

**Aus der
Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie**

**Untersuchung von *Loss-of-function* Mutationen
in spannungsabhängigen Kaliumkanälen
Kv7.2 und Kv4.3 mit dem klinischen Bild einer
entwicklungsbedingten und epileptischen
Enzephalopathie (DEE) bzw. einer Spinocerebellären
Ataxie (SCA)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Krepp, Susanne**

2026

Dekan: Professorin Dr. S.Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Lerche
2. Berichterstatter: Professorin Dr. O. Garaschuk

Tag der Disputation: 24.7.2026

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsliste	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Ionenkanäle.....	8
1.2 Membranpotential	9
1.3 Die Familie der Kaliumkanäle.....	9
1.3.1 Struktur und Funktion von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv-Kanäle) ...	13
1.3.2 Klassifikation der Kv-Kanäle	16
1.3.3 Kv7-Kanäle aus der Familie der Kv-Kalium	17
1.3.4 M-Strom	19
1.3.5 Retigabin/Ezogabin.....	21
1.4 KCNQ assoziierte Erkrankungen.....	22
1.5 Epilepsie	24
1.6 Klinisches Bild der Träger der <i>KCNQ2</i> G315R und R325G Mutation	26
1.7 Kv4.3-Kanäle und A-Strom	26
1.8 Spinocerebelläre Ataxie	28
1.8.1 Spinocerebelläre Ataxie 19 / 22	29
1.8.2 Klinik der <i>KCND3</i> Mutation F227del	30
1.9 Heterologes <i>Xenopus laevis</i> Expressionssystem	30
1.10 Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp (TEVC)	31
1.11 Zielsetzung.....	32
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Materialien.....	33
2.1.1 Ausstattung	33
2.1.2 Verbrauchsmaterial	33
2.1.3 Chemikalien	34
2.1.4 Kits	34
2.1.5 Enzyme	34
2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien	34
2.1.7 Bakterienstämme	36
2.1.8 Vektoren	36
2.1.9 Primer	36
2.2 Molekularbiologische Methoden	37

2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.3	Zielgerichtete Mutagenese.....	38
2.2.4	Aufreinigung	40
2.2.5	DpnI-Verdau der DNA-Matrize	40
2.2.6	Ligation	40
2.2.7	Herstellung kompetenter Zellen (Calciumchlorid-Methode).....	40
2.2.8	Transformation.....	41
2.2.9	Kryokultur	42
2.2.10	DNA-Isolation aus Bakterien	42
2.2.11	Miniprep.....	42
2.2.12	Plasmid Maxi Präparation	43
2.2.13	Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA	43
2.2.14	DNA-Sequenzierung	44
2.2.15	DNA-Linearisierung und Nukleinsäuren Reinigung.....	44
2.2.16	RNA-Synthese.....	45
2.3	Oocyten-Präparation.....	46
2.4	Zwei-Elektroden Voltage clamp (TEVC) und das Voltage Clamp Protokoll	47
2.5	Datenanalyse	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Sequenzvergleich	49
3.2	KCNQ2	51
3.2.1	Funktionelle Untersuchung homomerer Kv7.2-Kanäle	51
3.2.2	Funktionelle Untersuchung heteromerer Kv7.2/ Kv7.3-Kanäle	55
3.2.3	Retigabin.....	60
3.3	KCND3	62
3.3.1	Funktionelle Untersuchung von Kv4.3-Kanälen.....	62
4	Diskussion.....	66
4.1	KCNQ2/KCNQ3	66
4.2	KCND3	70
5	Zusammenfassung.....	71
6	Literaturverzeichnis.....	74
7	Danksagung	84
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Kv7.2-Untereinheit.....	14
Abbildung 2: Querschnitt eines Kv7-Kanals.....	14
Abbildung 3: Homologie von Natrium, Calcium und Kalium Ionenkanälen.....	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer KCND3 Untereinheit	28
Abbildung 5: Schemadarstellung einer Zwei-Elektroden Voltage Clamp Technik (TEVC)	32
Abbildung 6: Alignment der Aminosäuresequenz KCNQ2	50
Abbildung 7: Alignment der Aminosäuresequenz KCND3	50
Abbildung 8: Streudiagramm der Stromamplituden bei homomerer Expression KCNQ2, G135, R325G.....	52
Abbildung 9: Stromamplitude bei homomerer Expression KCNQ2, G135R, R325G.....	52
Abbildung 10: Charakteristische Stromverläufe für Kv7.2, Kv7.2/H20, G315R (1:1) und R325G (1:1)	53
Abbildung 11: Stromamplituden bei Injektion von 7.2, Kv7.2/H20, G315R (1:1) und R325G (1:1).....	54
Abbildung 12: Charakteristische Stromverläufe von Kv7.2 und Kv7.2/Kv 7.3.....	55
Abbildung 13: Streudiagramm der Stromamplituden bei Expression Kv7.2+Kv7.3, G315R (1:1:2), R325G (1:1:2).....	55
Abbildung 14: Stromamplituden bei Expression Kv7.2+Kv7.3, G315R (1:1:2), R325G (1:1:2)....	56
Abbildung 15: Strom-Spannungsverhältnis der Aktivierung bei Expression Kv7.2+Kv7.3, G315R (1:1:2), R325G (1:1:2) sowie Vergleich der halbmaximalen Aktivierungspotentiale	57
Abbildung 16: Aktivierungskinetik der coexprimierten Kanäle (1:1:2).....	58
Abbildung 17: Vergleich der Ruhemembranpotentiale von Zellen mit Expression Wildtyp und KCNQ2-Mutation.....	59
Abbildung 18: Strom-Spannungsverhältnis mit und ohne Applikation des Antikonvulsivum Retigabin (RTG).	61
Abbildung 19: Charakteristische Stromverläufe von KCND und F227del.....	63
Abbildung 20: Streudiagramm der Stromamplituden von KCND3, KCND3/H20 (1:1), 227del, KCND3/227del (1:1).....	64
Abbildung 21: Stromamplituden bei Injektion KCND3, KCND3/H20 (1:1), 227del, KCND3/227del (1:1)	65

Abkürzungsliste

A	Adenin
Abb.	Abbildung
a.e.	am ehesten
AIS	Axoninitiaalsegment
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP	Aktionspotential
BFNS	<i>Benign familial neonatal seizures</i> (benigne familiäre neonatale Anfälle)
BFNIS / BFIS Anfälle)	<i>Benign familial infantile seizures</i> (benigne familiäre infantile Anfälle)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEE	<i>Developmental and epileptic encephalopathy</i> , entwicklungsbedingte und epileptische Enzephalopathie
et al.	lat.: <i>et alii, et aliae</i> (und andere)
evtl.	eventuell
FBA	<i>Feedback Amplifier</i> (Rückkopplungsverstärker)
For	forward
g	Gramm
x g	<i>gravity</i> , Erