen, deren Übererregbarkeit epileptische Anfälle auslöst oder erhält. Nimmt man einen dominant-negativen Effekt der R207W-Mutation bei einzelnen Aktionspotentialen oder kurzen, nicht anhaltenden Folgen elektrischer Aktivität an, wird diese Mutation stärkere Konsequenzen in Motoneuronen haben als in den zentralen Neuronen, die für die epileptischen Anfälle verantwortlich sind.

4.2.4 BFNC und Implikationen für eine genotypspezifische Therapie

Warum die Symptome bei BFNC nach wenigen Monaten meist spontan verschwinden, ist eine bisher ungeklärte Frage. Eine Möglichkeit wäre, dass das Gehirn mit zunehmendem Alter weniger empfindlich auf Störungen bei der Repolarisation von Aktionspotentialen reagiert. Möglicherweise erhöht sich mit zunehmendem Alter die Diversität der Kaliumkanäle, die in den entsprechenden Neuronen exprimiert werden, so dass andere Kaliumkanäle, z. B. EAG-ähnliche Kanäle, die Aufgabe von KCNQ2/KCNQ3-Heteromeren bei der Modulation neuronaler Erregbarkeit übernehmen könnten. Tinel *et al.* (1998) konnten jedoch keine quantitative Veränderung der KCNQ2- und KCNQ3-Expression in Northern Blots von Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien feststellen. Auch eine verstärkte Expression von Chloridkanälen würde die neuronale Erregbarkeit der betroffenen Neuronen herabsetzen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich die Erregbarkeit der Zellen durch die Ausbildung neuer Synapsen verändert.

Die durch die R207W-Mutation geänderten Schalt-Eigenschaften von KCNQ2 könnten beträchtliche Implikationen für eine genotypspezifische Therapie haben. Die Substanz Retigabin (D-23129) ist ein neues antikonvulsives Mittel, das momentan in einer Reihe von klinischen Studien zur Behandlung von Epilepsie getestet wird. *In vivo* Experimente haben gezeigt, dass Retigabin in vielen Epilepsie-Modellen (Rostock *et al.*, 1996) und genetischen Modellen für Epilepsie (Tober *et al.*, 1996; Dailey *et al.*, 1995) wirksam ist. Die Substanz blockiert in ho-

hen Konzentrationen Natriumkanäle (Rundfeldt und Netzer, 2000), erhöht GABA-aktivierte Ströme in kultivierten Neuronen (Rundfeldt und Netzer, 2000) und öffnet Kaliumkanäle in Neuronen (Rundfeldt, 1997; Rundfeldt, 1999). Kürzlich wurde gezeigt, dass Retigabin das Schalten von KCNQ2/KCNQ3-Heteromeren beeinflusst, indem es die Spannungsabhängigkeit von KCNQ2 und KCNQ3 zu stärker hyperpolarisierten Potentialen verschiebt und die Deaktivierung der Kanäle verlangsamt (Main *et al.*, 2000; Wickenden *et al.*, 2000). Das ist genau die gegenteilige Wirkung der hier beschriebenen R207W-Mutation und in geringerem Maße der R214W-Mutation. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass die funktionellen Auswirkungen einer Mutation die Effizienz eines Therapeutikums beeinflussen und möglicherweise bei der Wahl geeigneter Therapeutika soweit wie möglich berücksichtigt werden sollten.

4.2.5 Ausblick

Um eine Beteiligung von KCNQ2 an den auswärtsgerichteten Strömen in den Motoneuronen des Rückenmarks nachzuweisen, könnten *Patch clamp* Messungen an diesen Zellen durchgeführt werden. Mit Hilfe einer transgenen Mauslinie, der die R207W-Mutation in das *KCNQ2*-Gen eingefügt wurde, könnte man die Pathophysiologie der neonatalen Epilepsie und der Myokymie genauer untersuchen. Da das Fehlen beider *KCNQ2*-Allele lethal ist (Watanabe *et al.*, 2000), wäre auch die Generierung eines konditionellen *Knockouts* für *KCNQ2* wünschenswert, bei dem die *KCNQ2*-Expression entweder zeitabhängig oder auf bestimmt Gewebe beschränkt erfolgt.

4.3 Analyse von Mausmodellen für die progrediente Ertaubung DFNA2

Hörverlust ist der häufigste vererbte sensorische Defekt im Menschen. Etwa 70 Millionen Menschen weltweit leiden unter einem Hörverlust von mehr als 55 dB (Wilson, 1985). Der Anteil betroffener Personen steigt mit zunehmendem Alter dramatisch an. Ein Hörverlust kann sowohl umweltbedingte als auch genetische Ursachen haben. Der progrediente Hörverlust älterer Menschen (Presbyakusis) scheint meistens durch eine Kombination beider Faktoren verursacht zu werden (Kubisch *et al.*, 1999). Vererbte Taubheiten werden in nicht-syndromisch (ohne andere Symptome) oder syndromisch (mit anderen Anomalien assoziiert) klassifiziert. Nicht-syndromische Taubheit, zu der auch der hier vorgestellte progrediente Hörverlust (DFNA2) zählt, wird nach ihrem Erbgang eingeteilt und in DFN (X-chromosomal), DFNA (autosomal dominant) und DFNB (autosomal rezessiv) unterschieden. Im Allgemeinen hat die autosomal rezessiv vererbte Taubheit einen frühen Krankheitsbeginn und einen schweren Verlauf. Autosomal dominante Taubheit hingegen entwickelt sich häufig langsamer über mehrere Dekaden (Kubisch *et al.*, 1999). In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Genloci für nicht-syndromische Taubheit identifiziert. So gibt es mindestens 41 Genorte für autosomal dominant vererbte Taubheit (DFNA1-DFNA41) und mindestens 33 Genorte für DFNB. In einigen Fällen

kann, abhängig von der Mutation, ein und dasselbe Gen sowohl dominant als auch rezessiv vererbte Taubheit verursachen (Kelsell *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Weil *et al.*, 1997; Denoyelle *et al.*, 1998; Verhoeven *et al.*, 1998; Mustapha *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit untersuchte nicht-syndromische Taubheit DFNA2 besitzt einen Genort auf Chromosom 1p34 (Coucke *et al.*, 1994; Van Camp *et al.*, 1997). Die genetische Analyse von sechs Familien hat gezeigt, dass dieser Taubheitslocus nicht nur ein Gen enthält, sondern mindestens zwei, wenn nicht sogar drei Gene umfasst (Van Hauwe *et al.*, 1999b; Goldstein und Lalwani, 2002). Davon codiert ein Gen für das *Gap junction*-Protein Connexin 31 (*GJB3*) (Xia *et al.*, 1998), während ein anderes für den in dieser Arbeit untersuchten Kaliumkanal *KCNQ4* codiert (Kubisch *et al.*, 1999). Ein eventuell vorhandenes drittes Gen, das in einer indonesischen Familie Taubheit verursacht, deren Mitglieder weder eine Mutation in *KCNQ4* noch in *GJB3* aufweisen, ist noch nicht gefunden worden (Van Hauwe *et al.*, 1999b). Kubisch *et al.* (1999) identifizierten eine Glyzin zu Serin Mutation an Position 285 (G285S) des *KCNQ4*-Proteins in einer von DFNA2 betroffenen Familie. Die Mutation betraf die Konsensus-Sequenz GYG des Selektivitätsfilters in der Kanalpore. Inzwischen sind sieben DFNA2-verursachende *KCNQ4*-Mutationen bekannt, von denen die meisten *in vitro* einen dominant-negativen Effekt auf die WT-Ströme ausüben (Kubisch *et al.*, 1999; Coucke *et al.*, 1999; Talebizadeh *et al.*, 1999; Akita *et al.*, 2001; Van Hauwe *et al.*, 1999a). Um den bisher unbekanntem Pathomechanismus der Ertaubung aufzuklären, wurden von Tatjana Kharkovets in unserem Labor verschiedene Mausmodelle für DFNA2 generiert. Dabei handelte es sich erstens um eine *KCNQ4*-defiziente Maus (*KCNQ4*^{-/-}), bei der die Exone 6-8 von *KCNQ4* deletiert wurden. Die Deletion führte zu einem Verlust der Porenregion, des 6. Transmembransegments und einem Bereich des angrenzenden C-Terminus. Zweitens wurde eine transgene Maus mit einer dominant-negativen Mutation (G285S) in der Pore des *KCNQ4*-Proteins hergestellt, um ein Mausmodell zu generieren, das direkt der menschlichen Mutation entspricht (*KCNQ4-DN*^{+/-} und *KCNQ4-DN*^{+/+}).

Messungen am auditorischen Hirnstamm haben gezeigt, dass homozygote *KCNQ4*-defiziente und transgene Tiere ab einem Alter von ca. vier Wochen einen signifikanten Hörverlust im Vergleich zu ihren WT-Geschwistern aufweisen. Nach etwa zehn Monaten waren die *KCNQ4*^{-/-}, *KCNQ4-DN*^{+/-}- und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Mäuse nahezu taub, während die Hörschwellen der WT-Tiere bei 23 dB lagen (Abb. 3.14). Die Deletion der Exone 6-8 bzw. die Einführung der Porenmutation, die der Mutation beim Menschen entspricht, haben zu einer progredienten Ertaubung der Mäuse geführt. Durch die gezielte Veränderung des Mausgenoms ist es also gelungen, Mausmodelle für DFNA2 herzustellen, die die Untersuchung der Pathophysiologie des Hörverlusts ermöglichen. Allerdings war es mit den Messungen am auditorischen Hirnstamm nicht möglich, einen Hörverlust bei hohen Frequenzen zu detektieren, da in einem Frequenzbereich von 5 kHz gemessen wurde, der für Mäuse relativ niedrig ist. Im Menschen beginnt der Hörverlust in der 1. oder 2. Lebensdekade bei hohen Frequenzen. Um Aussagen über einen entsprechend hohen Frequenzbereich bei Mäusen zu machen, wären Messungen im Bereich von mindestens 40 kHz nötig. Dies war mit der zur Verfügung stehenden Anlage jedoch nicht möglich.

Wie Tatjana Kharkovets in den Immunfluoreszenzfärbungen zeigen konnte, führte die De-

letion der Exone 6–8 des *KCNQ4*-Gens zum Verlust des KCNQ4-Proteins in den *KCNQ4*^{-/-}-Tieren (Abb. 3.15 C). Wie bereits beschrieben (Kharkovets *et al.*, 2000), färbte der KCNQ4-Antikörper die basale Membran der äußeren Haarzellen im Cortischen Organ, während in den inneren Haarzellen kein Signal detektiert wurde.

4.3.1 KCNQ4 vermittelt den $I_{K,n}$ -Strom äußerer Haarzellen

Im Cortischen Organ der Mammalia haben sich zwei Klassen von Haarzellen entwickelt, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Die inneren Haarzellen, die durch ca. 90–95 % der Afferenzen des 8. Hirnnervs innerviert werden (Spoendlin, 1969), stellen den primären sensorischen Rezeptor dar. Die äußeren Haarzellen fungieren als mechanische Effektoren, die ein Feedback zur Basalmembran des Cortischen Organs vermitteln. Durch dieses Feedback erhöht sich die auditorische Sensitivität und das Vermögen, Frequenzen aufzulösen (Brownell *et al.*, 1985; Ashmore, 1987). Physikalische Verschiebungen der Stereozilien äußerer Haarzellen führen zur Aktivierung von Transduktionsströmen durch mechanosensitive Kanäle (Dallos *et al.*, 1982; Geleoc *et al.*, 1997), wobei die Spannungsänderung über der Membran Änderungen in der Länge äußerer Haarzellen verursacht (Brownell *et al.*, 1985; Ashmore, 1987; Dallos und Corey, 1991). So führt eine Depolarisation zur Verkürzung äußerer Haarzellen, während Hyperpolarisation eine Verlängerung der Zelle auslöst. Diese Elektromotilität entsteht vermutlich durch spannungsabhängige Konformationsänderungen eines Motorproteins und wird von der Translokation von Ladungen über die basolaterale Membran der äußeren Haarzellen begleitet (Santos-Sacchi, 1991). Kürzlich zeigten Zheng *et al.* (2000), dass das integrale Membranprotein Prestin mit dem Motorprotein in äußeren Haarzellen identisch ist. Prestin zeigt *in vitro* alle Eigenschaften eines Motorproteins, wie Spannungsabhängigkeit und Bewegung von Ladung über die Membran, und führt in transfizierten Zellen zu Zellmotilität (Zheng *et al.*, 2000; Belyantseva *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2001; Santos-Sacchi *et al.*, 2001). Die Deletion von Prestin verursachte in Mäusen einen Verlust der Elektromotilität äußerer Haarzellen und einen Hörverlust von ca. 45–65 dB (Liberman *et al.*, 2002).

Die basolaterale Membran äußerer Haarzellen enthält eine Reihe unterschiedlicher Kaliumleitfähigkeiten. Marcotti und Kros (1999) beschrieben einen auswärtsgerichteten K^+ -Strom, der bei -50 mV aktiviert und eine langsame Inaktivierung aufweist. Dieser Strom, $I_{K,neo}$ genannt, vermittelt den größten Teil des Kaliumauswärtsstroms in der basolateralen Membran äußerer Haarzellen, bevor die Zellen ihre volle Funktion entfalten (Marcotti und Kros, 1999). $I_{K,neo}$ wird in Mäusen in der ersten postnatalen Woche exprimiert und nimmt innerhalb dieser Zeit an Größe zu, wird jedoch ab P6 vermutlich herunterreguliert (Marcotti und Kros, 1999). Ein ähnliches zeitliches Expressionsmuster weist der I_{K1} -Strom auf, der ebenfalls in der ersten postnatalen Woche exprimiert wird und zwischen P6 und P8 verschwindet (Marcotti *et al.*, 1999). Dies korreliert gut mit der funktionellen Reifung äußerer Haarzellen. So ist die spannungsabhängige Motilität der Zellen erstmals ab P8 in Mäusen nachweisbar (Marcotti *et al.*, 1999). I_{K1} vermittelt einen einwärtsgerichteten K^+ -Strom, der in basalen äußeren Haarzellen erheblich größer ist als in apikalen Haarzellen (Marcotti *et al.*, 1999).

Neben $I_{K,neo}$ und I_{K1} wurden in äußeren Haarzellen zwei weitere Kaliumleitfähigkeiten beschrieben, $I_{K,n}$ und I_K (Housley und Ashmore, 1992; Mammano *et al.*, 1995; Mammano und Ashmore, 1996). I_K wird vermutlich nicht nur von einem Kaliumkanal vermittelt, sondern umfasst wahrscheinlich mehrere Kanäle. Dieser Strom aktiviert bei Potentialen über -40 mV, mit einer halbmaximalen Aktivierung von ca. -25 mV (Mammano und Ashmore, 1996). I_K ist durch $100 \mu\text{M}$ 4-Aminopyridin und 30 mM TEA inhibierbar (Mammano *et al.*, 1995). Zumindest ein Teil dieser Kaliumleitfähigkeit wird durch Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle vermittelt, wobei der Anteil am Gesamtauswärtsstrom jedoch relativ gering ist. So zeigten Nenov *et al.* (1997) an äußeren Haarzellen des Meerschweinchens, dass Charybdotoxin, ein selektiver Blocker von Ca^{2+} -abhängigen BK-Kanälen, den Auswärtsstrom um ca. 15 % reduzierte. Lin *et al.* (1995) berichteten von einem deutlichen Auswärtsstrom, der in äußeren Haarzellen messbar war, nachdem das extrazelluläre Kalzium entfernt wurde, was auf einen zweiten, Ca^{2+} -unabhängigen Strom hinweist. $I_{K,n}$ ist ein Kaliumstrom, der ab dem postnatalen Tag 8 in äußeren Haarzellen der Maus nachweisbar ist und mit zunehmender Reifung der Haarzellen an Größe zunimmt (Marcotti und Kros, 1999). $I_{K,n}$ ist durch einen instantan auftretenden Einwärtsstrom bei Hyperpolarisation und durch einen Auswärtsstrom bei Depolarisation gekennzeichnet (Housley und Ashmore, 1992; Mammano und Ashmore, 1996; Marcotti und Kros, 1999). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass *KCNQ4* den $I_{K,n}$ in äußeren Haarzellen vermittelt, da in *KCNQ4*-defizienten Tieren eine Kaliumleitfähigkeit fehlt, die alle Charakteristika von $I_{K,n}$ aufweist. In den äußeren Haarzellen von *KCNQ4*^{+/+}-Tieren war eine Stromkomponente nachweisbar, die bei ca. -82 mV halbmaximal aktiviert war. Das stimmt gut mit der halbmaximalen Aktivierung von $I_{K,n}$ bei Potentialen zwischen -70 und -100 mV überein (Housley und Ashmore, 1992; Mammano und Ashmore, 1996). Diese Stromkomponente war XE991-sensitiv und konnte durch die Subtraktion XE991-insensitiver Ströme vom Ganzzellstrom ermittelt werden. Nach der Zugabe von XE991 verblieb ein auswärtsgerichteter Kaliumstrom, der bei -12 mV halbmaximal aktiviert war. XE991 ist ein spezifischer Blocker von M-Strömen (Costa und Brown, 1997; Lamas *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998b), der vor allem *KCNQ*-Kanäle blockiert. Marcotti *et al.* (1999) zeigten, dass die Substanz Linopirdin, die strukturell mit XE991 eng verwandt ist, den $I_{K,n}$ äußerer Haarzellen der Maus mit einem K_D -Wert von $0,7 \mu\text{M}$ inhibiert. Nach der Linopirdin-Applikation registrierten sie eine Stromkomponente, die auswärts gerichtet war und bei Potentialen von -30 ± 12 mV halbmaximal aktiviert war (Marcotti und Kros, 1999), was nicht ganz mit den hier ermittelten Werten für *KCNQ4*^{+/+}-Tiere übereinstimmt. Vermutlich ist der verbleibende Strom mit I_K identisch, für den Mammano und Ashmore (1996) eine halbmaximale Aktivierung von -25 mV ermittelten. Die XE991-sensitive Komponente der basolateralen Kaliumströme äußerer Haarzellen war in *KCNQ4*^{+/-}-Tieren mit einer geringeren Amplitude als in *KCNQ4*^{+/+}-Tieren vorhanden und fehlte in *KCNQ4*^{-/-}- sowie in *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tieren ganz. In diesen Haarzellen war lediglich eine Stromkomponente messbar, die eine halbmaximale Aktivierung von ca. -19 mV aufwies und vermutlich mit I_K identisch ist. Äußere Haarzellen von *KCNQ4-DN*^{+/-}-Tieren wiesen eine sehr kleine XE991-sensitive Kaliumstromkomponente auf. In diesen Tieren, die ein *KCNQ4*-Allel mit der dominant-negativen G285S-Mutation und ein WT-Allel besitzen, bilden

sich mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 7% homomere Kanäle aus WT-Untereinheiten. Sie könnten für die XE991-sensitive Restleitfähigkeit verantwortlich sein. Kubisch *et al.* (1999) berichteten von einem dominant-negativen Effekt der G285S-Mutation auf WT-KCNQ4, der bei heterologer Expression in *Xenopus* Oozyten zu einer Reduktion der Stromamplitude um ca. 90% führt. Dies stimmt gut mit den hier ermittelten Werten überein.

Marcotti *et al.* zeigten, dass die Inhibition von $I_{K,n}$ durch Linopirdin zu einem Anstieg des Ruhemembranpotentials äußerer Haarzellen um ca. 20 mV führt. Auch bei den für diese Arbeit durchgeführten *Patch clamp* Messungen verursachte die Applikation von XE991 (0,5 μ M) nicht nur die Blockierung des instantanen hyperpolarisationsaktivierten Einwärtsstroms sowie eine Verringerung der Amplitude depolarisationsaktivierter Auswärtsströme, sondern auch eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials äußerer Haarzellen von WT-Tieren um ca. 15 mV. In Übereinstimmung mit diesen Werten und der Hypothese, dass KCNQ4 das molekulare Korrelat von $I_{K,n}$ darstellt, wiesen äußere Haarzellen von KCNQ4-defizienten Tieren sowie von transgenen Tiere mit einer dominant-negativen *KCNQ4*-Mutation um 10–17 mV depolarisierte Ruhemembranpotentiale auf als die Haarzellen von *KCNQ4*^{+/+}-Tieren. Allerdings waren die Ruhemembranpotentiale 11 bis 13 Tage alter *KCNQ4*^{+/+}-Mäuse mit ca. –54 mV höher als bei Messungen von Marcotti und Kros (1999), die in ähnlich alten Mäusen ein Ruhemembranpotential von ca. –65 bis –70 mV ermittelten. Diese Unterschiede könnten auf unterschiedliche genetische Hintergründe der verwendeten Mauslinien zurückzuführen sein. Auch spielen die Umgebungstemperatur und die Konzentrationen der verwendeten Lösungen bei der Determination des Ruhemembranpotentials eine Rolle.

$I_{K,n}$ leistet also einen Beitrag zum Ruhemembranpotential der äußeren Haarzellen. Der Verlust dieser Leitfähigkeit führt zu einer permanenten Depolarisation der äußeren Haarzellen um 10–17 mV. Ob diese Depolarisation die Ursache für die progrediente Ertaubung von Mäusen und Menschen darstellt, wird in einem späteren Kapitel diskutiert.

Durch seine Spannungsabhängigkeit, die durch eine halbmaximale Aktivierung in Nähe des Ruhemembranpotentials gekennzeichnet ist, vermittelt $I_{K,n}$ die wesentliche Kaliumleitfähigkeit äußerer Haarzellen in Ruhe. Da ein Verlust von KCNQ4 zu einem Verlust von $I_{K,n}$ führt, kann geschlossen werden, dass KCNQ4 das molekulare Korrelat dieser Kaliumleitfähigkeit darstellt. Unklar bleibt jedoch, warum die Spannungsabhängigkeit, Kinetik und XE991-Sensitivität von KCNQ4 *in vivo* und im heterologen Expressionssystem so unterschiedlich sind. Während KCNQ4 bei Expression in *Xenopus* Oozyten eine halbmaximale Aktivierung von –10 mV (Kubisch *et al.*, 1999) und in HEK-Zellen von –32 mV (Søgaard *et al.*, 2001) aufweist, ist die halbmaximale Aktivierung von $I_{K,n}$ um mehr als –50 mV zu negativeren Potentialen verschoben. Auch bei der Aktivierungskinetik bestehen große Unterschiede. $I_{K,n}$ weist einen instantanen Einwärtsstrom bei Hyperpolarisation auf. Heterolog in HEK-Zellen exprimierte KCNQ4-Kanäle aktivieren zwar ebenfalls auf Hyperpolarisation, jedoch erheblich langsamer (Søgaard *et al.*, 2001). Eine weitere Diskrepanz besteht bei der Sensitivität gegenüber den M-Stromblockern XE991 und Linopirdin. Kubisch *et al.* (1999) zeigten, dass 200 μ M Linopirdin KCNQ4-Ströme in *Xenopus* Oozyten um lediglich 30% blockierten. Søgaard *et al.* (2001) ermittelten in transfizierten HEK-Zellen einen K_D -Wert von 5,5 μ M für XE991 und

14 μM für Linopirdin. Dagegen bewirkte die in dieser Arbeit verwendete XE991-Konzentration von 0,5 μM einen vollständigen Block von $I_{K,n}$. Vergleichbar mit diesen Werten ermittelten Marcotti und Kros (1999) in äußeren Haarzellen der Maus einen K_D -Wert von 0,7 μM für Linopirdin. Die Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit, Blockersensitivität und Aktivierungskinetik zwischen *in vivo* und *in vitro* Strömen könnten einerseits darauf hindeuten, dass die verwendeten heterologen Expressionssysteme die Besonderheiten der äußeren Haarzellen nicht widerspiegeln können. Allerdings entspricht auch das hier verwendete System nicht der *in vivo* Situation, da sich die apikale Seite äußerer Haarzellen *in vivo* in der kaliumreichen Endolymphe der *Scala media* befindet. Diese komplexe Situation konnte in den hier beschriebenen *Patch clamp* Messungen am semi-intakten Gewebe nicht nachgestellt werden. Andererseits könnten die Unterschiede zwischen heterolog exprimierten KCNQ4-Kanälen und $I_{K,n}$ Hinweise auf eine beteiligte unbekannt Komponente liefern. So wäre es denkbar, dass KCNQ4 in den äußeren Haarzellen mit einer bisher unbekannt Kaliumkanaluntereinheit interagiert. Auch eine Assoziation mit KCNQ3 kann nicht ausgeschlossen werden, denn Kubisch *et al.* (1999) wiesen KCNQ3 durch RT-PCR in der Cochlea nach. Da KCNQ3 zumindest in heterologen Expressionssystemen nur sehr geringe Ströme liefert und mit KCNQ4 interagieren kann (Kubisch *et al.*, 1999), ist eine Beteiligung dieses Kanals am $I_{K,n}$ nicht ausgeschlossen, auch wenn $I_{K,n}$ in den äußeren Haarzellen der KCNQ4-defizienten Tiere vollständig fehlte und in diesen Zellen neben den XE991-insensitiven Strömen keine zusätzliche Stromkomponente sichtbar war. Wahrscheinlicher als die Interaktion mit einer Kaliumkanal- α -Untereinheit ist allerdings die Assoziation mit einer β -Untereinheit. Zumindest für die β -Untereinheiten der KCNE-Familie gibt es jedoch keinen Hinweis auf eine funktionelle Interaktion mit KCNQ4. Schroeder *et al.* (2000) berichteten lediglich, dass KCNE3 den Strom von KCNQ4 über einen bisher unbekannt Mechanismus inhibiert. Statt der Interaktion mit anderen Kaliumkanaluntereinheiten ist jedoch auch eine Modulation des KCNQ4-Stroms durch zytosolische Effektoren, Proteinkinasen etc. denkbar. Jagger und Ashmore (1999) zeigten, dass $I_{K,n}$ in äußeren Haarzellen der Meerschweinchen-Cochlea durch die Zugabe eines cAMP-Analogs aktiviert werden kann, und legten nahe, dass die Proteinkinase A einen Einfluss auf diesen basalen Kaliumstrom hat.

4.3.2 Die Rolle von KCNQ4 in den inneren Haarzellen

Die inneren Haarzellen der Cochlea stellen die primären sensorischen Zellen des Cortischen Organs dar. Deflektion der Haarzellstereozilien öffnet mechanosensitive Kanäle und verursacht eine Depolarisation der inneren Haarzelle durch den Einstrom von Kationen. Die inneren Haarzellen generieren ein Rezeptorpotential, das die afferente synaptische Aktivität kontrolliert und damit die Frequenz und das Timing von Aktionspotentialen in den postsynaptischen auditorischen Neuronen beeinflusst. Während der postnatalen Entwicklung unterliegen innere Haarzellen massiven Veränderungen in ihren elektrischen Eigenschaften (Beutner und Moser, 2001). Innere Haarzellen der Maus können vor Beginn des Hörens in der zweiten postnatalen Woche (Ehret, 1985), Aktionspotentiale auslösen, die vor allem durch Ca^{2+} -Kanäle vermittelt werden (Kros *et al.*, 1998). Diese Fähigkeit verlieren die Zellen mit zunehmendem

Alter durch die Expression eines Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals (Kros *et al.*, 1998), so dass reife innere Haarzellen nur noch gradierte Rezeptorpotentiale generieren.

In inneren Haarzellen der Cochlea sind bisher drei verschiedene Kaliumströme ($I_{K,f}$, $I_{K,s}$ und I_{K1}) charakterisiert worden. $I_{K,f}$ wird von einem Ca^{2+} - und spannungsabhängigen BK-Kanal vermittelt, ist TEA-sensitiv und weist eine sehr schnelle Aktivierungskinetik auf (Kros und Crawford, 1990; Kros *et al.*, 1998). $I_{K,s}$ wird möglicherweise durch einen K_v -Kanal repräsentiert, der eine langsamere Kinetik aufweist als $I_{K,f}$ und durch 4-Aminopyridin inhibierbar ist (Kros *et al.*, 1998). $I_{K,f}$ und $I_{K,s}$ sind jeweils auswärtsgerichtete Kaliumkanäle, die die Spannungsantwort und das Ruhemembranpotential von inneren Haarzellen bestimmen (Kros *et al.*, 1998). I_{K1} stellt hingegen eine einwärtsgerichtete Leitfähigkeit dar, die in inneren Haarzellen transient exprimiert wird und in Mäusen mit Beginn der Hörfähigkeit (ca. P10–P12) nicht mehr nachweisbar ist (Marcotti *et al.*, 1999). I_{K1} kann durch externe Ba^{2+} - und Cs^+ -Ionen inhibiert werden und ist auch in äußeren Haarzellen der Cochlea nachweisbar (s. 4.3.1). Bisher ist in inneren Haarzellen kein Kaliumstrom beschrieben worden, der Charakteristika des $I_{K,n}$ -Stroms äußerer Haarzellen aufweist. Während Kubisch *et al.* (1999) und Kharkovets *et al.* (2000) KCNQ4 nur in äußeren Haarzellen der Maus-Cochlea nachgewiesen haben und keine KCNQ4-Expression in inneren Haarzellen detektierten, zeigten Beisel *et al.* (2000) durch RT-PCR und *in situ* Hybridisierung in der Ratten-Cochlea auch eine KCNQ4-Expression in den inneren Haarzellen des Cortischen Organs.

Da die Expression von KCNQ4 in inneren Haarzellen umstritten ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die Kaliumleitfähigkeiten und das Ruhemembranpotential von inneren Haarzellen der WT-Tiere von denen der KCNQ4-defizienten Tiere unterscheiden. Das Ruhemembranpotential der inneren Haarzellen von $KCNQ4^{+/+}$ -Tieren lag mit ca. -64 mV (Abb. 3.23) deutlich negativer als das Ruhemembranpotential der äußeren Haarzellen (-54 mV) (Abb. 3.16). Kros und Crawford (1990) registrierten mit -65 mV ein ähnlich negatives Ruhemembranpotential in isolierten inneren Haarzellen des Meerschweinchens. Am semi-intakten Gewebe ermittelten Kros *et al.* (1998) für innere Haarzellen der Maus im Alter von zwei bis zehn Tagen ein Ruhemembranpotential von ca. -60 mV und ab P19 bis P68 ein Ruhemembranpotential von -65 mV, was gut mit den hier ermittelten Werten übereinstimmt. Marcotti *et al.* (1999) berichteten, dass innere Haarzellen ein um 5–10 mV depolarisiertes Ruhemembranpotential aufweisen als apikale äußere Haarzellen. Auch dies stimmt gut mit den hier ermittelten Werten für apikale äußere und innere Haarzellen überein. $KCNQ4^{-/-}$ -Tiere sowie Tiere mit der dominant-negativen G285S-Mutation im $KCNQ4$ -Gen wiesen ca. 6–8 mV depolarisiertere Ruhemembranpotentiale auf als die WT-Tiere (Abb. 3.23). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen waren nicht so groß wie bei den Ruhemembranpotentialen der äußeren Haarzellen. Trotzdem deuten die signifikanten Unterschiede auf eine Beteiligung von KCNQ4 am Ruhestrom der inneren Haarzellen hin. Die Applikation von XE991 induzierte in inneren Haarzellen von $KCNQ4^{+/+}$ -Tieren eine Veränderung des Ruhemembranpotentials um 3–5 mV, was ebenfalls die Beteiligung eines KCNQ-Kanals am Ruhestrom vermuten lässt. Ob die leichte Depolarisation der inneren Haarzellen von KCNQ4-defizienten Tieren und den Tieren mit der dominant-negativen $KCNQ4$ -Mutation eine Ursache der progredienten Ertaubung

darstellt, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

Um zu prüfen, ob KCNQ4 einen Anteil an den Kaliumströmen in den inneren Haarzellen hat, wurde zunächst der Effekt von XE991 auf die Ganzzellströme in inneren Haarzellen untersucht. XE991 hatte jedoch in Konzentrationen bis zu $5 \mu\text{M}$ keinen Einfluss auf die Einwärts- oder Auswärtsströme in inneren Haarzellen von 12-14 Tage alten WT-Mäusen, obwohl XE991, wie bereits erwähnt, das Ruhemembranpotential um wenige Millivolt veränderte. Der Vergleich der Leitfähigkeiten zwischen WT-Mäusen und KCNQ4-defizienten Tieren zeigte, dass innere Haarzellen von $KCNQ4^{-/-}$ - und $KCNQ4DN^{+/+}$ -Tieren bei Hyperpolarisation geringere Einwärtsströme aufwiesen als innere Haarzellen aus $KCNQ4^{+/+}$ -Tieren (Abb. 3.24, 3.25). Zellen von $KCNQ4DN^{+/-}$ -Tieren wiesen mittlere Einwärtsströme auf, während sich die Ströme innerer Haarzellen von $KCNQ4^{+/-}$ -Tieren nicht von WT-Tieren unterschieden. Die hyperpolarisationsaktivierten Kaliumströme innerer Haarzellen werden durch I_{K1} vermittelt (Marcotti *et al.*, 1999). Die geringere einwärtsgerichtete Leitfähigkeit in KCNQ4-defizienten Tieren lässt eine Beteiligung von KCNQ4 an diesem Strom vermuten. XE991 scheint entweder keinen Einfluss auf diese Stromkomponente zu haben, oder die Wirkung auf die Stromamplitude ist zu gering, als dass sie durch Ganzzellableitungen aufgelöst werden könnte. Depolarisierende Spannungssprünge erzeugten in allen Genotypen große Auswärtsströme, deren Amplitude bei $KCNQ4DN^{+/+}$ -Tieren am niedrigsten und bei $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren am höchsten war (Abb. 3.25). Dabei war die Variabilität der Stromamplitude groß. Diese depolarisationsaktivierten Ströme sind vermutlich weitgehend auf den langsam aktivierenden Kaliumstrom $I_{K,s}$ zurückzuführen (Kros *et al.*, 1998). KCNQ4 ist an diesem Strom vermutlich nicht beteiligt, da $KCNQ4^{-/-}$ -Tiere einen sehr großen $I_{K,s}$ -Strom aufwiesen. Der schnell aktivierende auswärtsgerichtete Strom $I_{K,f}$ war in einigen Haarzellen von 12-14 Tage alten Tieren noch nicht nachweisbar oder wurde durch die Applikation von 5 mM TEA blockiert, was keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential der inneren Haarzellen hatte. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den Ganzzellströmen von inneren Haarzellen der verschiedenen Mausmodelle erheblich geringer als in Strömen von äußeren Haarzellen. Es wurde keine eindeutige Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Ströme festgestellt, so dass nicht auf das Fehlen einer Stromkomponente geschlossen werden konnte. Die Unterschiede in den Stromamplituden der verschiedenen Genotypen waren in Nähe des Ruhemembranpotentials (-60 bis -65 mV) sehr gering (Abb. 3.25). Trotzdem scheint eine Beteiligung von KCNQ4 an den basolateralen Leitfähigkeiten innerer Haarzellen sehr wahrscheinlich. Allerdings ist der Beitrag von KCNQ4 sowohl zum Ruhestrom als auch zum Kaliumeinwärtsstrom geringer als in äußeren Haarzellen. Ein Einfluss auf Kaliumauswärtsströme wurde nicht festgestellt. Möglicherweise ist KCNQ4 in den inneren Haarzellen der Maus nur in sehr geringem Maße exprimiert. Dafür spricht, dass KCNQ4 mit einem polyklonalen Antikörper nicht in diesen Zellen detektiert werden konnte (Kharkovets *et al.*, 2000). Beisel *et al.* (2000) berichteten von einer schwachen Expression von KCNQ4 in den apikalen inneren Haarzellen des Cortischen Organs, die bei den hier vorgestellten *Patch clamp* Messungen untersucht wurden. Möglicherweise ist der Beitrag von KCNQ4 an den Ganzzellströmen in basalen inneren Haarzellen größer als hier dargestellt.

4.3.3 Die Pathophysiologie von DFNA2

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Genen kloniert, die mit verschiedenen Formen vererbbarer Taubheit assoziiert sind. Für einige dieser Gene ist es gelungen, die Pathophysiologie der Ertaubung durch Lokalisation der Genprodukte oder durch die Generierung entsprechender Mausmodelle aufzuklären. So konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Kaliumkanal KCNQ1 oder in der β -Untereinheit KCNE1 zum Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom führen (Neyroud *et al.*, 1997; Chouabe *et al.*, 1997; Tyson *et al.*, 1997), einer rezessiv vererbten Form des LQT-Syndroms, die mit einer kongenitalen Taubheit einhergeht. KCNQ1/KCNE1-Heteromere sind für die Kaliumsekretion der Marginalzellen der *Stria vascularis* verantwortlich. Der endolymphatische Raum (*Scala media*) in der Cochlea bricht in Mäusen, die entweder KCNE1- oder KCNQ1-defizient sind, zusammen (Vetter *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000a; Casimiro *et al.*, 2001), da die Flüssigkeitssekretion in die *Scala media* gestört ist.

Durch die Generierung von $KCNQ4^{-/-}$ -Tieren und Mäusen mit einer dominant-negativen $KCNQ4$ -Mutation ist es gelungen, Mausmodelle für DFNA2 herzustellen. Sowohl in den betroffenen Patienten als auch in den Mausmodellen verläuft die Ertaubung progredient und resultiert in absoluter Taubheit. Nach zehn Jahren beträgt der Hörverlust beim Menschen 90 dB bei einer Frequenz von 8 kHz (Marres *et al.*, 1997). Der Hörverlust der transgenen Tiere mit der dominant-negativen G285S-Mutation lag in einem Alter von 42 Tagen in einem ähnlichen Bereich (88-91 kHz, bei einer Frequenz von 2-5 kHz). In Mäusen geht die progrediente Ertaubung mit einem Untergang basaler äußerer Haarzellen einher, während die apikalen äußeren Haarzellen sowie die inneren Haarzellen erhalten bleiben (Kharkovets, *persönliche Mitteilung*). Der Untergang der basalen Haarzellen passt gut zu der Tatsache, dass die Ertaubung in betroffenen Patienten bei höheren Frequenzen beginnt, deren Verstärkung Aufgabe der basalen äußeren Haarzellen ist. Die apikalen äußeren Haarzellen der Cochlea sind für die Verstärkung niedriger Frequenzen verantwortlich. Ihre Funktion wurde durch die auditorischen Messungen am Hirnstamm durch Dr. Hannes Maier evaluiert und durch die hier vorgestellten *Patch clamp* Messungen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass $KCNQ4$ den $I_{K,n}$ -Strom der äußeren Haarzellen vermittelt. Ein Fehlen von $I_{K,n}$ in äußeren Haarzellen von $KCNQ4^{-/-}$, $KCNQ4-DN^{+/-}$ und $KCNQ4-DN^{+/+}$ -Mäusen führte zu einer Erhöhung des Ruhemembranpotentials und damit zu einer permanenten Depolarisation der Zellen. In basalen äußeren Haarzellen ist $I_{K,n}$ größer als in apikalen Zellen (Mammano und Ashmore, 1996), in denen die $KCNQ4$ -Expression schwächer ist (Kharkovets *et al.*, 2000). Allerdings detektierten Beisel *et al.* (2000) einen umgekehrten longitudinalen Expressionsgradienten für $KCNQ4$ mit einer schwächeren Expression in basalen äußeren Haarzellen. Da $I_{K,n}$ in basalen äußeren Haarzellen größer ist als in apikalen Zellen (Mammano und Ashmore, 1996), wird das Ruhemembranpotential dieser Zellen bei einem Ausfall von $I_{K,n}$ vermutlich noch depolarisierter sein als in apikalen äußeren Haarzellen. Die permanente Depolarisation wird durch den Verlust von $I_{K,n}$, der in Nähe des Ruhemembranpotentials K^+ -Ionen aus der Zelle transportiert, verursacht. Diese Depolarisation der Zellen könnte einen Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle verursachen und langsam zum Untergang der

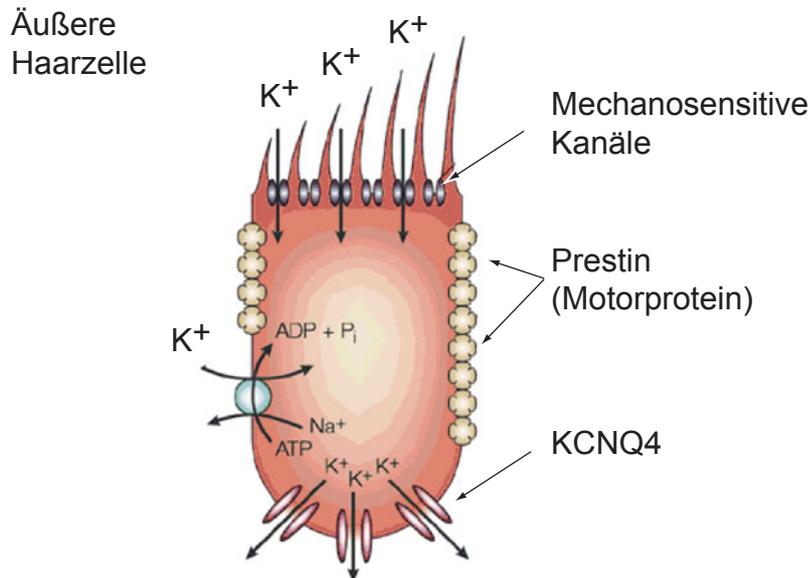


Abb. 4.3: Schema einer äußeren Haarzelle. Kalium tritt durch apikale mechanosensitive Kanäle, die durch die Deflektion der Stereozilien geöffnet werden, in die Zelle ein (Pickles *et al.*, 1992). In dem dargestellten Modell wird K^+ durch KCNQ4-Kanäle, die ausschließlich in der basolateralen Membran zu finden sind (Kharkovets *et al.*, 2000), aus der Zelle transportiert. Das laterale Motorprotein Prestin (Zheng *et al.*, 2000) vermittelt die elektromechanische Verstärkung der akustischen Schwingungen durch äußere Haarzellen. Nach Jentsch, 2000.

basalen äußeren Haarzellen führen. Der Verlust von KCNQ4 verhindert also den Abtransport von K^+ -Ionen aus den äußeren Haarzellen, die durch mechanosensitive Kanäle in die Zelle gelangt sind (Abb. 4.3). Bei starken Depolarisationen wird ein Teil des Kaliums vermutlich durch den auswärtsgerichteten Kaliumstrom $I_{K,n}$ aus der Zelle geschleust, doch ist die Amplitude dieses Stroms erheblich geringer als die Amplitude von $I_{K,n}$ (s. Abb. 3.22). Das durch $I_{K,n}$ aus den äußeren Haarzellen transportierte Kalium wird vermutlich durch den Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC4 in die Deiterszellen aufgenommen (Boettger *et al.*, 2002), die die äußeren Haarzellen umgeben und stützen. Im K^+ -Recyclingmodell des Innenohres (Steel und Kros, 2001; Jentsch, 2000; Kikuchi *et al.*, 1995; Spicer und Schulte, 1998; Weber *et al.*, 2001; Wangemann, 2002) diffundiert K^+ von dort durch ein System von *Gap junctions* zu den angrenzenden epithelialen Zellen, durch die Fibrozyten und Intermediärzellen der *Stria vascularis*, bis es von diesen Zellen in das Interstitium sekretiert wird. K^+ wird dann von den Marginalzellen der *Stria vascularis* aufgenommen und durch KCNQ1/KCNE1-Heteromere in die *Scala media* sezerniert (s. Abb. 1.3). Ein Teil des K^+ wird vermutlich auch durch die *Scala tympani* und die Reißnersche Membran in die *Stria vascularis* transportiert (Wangemann, 2002). Mutationen in den *Gap junction* Proteinen führen vermutlich zu einer Unterbrechung des K^+ -Recyclingweges und damit zur Verringerung des endocochlearen Potentials. So können Mutationen in *GJB2*,

GJB3 und *GJB6* Taubheit verursachen (Kelsell *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1998; Grifa *et al.*, 1999; Lopez-Bigas *et al.*, 2001), wobei Mutationen in *GJB3* für einen zweiten Typ von DFNA2 verantwortlich sind (s. 4.3).

Der Hörverlust, der in DFNA2-Patienten und in den Mausmodellen für DFNA2 festgestellt wurde, ist mit 50–70 dB so groß, dass er nicht allein durch die Degeneration äußerer Haarzellen erklärt werden kann. Wie bereits beschrieben, liefern äußere Haarzellen nur eine Amplifikation der Schall-induzierten Vibrationen und leiten keine afferenten sensorischen Informationen an das Gehirn weiter. Entsprechend führt ein Verlust äußerer Haarzellen oder ein Verlust deren Funktion zu Hörschwellen, die maximal um 40–50 dB erhöht sind (Ryan und Dallos, 1975). Die Deletion von *Prestin* verursachte in Mäusen einen Verlust der Elektromotilität der äußeren Haarzellen und eine Erhöhung der Hörschwellen um ca. 45–65 dB (Liberman *et al.*, 2002). Im Frequenzbereich um 5 kHz, der mit dem Frequenzbereich der von Dr. Hannes Maier durchgeführten ABR-Messungen vergleichbar ist, waren die Hörschwellen von *Prestin*^{-/-}-Mäusen um ca. 45 dB erhöht. Wäre die progrediente Taubheit nur auf einen Verlust der Funktion von äußeren Haarzellen zurückzuführen, sollte der Hörverlust nicht größer als 45–50 dB sein. Möglicherweise trägt also eine weitere Komponente, neben dem Verlust von $I_{K,n}$ und der damit einhergehenden permanenten Depolarisation äußerer Haarzellen, zur Pathophysiologie von DFNA2 bei. So könnte DFNA2 auch durch eine defekte afferente Signaltransmission verursacht werden: Entweder durch Defekte im zentralen auditorischen Verarbeitungsweg, dessen Neuronen *KCNQ4* exprimieren (Kharkovets *et al.*, 2000), oder durch funktionelle Defekte in den inneren Haarzellen. Die hier vorgestellten *Patch clamp* Messungen zeigen erstmals eine Beteiligung von *KCNQ4* am Ruhestrom von inneren Haarzellen. Die leichte Depolarisation in *KCNQ4*-defizienten inneren Haarzellen könnte die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöhen und zu einer erhöhten präsynaptischen Aktivität führen. Raybould *et al.* (2001) zeigten, dass die Eigenschaften innerer Haarzellen des Meerschweinchens über die gesamte Cochlea konstant bleiben. Ca. 40 % der basolateralen K^+ -Leitfähigkeiten innerer Haarzellen werden durch Ca^{2+} moduliert (Raybould *et al.*, 2001), so dass der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch permanente Depolarisation zu veränderten Rezeptorpotentialen und einer veränderten Reizweiterleitung an das Gehirn führen könnte. Ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in inneren Haarzellen könnte auch eine Degeneration der Zellen verursachen. Dagegen spricht allerdings, dass die inneren Haarzellen der *KCNQ4*-defizienten Mäuse nicht mit zunehmendem Alter untergehen, sondern bis zu einem Alter von acht Monaten nachweisbar sind (Kharkovets, *persönliche Mitteilung*). Zusätzlich waren die Leitfähigkeiten innerer Haarzellen von *KCNQ4*-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Tieren nur geringfügig verändert. Allerdings könnte allein die Fehlfunktion innerer Haarzellen zu einer Erhöhung der Hörschwellen in *KCNQ4*-defizienten Tieren führen. Beisel *et al.* (2000) zeigten in *in situ* Hybridisierungen, dass die *KCNQ4*-Expression in inneren Haarzellen einem longitudinalen Gradienten folgt, wobei apikal (tiefe Frequenzen) die schwächste Expression und basal (hohe Frequenzen) die stärkste Expression detektiert wurde. Da DFNA2 bei hohen Frequenzen beginnt (Marres *et al.*, 1997), könnten innere Haarzellen zum Pathomechanismus dieser Erkrankung beitragen.

Möglicherweise ist jedoch ein Defekt von zentralen auditorischen Neuronen am Krankheitsbild von DFNA2 beteiligt. Allerdings wurden in den untersuchten *KCNQ4*-defizienten Mäusen und den transgenen Tieren mit einer dominant-negativen *KCNQ4*-Mutation keine morphologischen Veränderungen im Hirnstamm, wo die auditorischen Nuclei lokalisiert sind, festgestellt (Kharkovets, *persönliche Mitteilung*). Auch ergab sich aus den ABR-Messungen von Dr. Hannes Maier bisher kein Hinweis auf eine zentrale Komponente der Erkrankung. Weitere Untersuchungen, vor allem im Hirnstamm *KCNQ4*-defizienter Tiere, werden notwendig sein, um den Pathomechanismus von DFNA2 vollständig aufzuklären.

4.3.4 Ausblick

Die Analyse der *KCNQ4*-defizienten Mausmodelle für DFNA2 ist noch nicht abgeschlossen. Obwohl *KCNQ4* in vestibulären Haarzellen des Typs I exprimiert wird (Kharkovets *et al.*, 2000), führt der Verlust funktioneller *KCNQ4*-Kanäle weder im Menschen (Kubisch *et al.*, 1999) noch in Mäusen zu Störungen vestibulärer Funktionen. Es wurde spekuliert, dass *KCNQ4* mit dem $g_{K,L}$ in den Typ I Haarzellen identisch ist (Kharkovets *et al.*, 2000). Dieser auswärtsgerichtete Kaliumstrom aktiviert bei sehr negativen Potentialen (-88 bis -62 mV) und ist ausschließlich in Typ I Haarzellen nachweisbar (Rüsch und Eatock, 1996; Rüsch *et al.*, 1998). Sein zeitliches Expressionsmuster korreliert gut mit der Expression von *KCNQ4* in diesen Zellen (Rüsch *et al.*, 1998; Kharkovets *et al.*, 2000). Die *KCNQ4*-defizienten Tiere bieten ein gutes Modell, um zu untersuchen, ob *KCNQ4* das molekulare Korrelat des $g_{K,L}$ -Stroms darstellt. Dazu wäre es notwendig, die Ganzzelleleitfähigkeiten der Typ I Haarzellen zu ermitteln und innerhalb der verschiedenen Genotypen zu vergleichen.

Die Frage nach der Beteiligung einer zentralen Komponente am Pathomechanismus von DFNA2 könnte durch die Herstellung eines konditionellen *KCNQ4-Knockouts* untersucht werden. Dazu wäre es notwendig, *KCNQ4* gezielt im Gehirn auszuschalten, während die Expression im Innenohr unbeeinflusst bleibt. Auf diese Weise könnten die Innenohrdefekte von Defekten in zentralen auditorischen Neuronen in der Hörbahn separiert werden.

DFNA2 ist eine progrediente Ertaubung, die möglicherweise Ähnlichkeiten zur zunehmenden Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis) aufweist. Da DFNA2 zumindest teilweise auf den Verlust einer Kaliumleitfähigkeit in den äußeren Haarzellen zurückzuführen ist, könnten Substanzen, die die Kaliumleitfähigkeit dieser Zellen erhöhen, einen therapeutischen Effekt ausüben. So könnte der Kaliumkanalöffner Retigabin die Amplitude von $I_{K,n}$ in den äußeren Haarzellen erhöhen und den Beginn der Ertaubung möglicherweise hinauszögern oder ein Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen. Die *KCNQ4*-defizienten Mäuse bieten ein gutes Modell, um *KCNQ*-Kanalöffner auf ihre Eignung als Therapeutikum bei progredienter Taubheit zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von KCNQ-Kaliumkanälen und ihren β -Untereinheiten. KCNQ-Kanäle bilden eine Familie von spannungsabhängigen Kalium-Kanaluntereinheiten, die fünf Mitglieder, KCNQ1 (KvLQT1) bis KCNQ5, umfasst. KCNQ-Kanäle weisen sechs Transmembranregionen (S1-S6) sowie eine ionenleitende Pore zwischen S5 und S6 auf. Das vierte Transmembransegment (S4) repräsentiert vermutlich den Spannungssensor des Kaliumkanals. KCNQ-Kanäle bilden funktionelle homomere Kanäle *in vitro*. KCNQ1 kann mit verschiedenen β -Untereinheiten der KCNE-Familie, die fünf Mitglieder (KCNE1-KCNE5) umfasst, zu heteromeren Kanälen assoziieren. Durch die Assoziation mit den β -Untereinheiten wird das Schaltverhalten von KCNQ1 dramatisch verändert.

In dieser Arbeit wurde die Expression von KCNQ1 und seinen β -Untereinheiten im gastrointestinalen Trakt untersucht. KCNQ1 wird stark im Magen, im Dünndarm und im Kolon exprimiert, während KCNE3 vor allem im Kolon und etwas geringer im Dünndarm vorkommt. Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten zeigten erstmals, dass KCNQ1 mit KCNE3 in den basolateralen Membranen der Kryptzellen von Kolon und Dünndarm kolokalisiert ist. Zusammen mit den elektrophysiologischen Eigenschaften von KCNQ1/KCNE3-Heteromeren (Schroeder *et al.*, 2000b) lässt die Lokalisation vermuten, dass diese Kanäle die basolaterale Kaliumleitfähigkeit bilden, die für die transepitheliale cAMP-stimulierte Chloridsekretion im Darm verantwortlich ist. Durch Immunfluoreszenzfärbungen an Magenschnitten der Maus wurde gezeigt, dass KCNQ1 mit der H^+/K^+ -ATPase in der luminalen Membran der Magensäure-sezernierenden Parietalzellen kolokalisiert ist. Mit einem Northern Blot wurde die β -Untereinheit KCNE2, im Gegensatz zu KCNE1 und KCNE3, im Magen detektiert. Ähnlich wie KCNQ1, lokalisierte KCNE2 in den Magendrüsen nur in einer bestimmten Gruppe von Zellen, die vermutlich Parietalzellen darstellen. Die Koexpression von KCNQ1 und KCNE2 in HEK293-Zellen ergab Kanäle, die beim Ruhepotential der Zellen geöffnet waren und eine zeitunabhängige Aktivierung aufwiesen. Die heteromeren Kanäle könnten die apikale Kaliumleitfähigkeit in den Parietalzellen vermitteln, die während der Säuresekretion durch die H^+/K^+ -ATPase für das Recycling von K^+ -Ionen notwendig ist.

KCNQ2 und KCNQ3 können zu heteromeren Kanälen assoziieren, die Eigenschaften des neuronalen M-Stroms aufweisen (Wang *et al.*, 1998a). Mutationen in *KCNQ2* oder *KCNQ3* führen zu gutartigen, vererbaren Krämpfen bei Neugeborenen (BFNC), einer autosomal dominant vererbten, idiopathischen Epilepsie (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Syndrom beschrieben, bei dem BFNC

von später auftretender Myokymie gefolgt wird, einer Muskelerkrankung, die durch spontane, unwillkürliche Kontraktionen von Muskelfasergruppen charakterisiert ist. Alle von BFNC und Myokymie betroffenen Patienten trugen eine Mutation (R207W), die eine geladene Aminosäure im S4-Spannungssensor des KCNQ2-Proteins neutralisierte. Diese Punktmutation wurde *in vitro* in die KCNQ2-cDNA eingebaut und der Strom des mutierten Kanals sowohl allein als auch in Koexpression mit KCNQ3 in *Xenopus laevis* Oozyten elektrophysiologisch charakterisiert. Die Aminosäuresubstitution führte zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von KCNQ2 und zu einer dramatischen Verlangsamung der Aktivierung bei Depolarisation. Da die Myokymie eventuell peripheren Ursprungs ist, wurde die KCNQ2- und KCNQ3-Expression im Rückenmark untersucht. Durch *in situ* Hybridierungen wurde erstmals gezeigt, dass KCNQ2 und KCNQ3 im anterioren Horn des Rückenmarks exprimiert werden, wo sich die unteren Motoneurone befinden. Die dramatisch verlangsamte Aktivierung von KCNQ2 durch die R207W-Mutation führt zu einem Verlust des Kaliumstroms, dessen Größe stark vom Muster und zeitlichen Verlauf der Depolarisation abhängt. Bei kurzen Depolarisationen, wie sie bei einzelnen Aktionspotentialen oder einer kurzen Folge von Aktionspotentialen vorkommen, ist der Verlust des Stroms größer als in allen bisher untersuchten BFNC-Mutationen (Schroeder *et al.*, 1998). Anders als diese Mutationen hat die R207W-Mutation in KCNQ2 einen dominant-negativen Effekt bei kurzen Depolarisationen. In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Unterschiede im Aktionspotentialmuster zwischen Motoneuronen und zentralen Neuronen, kombiniert mit der dramatisch verlangsamten Aktivierung der R207W-Mutante, erklären können, warum diese Mutation nicht nur BFNC verursacht, sondern auch zu Myokymie führt.

Mutationen im *KCNQ4*-Gen verursachen die autosomal dominant vererbte, nicht-syndromische, progrediente Taubheit DFNA2 (Kubisch *et al.*, 1999). Um den Pathomechanismus der Ertaubung aufzuklären, wurden von Tatjana Kharkovets verschiedene Mausmodelle für DFNA2 generiert. Dabei handelt es sich erstens um eine *KCNQ4*-defiziente Maus (*KCNQ4*^{-/-}), bei der die Exone 6-8 von *KCNQ4* deletiert wurden. Zweitens wurde eine transgene Maus mit einer dominant-negativen Mutation (G285S) in der Pore des *KCNQ4*-Proteins hergestellt, um ein Mausmodell zu generieren, das direkt einer menschlichen Mutation entspricht (*KCNQ4-DN*^{+/-}, *KCNQ4-DN*^{+/+}). In Messungen am auditorischen Hirnstamm, die Dr. Hannes Maier an anästhesierten Mäusen durchführte, wurde ein signifikanter Hörverlust bei homozygoten *KCNQ4*-defizienten und transgenen Tieren ab einem Alter von ca. vier Wochen festgestellt. Da *KCNQ4* in den äußeren und möglicherweise den inneren Haarzellen des Cortischen Organs exprimiert wird (Kharkovets *et al.*, 2000; Beisel *et al.*, 2000), wurden *Patch clamp* Messungen an der semi-intakten Cochlea durchgeführt, um die Kaliumleitfähigkeiten sowie die Ruhepotentiale der Zellen zwischen den verschiedenen Mausmodellen zu vergleichen. *KCNQ4* vermittelt in äußeren Haarzellen von *KCNQ4*^{+/+}-Mäusen einen Strom, der bei ca. -82 mV halbmaximal aktiviert und XE991-sensitiv ist. Der Strom trägt alle Charakteristika des I_{K,n}-Stroms äußerer Haarzellen (Housley und Ashmore, 1992; Marcotti und Kros, 1999). Da dieser Strom in *KCNQ4*^{-/-}, *KCNQ4-DN*^{+/-}- und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tieren nicht nachweisbar war, konnte erstmals gezeigt werden, dass *KCNQ4* in den äußeren Haarzellen das molekulare Korrelat von

$I_{K,n}$ darstellt. In KCNQ4-defizienten Tieren war das Ruhemembranpotential äußerer und innerer Haarzellen signifikant depolarisiert. Das Fehlen von $I_{K,n}$ in äußeren Haarzellen führte zu einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials um 10-17 mV. Innere Haarzellen KCNQ4-defizienter Tiere waren ca. 6-8 mV depolarisierter als WT-Zellen. Damit wurde erstmals die Beteiligung von KCNQ4 am Ruhestrom innerer Haarzellen gezeigt. Die Kaliumleitfähigkeiten der inneren Haarzellen KCNQ4-defizienter Tiere waren nur geringfügig verändert. Innere Haarzellen von *KCNQ4*^{-/-}- und *KCNQ4-DN*^{+/+}-Tieren wiesen allerdings bei Hyperpolarisation geringere Einwärtsströme auf als innere Haarzellen von WT-Mäusen. Die permanente Depolarisation durch den Anstieg des Ruhemembranpotentials könnte zumindest in äußeren Haarzellen zu einem erhöhten Ca²⁺-Einstrom in die Zelle und dadurch zur langsamen Degeneration äußerer Haarzellen führen, wie sie sowohl in den Mausmodellen für DFNA2 als auch bei DFNA2-Patienten beobachtet wurde. Der Hörverlust, der in DFNA2-Patienten und in den Mausmodellen für DFNA2 festgestellt wurde, ist mit 50-70 dB so groß, dass er nicht allein durch die Degeneration äußerer Haarzellen erklärt werden kann. Weitere Untersuchungen werden daher notwendig sein, um den Pathomechanismus von DFNA2 aufzuklären.

6 Kollaborationen

Folgende Kollaborationen haben diese Arbeit entweder ermöglicht oder wichtige Informationen für die Analyse geliefert:

- Privatdozent Dr. Siegfried Waldegger hat die histologischen Daten zur Lokalisation von *KCNQ1* und *KCNE3* im Dick- und Dünndarm erhoben.
- Radioaktive *in situ* Hybridisierungen wurden zusammen mit Privatdozentin Dr. Irm Hermans-Borgmeyer durchgeführt. Dr. Susanne Fehr hat die *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin erstellt.
- Privatdozentin Dr. Ortrud K. Steinlein wurde auf die Familie mit der *KCNQ2*-Mutation aufmerksam. Die genetische Analyse der Patienten und Patientinnen fand in ihrem Labor statt. Colette Kananura war an diesen Arbeiten beteiligt.
- Die klinischen Untersuchungen der Patienten und Patientinnen mit der *KCNQ2*-Mutation wurden von Prof. Dr. Bernhard Kunath an der Universitätsklinik Dresden betreut. Dr. Ulrike Reuner war an der Erstellung der Elektromyogramme beteiligt.
- Die *KCNQ4*-defizienten Mäuse sowie die transgenen Mäuse mit einer dominant-negativen Mutation im *KCNQ4*-Gen wurden von Tatjana Kharkovets erzeugt, die sich auch um die Verpaarung der Tiere gekümmert hat.
- Dr. Hannes Maier hat die ABR-Messungen an den Mäusen durchgeführt und ausgewertet.

7 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden mit Einverständnis der Betreuer veröffentlicht:

1. Dedek, K. und Waldegger, S. (2001) Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflügers Arch*, 442(6):896-902.
2. 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(21):12272-12277.



Literaturverzeichnis

- Abbott, G. W., Butler, M. H., Bendahhou, S., Dalakas, M. C., Ptacek, L. J., und Goldstein, S. A. (2001). MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell*, 104(2): 217–231.
- Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., und Goldstein, S. A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, 97(2): 175–187.
- Akita, J., Abe, S., Shinkawa, H., Kimberling, W. J., und Usami, S. (2001). Clinical and genetic features of nonsyndromic autosomal dominant sensorineural hearing loss: KCNQ4 is a gene responsible in Japanese. *J Hum Genet*, 46: 355–361.
- Alaburda, A., Perrier, J. F., und Hounsgaard, J. (2002). An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol*, 540(Pt 3): 875–881.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Watson, J. D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim, 3. Edition.
- Angelo, K., Jespersen, T., Grunnet, M., Nielsen, M. S., Klaerke, D. A., und Olesen, S. P. (2002). KCNE5 Induces Time- and Voltage-Dependent Modulation of the KCNQ1 Current. *Biophys J*, 83(4): 1997–2006.
- Armstrong, C. M. und Bezanilla, F. (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*, 242(5398): 459–461.
- Ashcroft, F. M. (2000). *Ion Channels and Disease*. Academic Press, London.
- Ashmore, J. F. (1987). A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol*, 388: 323–347.
- Auger, R. G., Daube, J. R., Gomez, M. R., und Lambert, E. H. (1984). Hereditary form of sustained muscle activity of peripheral nerve origin causing generalized myokymia and muscle stiffness. *Ann Neurol*, 15(1): 13–21.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., und Smith, J. (1991). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.
- Bargmann, C. I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*, 282(5396): 2028–2033.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., und Romey, G. (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*, 384(6604): 78–80.
- Beisel, K. W., Nelson, N. C., Delimont, D. C., und Fritsch, B. (2000). Longitudinal gradients of KCNQ4 expression in spiral ganglion and cochlear hair cells correlate with progressive hearing loss in DFNA2. *Brain Res Mol Brain Res*, 82(1-2): 137–149.
- Belyantseva, I. A., Adler, H. J., Curi, R., Frolenkov, G. I., und Kachar, B. (2000). Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *J Neurosci*, 20(24): RC116.
- Beutner, D. und Moser, T. (2001). The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells

- during development of hearing. *J Neurosci*, 21(13): 4593-9.
- Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev*, 80(2): 555-592.
- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J., and Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, 279(5349): 403-406.
- Biervert, C. und Steinlein, O. K. (1999). Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Hum Genet*, 104(3): 234-240.
- Boettger, T., Hubner, C. A., Maier, H., Rust, M. B., Beck, F. X., und Jentsch, T. J. (2002). Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co- transporter Kcc4. *Nature*, 416(6883): 874-878.
- Brown, D. A. und Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283(5748): 673-676.
- Browne, D. L., Gancher, S. T., Nutt, J. G., Brunt, E. R., Smith, E. A., Kramer, P., und Litt, M. (1994). Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet*, 8(2): 136-140.
- Brownell, W. E., Bader, C. R., Bertrand, D., und de Ribaupierre, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science*, 227(4683): 194-196.
- Bruggemann, A., Pardo, L. A., Stühmer, W., und Pongs, O. (1993). Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature*, 365(6445): 445-448.
- Brunt, E. R. und van Weerden, T. W. (1990). Familial paroxysmal kinesigenic ataxia and continuous myokymia. *Brain*, 113(Pt 5): 1361-1382.
- Casimiro, M. C., Knollmann, B. C., Ebert, S. N., Vary, J. C., J., Greene, A. E., Franz, M. R., Grinberg, A., Huang, S. P., und Pfeifer, K. (2001). Targeted disruption of the Kcnq1 gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5): 2526-2531.
- Castaldo, P., del Giudice, E. M., Coppola, G., Pascotto, A., Annunziato, L., und Tagliatela, M. (2002). Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *J Neurosci*, 22(2): RC199.
- Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R., und Bezanilla, F. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature*, 402(6763): 809-813.
- 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(1): 53-55.
- 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(17): 5472-5479.
- Christie, M. J., North, R. A., Osborne, P. B., Douglass, J., und Adelman, J. P. (1990). Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron*, 4(3): 405-411.
- Cooper, E. C., Aldape, K. D., Abosch, A., Barbaro, N. M., Berger, M. S., Peacock, W. S., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (2000). Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9): 4914-4919.
- Cooper, E. C., Harrington, E., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (2001). M channel KCNQ2 subunits are

-
- localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J Neurosci*, 21(24): 9529-9540.
- Costa, A. M. und Brown, B. S. (1997). Inhibition of M-current in cultured rat superior cervical ganglia by linopirdine: mechanism of action studies. *Neuropharmacology*, 36(11-12): 1747-53.
- Coucke, P., Van Camp, G., Djoyodiharjo, B., Smith, S. D., Frants, R. R., Padberg, G. W., Darby, J. K., Huizing, E. H., Cremers, C. W., Kimberling, W. J., und et al. (1994). Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families. *N Engl J Med*, 331(7): 425-431.
- Coucke, P. J., Van Hauwe, P., Kelley, P. M., Kunst, H., Schatteman, I., Van Velzen, D., Meyers, J., Ensink, R. J., Verstreken, M., Declau, F., Marres, H., Kastury, K., Bhasin, S., McGuirt, W. T., Smith, R. J., Cremers, C. W., Van de Heyning, P., Willems, P. J., Smith, S. D., und Van Camp, G. (1999). Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Mol Genet*, 8(7): 1321-1328.
- Covarrubias, M., Wei, A. A., und Salkoff, L. (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron*, 7(5): 763-773.
- Cui, J., Kagan, A., Qin, D., Mathew, J., Melman, Y. F., und McDonald, T. V. (2001). Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *J Biol Chem*, 276(20): 17244-17251.
- Curtis, B. M. und Catterall, W. A. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, 23(10): 2113-2118.
- Dailey, J. W., Cheong, J. H., Ko, K. H., Adams-Curtis, L. E., und Jobe, P. C. (1995). Anticonvulsant properties of D-20443 in genetically epilepsy-prone rats: prediction of clinical response. *Neurosci Lett*, 195(2): 77-80.
- Dallos, P. und Corey, M. E. (1991). The role of outer hair cell motility in cochlear tuning. *Curr Opin Neurobiol*, 1(2): 215-220.
- Dallos, P., Santos-Sacchi, J., und Flock, A. (1982). Intracellular recordings from cochlear outer hair cells. *Science*, 218(4572): 582-584.
- del Giudice, E. M., Coppola, G., Scuccimarra, G., Cirillo, G., Bellini, G., und Pascotto, A. (2000). Benign familial neonatal convulsions (BFNC) resulting from mutation of the KCNQ2 voltage sensor. *Eur J Hum Genet*, 8(12): 994-997.
- Demolombe, S., Baro, I., Pereon, Y., Bliok, J., Mohammad-Panah, R., Pollard, H., Morid, S., Mannens, M., Wilde, A., Barhanin, J., Charpentier, F., und Escande, D. (1998). A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J Biol Chem*, 273(12): 6837-6843.
- Demolombe, S., Franco, D., de Boer, P., Koperschmidt, S., Roden, D., Pereon, Y., Jarry, A., Moorman, A. F., und Escande, D. (2001). Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(2): C359-372.
- Denhardt, D. T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 23(5): 641-646.
- Denoyelle, F., Lina-Granade, G., Plauchu, H., Bruzzone, R., Chaib, H., Levi-Acobas, F., Weil, D., und Petit, C. (1998). Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature*, 393(6683): 319-320.
- Devor, D. C., Singh, A. K., Gerlach, A. C., Frizzell, R. A., und Bridges, R. J. (1997). Inhibition of intestinal Cl⁻ secretion by clotrimazole: direct effect on basolateral membrane K⁺ channels. *Am J Physiol*, 273(2 Pt 1): C531-540.

- Diener, M., Hug, F., Strabel, D., und Scharer, E. (1996). Cyclic AMP-dependent regulation of K⁺ transport in the rat distal colon. *Br J Pharmacol*, 118(6): 1477-1487.
- Dodt, H. U. und Zieglansberger, W. (1990). Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC- videomicroscopy. *Brain Res*, 537(1-2): 333-336.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., 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(5360): 69-77.
- Ehret, G. (1985). Behavioural studies on auditory development in mammals in relation to higher nervous system functioning. *Acta Otolaryngol Suppl*, 421: 31-40.
- Eunson, L. H., Rea, R., Zuberi, S. M., Youroukos, S., Panayiotopoulos, C. P., Liguori, R., Avoni, P., McWilliam, R. C., Stephenson, J. B., Hanna, M. G., Kullmann, D. M., und Spauschus, A. (2000). Clinical, genetic, and expression studies of mutations in the potassium channel gene KCNA1 reveal new phenotypic variability. *Ann Neurol*, 48(4): 647-656.
- Gao, B. X. und Ziskind-Conhaim, L. (1998). Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol*, 80(6): 3047-3061.
- Geleoc, G. S., Lennan, G. W., Richardson, G. P., und Kros, C. J. (1997). A quantitative comparison of mechano-electrical transduction in vestibular and auditory hair cells of neonatal mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 264(1381): 611-621.
- Glauner, K. S., Mannuzzu, L. M., Gandhi, C. S., und Isacoff, E. Y. (1999). Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*, 402(6763): 813-817.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23(1): 175-182.
- Goldstein, J. A. und Lalwani, A. K. (2002). Further evidence for a third deafness gene within the DFNA2 locus. *Am J Med Genet*, 108(4): 304-309.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1): 59-74.
- 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(6): 1363-1371.
- Greger, R., Bleich, M., Riedemann, N., van Driesche, W., Ecke, D., und Warth, R. (1997). The role of K⁺ channels in colonic Cl⁻ secretion. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 118(2): 271-275.
- Grifa, A., Wagner, C. A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M. D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., und Gasparini, P. (1999). Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet*, 23(1): 16-8.
- Grunnet, M., Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Ljungstrom, T., Jorgensen, N. K., Olesen, S. P., und Klaerke, D. A. (2002). KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J Physiol*, 542(Pt 1): 119-130.
- Gulbis, J. M., Mann, S., und MacKinnon, R. (1999). Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell*, 97(7): 943-952.
- Hadley, J. K., Noda, M., Selyanko, A. A., Wood, I. C., Abogadie, F. C., und Brown, D. A. (2000). Differential tetraethylammonium sensitivity of KCNQ1-4 potassium channels. *Br J Pharmacol*, 129(3): 413-415.

-
- Hagen, S. J., Wu, H., und Morrison, S. W. (2000). NH₄Cl inhibition of acid secretion: possible involvement of an apical K⁺ channel in bullfrog oxyntic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(2): G400-410.
- Halliwel, J. V. und Adams, P. R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res*, 250(1): 71-92.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391(2): 85-100.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Hartmann, D., Fehr, S., Meyerhof, W., und Richter, D. (1995). Distribution of somatostatin receptor subtype 1 mRNA in the developing cerebral hemispheres of the rat. *Dev Neurosci*, 17(4): 246-255.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., und MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*, 66(4): 1061-1067.
- Helander, H. F. und Keeling, D. J. (1993). Cell biology of gastric acid secretion. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 7(1): 1-21.
- Herlitz, S. und Koenen, M. (1990). A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene*, 91(1): 143-147.
- Higuchi, R., Krummel, B., und Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 16(15): 7351-7367.
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2. Edition.
- Hille, B. und Schwarz, W. (1978). Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol*, 72(4): 409-442.
- Hirose, S., Zenri, F., Akiyoshi, H., Fukuma, G., Iwata, H., Inoue, T., Yonetani, M., Tsutsumi, M., Muranaka, H., Kurokawa, T., Hanai, T., Wada, K., Kaneko, S., und Mitsudome, A. (2000). A novel mutation of KCNQ3 (c.925T→C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. *Ann Neurol*, 47(6): 822-826.
- Hirsch, E., de Saint-Martin, A., und Marescaux, C. (1999). [Benign familial neonatal convulsions: a model of idiopathic epilepsy]. *Rev Neurol (Paris)*, 155(6-7): 463-467.
- Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V., und Herbert, S. C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*, 362(6415): 31-38.
- Hodgkin, A., Huxley, A., und Katz, B. (1949). Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol*, 3: 129-150.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., und Aldrich, R. W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, 7(4): 547-556.
- Housley, G. D. und Ashmore, J. F. (1992). Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol*, 448: 73-98.
- Isaacs, H. (1961). A syndrome of continuous muscle fiber activity. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 24: 319-325.
- Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (1990). Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 345(6275): 530-534.
- Isbrandt, D., Friederich, P., Solth, A., Haverkamp, W., Ebner, A., Borggreffe, M., Funke, H., Sauter, K., Breithardt, G., Pongs, O., und

-
- Schulze-Bahr, E. (2002). Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med*, 80(8): 524-532.
- Jagger, D. J. und Ashmore, J. F. (1999). Regulation of ionic currents by protein kinase A and intracellular calcium in outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *Pflugers Arch*, 437(3): 409-16.
- Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, 1(1): 21-30.
- Kamb, A., Iverson, L. E., und Tanouye, M. A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell*, 50(3): 405-413.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., und Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628): 80-83.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., und Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376(6542): 690-695.
- Kharkovets, T., Hardelin, J. P., Safieddine, S., Schweizer, M., El-Amraoui, A., Petit, C., und Jentsch, T. J. (2000). KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8): 4333-4338.
- Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L., und Adams, J. C. (1995). Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)*, 191(2): 101-18.
- Kros, C. J. und Crawford, A. C. (1990). Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol*, 421: 263-291.
- Kros, C. J., Ruppersberg, J. P., und Rusch, A. (1998). Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature*, 394(6690): 281-284.
- 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(3): 437-446.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259): 680-685.
- Lamas, J. A., Selyanko, A. A., und Brown, D. A. (1997). Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (IK(M)) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci*, 9(3): 605-16.
- Lee, E. K., Maselli, R. A., Ellis, W. G., und Agius, M. A. (1998). Morvan's fibrillary chorea: a paraneoplastic manifestation of thymoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65(6): 857-862.
- Lee, M. P., Ravenel, J. D., Hu, R. J., Lustig, L. R., Tomaselli, G., Berger, R. D., Brandenburg, S. A., Litzi, T. J., Bunton, T. E., Limb, C., Francis, H., Gorelikow, M., Gu, H., Washington, K., Argani, P., Goldenring, J. R., Coffey, R. J., und Feinberg, A. P. (2000a). Targeted disruption of the Kvlqt1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest*, 106(12): 1447-1455.
- Lee, W. L., Biervert, C., Hallmann, K., Tay, A., Dean, J. C., und Steinlein, O. K. (2000b). A KCNQ2 splice site mutation causing benign neonatal convulsions in a Scottish family. *Neuropediatrics*, 31(1): 9-12.
- Lehmann-Horn, F. und Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*, 79(4): 1317-1372.
- Leppert, M., Anderson, V. E., Quattlebaum, T., Stauffer, D., O'Connell, P., Nakamura, Y.,

-
- Lalouel, J. M., und White, R. (1989). Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature*, 337(6208): 647-648.
- Lerche, C., Scherer, C. R., Seebohm, G., Derst, C., Wei, A. D., Busch, A. E., und Steinmeyer, K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem*, 275(29): 22395-22400.
- Lerche, H., Biervert, C., Alekov, A. K., Schleithoff, L., Lindner, M., Klinger, W., Bretschneider, F., Mitrovic, N., Jurkat-Rott, K., Bode, H., Lehmann-Horn, F., und Steinlein, O. K. (1999). A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol*, 46(3): 305-312.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., und Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo J*, 15(5): 1004-1011.
- Lewis, T. B., Leach, R. J., Ward, K., O'Connell, P., und Ryan, S. G. (1993). Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. *Am J Hum Genet*, 53(3): 670-675.
- Li, M., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*, 257(5074): 1225-1230.
- Liberman, M. C., Gao, J., He, D. Z., Wu, X., Jia, S., und Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, 419(6904): 300-4.
- Lin, X., Hume, R. I., und Nuttall, A. L. (1995). Dihydropyridines and verapamil inhibit voltage-dependent K⁺ current in isolated outer hair cells of the guinea pig. *Hear Res*, 88(1-2): 36-46.
- Liu, X. Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K. P., und Brown, S. D. (1997). Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet*, 17(3): 268-269.
- Liu, Y., Jurman, M. E., und Yellen, G. (1996). Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron*, 16(4): 859-867.
- Lock, H. und Valverde, M. A. (2000). Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *J Biol Chem*, 275(45): 34849-34852.
- Lopez-Bigas, N., Olive, M., Rabionet, R., Ben-David, O., Martinez-Matos, J. A., Bravo, O., Banchs, I., Volpini, V., Gasparini, P., Avraham, K. B., Ferrer, I., Arbones, M. L., und Estivill, X. (2001). Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet*, 10(9): 947-52.
- Lorenz, C., Pusch, M., und Jentsch, T. J. (1996). Heteromultimeric Cl⁻ Channels With Novel Properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 13362-13366.
- Ludwig, J., Oliver, D., Frank, G., Klocker, N., Gummer, A. W., und Fakler, B. (2001). Reciprocal electromechanical properties of rat prestin: the motor molecule from rat outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7): 4178-4183.
- MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., und Chait, B. T. (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, 280(5360): 106-109.
- MacVinish, L. J., Hickman, M. E., Mufti, D. A., Durrington, H. J., und Cuthbert, A. W. (1998). Importance of basolateral K⁺ conductance in maintaining Cl⁻ secretion in murine nasal and colonic epithelia. *J Physiol (Lond)*, 510(6): 237-247.

-
- Main, M. J., Cryan, J. E., Dupere, J. R., Cox, B., Clare, J. J., und Burbidge, S. A. (2000). Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol Pharmacol*, 58(2): 253-262.
- Majumder, K., De Biasi, M., Wang, Z., und Wible, B. A. (1994). Molecular cloning and functional expression of a novel potassium channel beta-subunit from human atrium. *FEBS Lett*, 361(1): 13-16.
- Mall, M., Bleich, M., Schuerlein, M., J., K., 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(6): G1274-1281.
- Mall, M., Wissner, A., Schreiber, R., Kuehr, J., Seydewitz, H. H., Brandis, M., Greger, R., und Kunzelmann, K. (2000). Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl⁻ secretion in human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23(3): 283-289.
- Mammano, F. und Ashmore, J. F. (1996). Differential expression of outer hair cell potassium currents in the isolated cochlea of the guinea-pig. *J Physiol*, 496(Pt 3): 639-46.
- Mammano, F., Kros, C. J., und Ashmore, J. F. (1995). Patch clamped responses from outer hair cells in the intact adult organ of Corti. *Pflugers Arch*, 430(5): 745-50.
- Marcotti, W., Geleoc, G. S., Lennan, G. W., und Kros, C. J. (1999). Transient expression of an inwardly rectifying potassium conductance in developing inner and outer hair cells along the mouse cochlea. *Pflugers Arch*, 439(1-2): 113-122.
- Marcotti, W. und Kros, C. J. (1999). Developmental expression of the potassium current IK_n contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol*, 520(3): 653-660.
- Marres, H., van Ewijk, M., Huygen, P., Kunst, H., van Camp, G., Coucke, P., Willems, P., und Cremers, C. (1997). Inherited nonsyndromic hearing loss. An audiovestibular study in a large family with autosomal dominant progressive hearing loss related to DFNA2. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 123(6): 573-7.
- Marrion, N. V. (1997). Control of M-current. *Annu Rev Physiol*, 59: 483-504.
- Martin-Caraballo, M. und Greer, J. J. (2000). Development of potassium conductances in perinatal rat phrenic motoneurons. *J Neurophysiol*, 83(6): 3497-3508.
- McDonald, T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M. B., Wang, K. W., Goldstein, S. A., und Fishman, G. I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature*, 388(6639): 289-292.
- Melman, Y. F., Krumer, A., und McDonald, T. V. (2002). A single transmembrane site in the KCNE-encoded proteins controls the specificity of KvLQT1 channel gating. *J Biol Chem*, 277: 6.
- Mills, J. D. und Pitman, R. M. (1999). Contribution of potassium conductances to a time-dependent transition in electrical properties of a cockroach motoneuron soma. *J Neurophysiol*, 81(5): 2253-2266.
- Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., und MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*, 414(6859): 37-42.
- Murray, A., Donger, C., Fenske, C., Spillman, I., Richard, P., Dong, Y. B., Neyroud, N., Chevalier, P., Denjoy, I., Carter, N., Syrris, P., Afzal, A. R., Patton, M. A., Guicheney, P., und Jeffery, S. (1999). Splicing mutations in KCNQ1: a mutation hot spot at codon 344 that produces in frame transcripts. *Circulation*, 100(10): 1077-1084.
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J. S., Loiselet, J., und Petit, C. (1999). An alpha-tectorin gene defect

-
- causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet*, 8(3): 409–412.
- Nenov, A. P., Norris, C., und Bobbin, R. P. (1997). Outwardly rectifying currents in guinea pig outer hair cells. *Hear Res*, 105(1-2): 146–58.
- Newsom-Davis, J. und Mills, K. R. (1993). Immunological associations of acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). Report of five cases and literature review. *Brain*, 116(Pt 2): 453–469.
- 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(2): 186–189.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., und et al. (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312(5990): 121–127.
- Noebels, J. L. (1996). Targeting epilepsy genes. *Neuron*, 16(2): 241–244.
- Pan, Z., Selyanko, A. A., Hadley, J. K., Brown, D. A., Dixon, J. E., und McKinnon, D. (2001). Alternative splicing of KCNQ2 potassium channel transcripts contributes to the functional diversity of M-currents. *J Physiol*, 531(Pt 2): 347–358.
- Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*, 237(4816): 749–753.
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., und Jan, L. Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*, 349(6307): 289–294.
- Parcej, D. N., Scott, V. E., und Dolly, J. O. (1992). Oligomeric properties of alpha-dendrotoxin-sensitive potassium ion channels purified from bovine brain. *Biochemistry*, 31(45): 11084–11088.
- Piccini, M., Vitelli, F., Seri, M., Galletta, L. J., Moran, O., Bulfone, A., Banfi, S., Poerber, B., und Renieri, A. (1999). KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs. *Genomics*, 60(3): 251–257.
- Pickles, J. O. und Corey, D. P. (1992). Mechano-electrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci*, 15(7): 254–9.
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Muller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S., und Ferrus, A. (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *Embo J*, 7(4): 1087–1096.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., und Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2): 229–233.
- Puck, T. T., Cieciora, S. J., und Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid from human and animal subjects. *J Exp Med*, 108: 945–948.
- Raybould, N. P., Jagger, D. J., und Housley, G. D. (2001). Positional analysis of guinea pig inner hair cell membrane conductances: implications for regulation of the membrane filter. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2(4): 362–76.
- 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(6478): 289–294.

-
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther*, 90(1): 1-19.
- Rogawski, M. A. (2000). KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci*, 23(9): 393-398.
- Ronen, G. M., Rosales, T. O., Connolly, M., Anderson, V. E., und Leppert, M. (1993). Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology*, 43(7): 1355-1360.
- Rostock, A., Tober, C., Rundfeldt, C., Bartsch, R., Engel, J., Polymeropoulos, E. E., Kutscher, B., Loscher, W., Honack, D., White, H. S., und Wolf, H. H. (1996). D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res*, 23(3): 211-223.
- Roudier, N., Bailly, P., Gane, P., Lucien, N., Gobin, R., Cartron, J. P., und Ripoche, P. (2002). Erythroid expression and oligomeric state of the AQP3 protein. *J Biol Chem*, 277(10): 7664-7669.
- Roux, B. und MacKinnon, R. (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*, 285(5424): 100-102.
- Rüsch, A. und Eatock, R. A. (1996). A delayed rectifier conductance in type I hair cells of the mouse utricle. *J Neurophysiol*, 76(2): 995-1004.
- Rüsch, A., Lysakowski, A., und Eatock, R. A. (1998). Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *J Neurosci*, 18(18): 7487-501.
- Rufo, P. A., Merlin, D., Riegler, M., Ferguson-Maltzman, M. H., Dickinson, B. L., Brugnara, C., Alper, S. L., und Lencer, W. I. (1997). The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits chloride secretion by human intestinal T84 cells via blockade of distinct basolateral K⁺ conductances. Demonstration of efficacy in intact rabbit colon and in an in vivo mouse model of cholera. *J Clin Invest*, 100(12): 3111-3120.
- Rundfeldt, C. (1997). The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells. *Eur J Pharmacol*, 336(2-3): 243-249.
- Rundfeldt, C. (1999). Characterization of the K⁺ channel opening effect of the anticonvulsant retigabine in PC12 cells. *Epilepsy Res*, 35(2): 99-107.
- Rundfeldt, C. und Netzer, R. (2000). Investigations into the mechanism of action of the new anticonvulsant retigabine. Interaction with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and with voltage gated ion channels. *Arzneimittelforschung*, 50(12): 1063-1070.
- Ruppersberg, J. P., Schroter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S., und Pongs, O. (1990). Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature*, 345(6275): 535-537.
- Ryan, A. und Dallos, P. (1975). Effect of the absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold. *Nature*, 253: 44-46.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-491.
- Sakagami, M., Fukazawa, K., Matsunaga, T., Fujita, H., Mori, N., Takumi, T., Ohkubo, H., und S., N. (1991). Cellular localization of rat Isk protein in the stria vascularis by immunohistochemical observation. *Hear Res*, 56(1-2): 168-172.
- Sambrook, J., Fritsch, E., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vo-

-
- lume Sambrook 1989. Cold Spring Harbor Press, 2. Edition.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(12): 5463-5467.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Spector, P. S., und Keating, M. T. (1996). Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(5): 2208-2212.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., und Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*, 81: 299-307.
- Santos-Sacchi, J. (1991). Reversible inhibition of voltage-dependent outer hair cell motility and capacitance. *J Neurosci*, 11(10): 3096-3110.
- Santos-Sacchi, J., Shen, W., Zheng, J., und Dallos, P. (2001). Effects of membrane potential and tension on prestin, the outer hair cell lateral membrane motor protein. *J Physiol*, 531(Pt 3): 661-666.
- Scarff, K. L., Judd, L. M., Toh, B. H., Gleeson, P. A., und Van Driel, I. R. (1999). Gastric H⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase beta subunit is required for normal function, development, and membrane structure of mouse parietal cells. *Gastroenterology*, 117(3): 605-18.
- Schmidt, R. F. und Thews, G. (1987). *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin, 23. Edition.
- 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(3): 332-340.
- Schoppa, N. E. und Sigworth, F. J. (1998). Activation of shaker potassium channels. I. Characterization of voltage-dependent transitions. *J Gen Physiol*, 111(2): 271-294.
- Schreiber, R., Pavenstadt, H., Greger, R., und Kunzelmann, K. (2000). Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett*, 475(3): 291-295.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., und Jentsch, T. J. (2000a). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem*, 275(31): 24089-24095.
- 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(6712): 687-690.
- Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., und Jentsch, T. J. (2000b). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature*, 403(6766): 196-199.
- Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Harline, M., Boivin, G. P., Stemmermann, G., Duffy, J. J., Doetschman, T., Miller, M. L., und Shull, G. E. (1998). Targeted disruption of the murine Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest*, 101(6): 1243-1253.
- Schwake, M., Friedrich, T., und Jentsch, T. J. (2001). An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl⁻-channel mutated in dent's disease. *J Biol Chem*, 276(15): 12049-12054.
- Schwake, M., Pusch, M., Kharkovets, T., und Jentsch, T. J. (2000). Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem*, 275(18): 13343-13348.
- 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(18): 7742-7756.
- Selyanko, A. A., Hadley, J. K., Wood, I. C., Abogadie, F. C., Jentsch, T. J., und Brown, D. A. (2000). Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M1 muscarinic acetylcholine receptors. *J Physiol*, 522 Pt 3: 349-355.
- Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., und Bezanilla, F. (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, 16(6): 1159-1167.
- Søgaard, R., Ljungstrom, T., Pedersen, K. A., Olesen, S. P., und Jensen, B. S. (2001). KCNQ4 channels expressed in mammalian cells: functional characteristics and pharmacology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(4): C859-866.
- Shapiro, M. S., Roche, J. P., Kaftan, E. J., Cruzblanca, H., Mackie, K., und Hille, B. (2000). Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels that underlie the neuronal M current. *J Neurosci*, 20(5): 1710-1721.
- Shen, N. V., Chen, X., Boyer, M. M., und Pfaffinger, P. J. (1993). Deletion analysis of K⁺ channel assembly. *Neuron*, 11(1): 67-76.
- Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S., Rhodes, K. J., Schechter, L. E., und Trimmer, J. S. (1996). Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*, 16(4): 843-852.
- Shillito, P., Molenaar, P. C., Vincent, A., Leys, K., Zheng, W., van den Berg, R. J., Plomp, J. J., van Kempen, G. T., Chauplannaz, G., Wintzen, A. R., und et al. (1995). Acquired neuro-myotonia: evidence for autoantibodies directed against K⁺ channels of peripheral nerves. *Ann Neurol*, 38(5): 714-722.
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E., und Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet*, 18(1): 25-29.
- Smith, P. L., Baukrowitz, T., und Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*, 379(6568): 833-836.
- Smith-Maxwell, C. J., Ledwell, J. L., und Aldrich, R. W. (1998). Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol*, 111(3): 421-439.
- Spassova, M. und Lu, Z. (1998). Coupled ion movement underlies rectification in an inward-rectifier K⁺ channel. *J Gen Physiol*, 112(2): 211-221.
- Spector, P. S., Curran, M. E., Keating, M. T., und Sanguinetti, M. C. (1996a). Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res*, 78(3): 499-503.
- Spector, P. S., Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T., und Sanguinetti, M. C. (1996b). Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen Physiol*, 107(5): 611-619.
- Spicer, S. S. und Schulte, B. A. (1998). Evidence for a medial K⁺ recycling pathway from inner hair cells. *Hear Res*, 118(1-2): 1-12.
- Spicer, Z., Miller, M. L., Andringa, A., Riddle, T. M., Duffy, J. J., Doetschman, T., und Shull, G. E. (2000). Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. *J Biol Chem*, 275(28): 21555-65.
- 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 suppress IKs function. *Nat Genet*, 17(3): 338-340.

-
- Spoendlin, H. (1969). Innervation patterns in the organ of corti of the cat. *Acta Otolaryngol*, 67(2): 239-54.
- Stansfeld, C. E., Roper, J., Ludwig, J., Weseloh, R. M., Marsh, S. J., Brown, D. A., und Pongs, O. (1996). Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18): 9910-9914.
- Steel, K. P. und Kros, C. J. (2001). A genetic approach to understanding auditory function. *Nat Genet*, 27(2): 143-9.
- Steinlein, O. K. (1998). New insights into the molecular and genetic mechanisms underlying idiopathic epilepsies. *Clin Genet*, 54(3): 169-175.
- Stühmer, W. (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods in Enzymology*, 207: 319-339.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., und Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339(6226): 597-603.
- Suh, B. C. und Hille, B. (2002). Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron*, 35(3): 507-520.
- Takumi, T., Ohkubo, H., und Nakanishi, S. (1988). Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*, 242: 1042-1045.
- Talebizadeh, Z., Kelley, P. M., Askew, J. W., Beisel, K. W., und Smith, S. D. (1999). Novel mutation in the *KCNQ4* gene in a large kindred with dominant progressive hearing loss. *Hum Mutat*, 14(6): 493-501.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., und Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128): 313-318.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., und Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25(24): 4876-4882.
- Tinel, N., Diochot, S., Lauritzen, I., Barhanin, J., Lazdunski, M., und Borsotto, M. (2000). M-type *KCNQ2-KCNQ3* potassium channels are modulated by the *KCNE2* subunit. *FEBS Lett*, 480(2-3): 137-141.
- Tinel, N., Lauritzen, I., Chouabe, C., Lazdunski, M., und Borsotto, M. (1998). The *KCNQ2* potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with *KCNQ3*. *FEBS Lett*, 438(3): 171-176.
- Tober, C., Rostock, A., Rundfeldt, C., und Bartsch, R. (1996). D-23129: a potent anticonvulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. *Eur J Pharmacol*, 303(3): 163-169.
- Tyson, J., Tranebjaerg, L., Bellman, S., Wren, C., Taylor, J. F., Bathen, J., Aslaksen, B., Sorland, S. J., Lund, O., Malcolm, S., Pembrey, M., Bhattacharya, S., und Bitner-Glindzicz, 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*, 6(12): 2179-2185.
- Van Camp, G., Coucke, P. J., Kunst, H., Schatteman, I., Van Velzen, D., Marres, H., van Ewijk, M., Declau, F., Van Hauwe, P., Meyers, J., Kenyon, J., Smith, S. D., Smith, R. J. H., Djelantik, B., Cremers, C. W. R. J., Van de Heyning, P. H., und Willems, P. J. (1997). Linkage analysis of progressive hearing loss in five extended families maps the *DFNA2* gene to a 1.25-Mb region on chromosome 1p. *Genomics*, 41: 70-74.

-
- Van Hauwe, P., Coucke, P., and Van Camp, G. (1999a). The DFNA2 locus for hearing impairment: two genes regulating K⁺ ion recycling in the inner ear. *Br J Audiol*, 33(5): 285-289.
- Van Hauwe, P., Coucke, P. J., Declau, F., Kunst, H., Ensink, R. J., Marres, H. A., Cremers, C. W., Djelantik, B., Smith, S. D., Kelley, P., Van de Heyning, P. H., and Van Camp, G. (1999b). Deafness linked to DFNA2: one locus but how many genes? *Nat Genet*, 21(3): 263.
- Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P. K., Hughes, D. C., Schatteman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R. J., Somers, T., Offeciers, F. E., Van de Heyning, P., Richardson, G. P., Wachtler, F., Kimberling, W. J., Willems, P. J., Govaerts, P. J., and Van Camp, G. (1998). Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet*, 19(1): 60-62.
- Vetter, D. E., Mann, J. R., Wangemann, P., Liu, J., McLaughlin, K. J., Lesage, F., Marcus, D. C., Lazdunski, M., Heinemann, S. F., and Barhain, J. (1996). Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron*, 17(6): 1251-1264.
- Wakai, S., Kamasaki, H., Itoh, N., Sueoka, H., Kawamoto, Y., Hayasaka, H., Tsutsumi, H., and Chiba, S. (1994). Classification of familial neonatal convulsions. *Lancet*, 344(8933): 1376.
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E., and McKinnon, D. (1998a). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science*, 282(5395): 1890-1893.
- Wang, M. H., Oh, U., and Rhee, H. I. (2000). Amino acid substitution within the S2 and S4 transmembrane segments in Shaker potassium channel modulates channel gating. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(3): 720-724.
- 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., and Keating, M. T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*, 12(1): 17-23.
- Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A., and Keating, M. T. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, 80(5): 805-811.
- Wang, W., Xia, J., and Kass, R. S. (1998b). MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J Biol Chem*, 273(51): 34069-34074.
- Wangemann, P. (2002). K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear Res*, 165(1-2): 1-9.
- Warmke, J. W. and Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(8): 3438-3442.
- Warth, R., Riedemann, N., Bleich, M., Van Driesche, W., Busch, A. E., and Greger, R. (1996). The cAMP-regulated and 293B-inhibited K⁺ conductance of rat colonic crypt base cells. *Pflügers Arch*, 432(1): 81-88.
- Watanabe, H., Nagata, E., Kosakai, A., Nakamura, M., Yokoyama, M., Tanaka, K., and Sasai, H. (2000). Disruption of the epilepsy *KCNQ2* gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem*, 75(1): 28-33.
- Weber, P. C., Cunningham, C. D., r., and Schulte, B. A. (2001). Potassium recycling pathways in the human cochlea. *Laryngoscope*, 111(7): 1156-65.
- Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R., and Hebert, T. E. (2002). A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native

-
- rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol*, 540(Pt 1): 15-27.
- Weil, D., Kussel, P., Blanchard, S., Levy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H., und Petit, C. (1997). The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*, 16(2): 191-193.
- Welsh, M. J., Smith, P. L., Fromm, M., und Frizzell, R. A. (1982). Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*, 218(4578): 1219-1221.
- Wen, H. und Levitan, I. B. (2002). Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J Neurosci*, 22(18): 7991-8001.
- Wickenden, A. D., Yu, W., Zou, A., Jegla, T., und Wagoner, P. K. (2000). Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol Pharmacol*, 58(3): 591-600.
- Wilson, J. (1985). Deafness in developing countries. Approaches to a global program of prevention. *Arch Otolaryngol*, 111(1): 2-9.
- Wolff, M., Vogel, W., und Safronov, B. V. (1998). Uneven distribution of K⁺ channels in soma, axon and dendrites of rat spinal neurones: functional role of the soma in generation of action potentials. *J Physiol*, 509(Pt 3): 767-776.
- Wollnik, B., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Esperer, H. D., Wieacker, P., und Jentsch, T. J. (1997). Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K⁺ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum Mol Genet*, 6(11): 1943-1949.
- Xia, J. H., Liu, C. Y., Tang, B. S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H. P., Zhang, B. R., Xie, W., Hu, D. X., Zheng, D., Shi, X. L., Wang, D. A., Xia, K., Yu, K. P., Liao, X. D., Feng, Y., Yang, Y. F., Xiao, J. Y., Xie, D. H., und Huang, J. Z. (1998). Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet*, 20(4): 370-373.
- Yang, N., George, A. L., J., und Horn, R. (1996). Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16(1): 113-122.
- Yang, W. P., Levesque, P. C., Little, W. A., Conder, M. L., Ramakrishnan, P., Neubauer, M. G., und Blonar, M. A. (1998). Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem*, 273(31): 19419-19423.
- Yang, W. P., Levesque, P. C., Little, W. A., Conder, M. L., Shalaby, F. Y., und Blonar, M. A. (1997). KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8): 4017-4021.
- Yus-Nájera, E., Santana-Castro, I., und Villarroel, A. (2002). The identification and characterization of a non-continuous calmodulin binding site in non-inactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem*, 277(32): 28545-28553.
- Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D., und Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783): 149-155.
- 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(6859): 43-48.



Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist im Labor von Thomas Jentsch am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg entstanden. Ihm danke ich für die Aufgabenstellung dieser Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und großzügige Unterstützung.

Ich danke Josef Ammermüller und Reto Weiler für die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie in Oldenburg, für ihr Interesse und ihre motivierende Art, die mich schon während des Studiums und der Diplomarbeit begleitet hat.

Bei Siegfried Waldegger bedanke ich mich für manche Einführung in die Kunst der Molekularbiologie und die Geheimnisse der Physiologie. Tatjana Kharkovets danke ich für die Herstellung der KCNQ4-defizienten Maus und die gute Zusammenarbeit in diesem Projekt. Allen technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Jentsch danke ich für die vielfältige Hilfe von der Präparation der *Xenopus* Oozyten bis zur Zellkultur. Ich bedanke mich bei Valentin Stein für die Einführung in die *Patch clamp* Messungen und für die Lösung so manchen Computerproblems. Ein großer Dank gilt Dagmar Boshold für ihre organisatorischen Tätigkeiten und ihren nahezu unerschöpflichen Schoko-Shop, der mich manches mal vor einer Untenzuckerung gerettet hat.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Jentsch danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Die Arbeit wäre ohne meine Freundinnen und Freunde nicht möglich gewesen. Ein riesiges Danke für die ständige Unterstützung, die offenen Ohren und motivierenden Worte. Martina und Jessica danke ich dafür, dass sie sich durch die Arbeit gequält haben, um Rechtschreibung, Kommasetzung und Satzbau zu verbessern. Und noch ein Dankeschön an Jessica, die durch ihre Geduld, ihre Ruhe und Wärme maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

Zur Person

Name Karin Dedek
Geburtsdatum 18.08.1972
Geburtsort Hemer
Familienstand ledig

Schulbildung

1979–83 Grundschulen in Menden und Iserlohn
1983 Märkisches Gymnasium Iserlohn
1992 Abitur 11.06.1992

Hochschulstudium

1992 Beginn des Biologiestudiums an der
Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg
1994 Vordiplom
1997–98 Diplomarbeit bei Prof. Dr. J. Ammermüller, Arbeitsgruppe Neurobiologie,
an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg
12/1998 Diplom in Biologie
seit 08/1999 Arbeit als Wissenschaftliche Angestellte am Zentrum für Molekulare
Neurobiologie Hamburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch
1999–2002 Aufbaustudium Molekularbiologie an der Universität Hamburg

Hamburg, den 10. Dezember 2002

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Karin Dedek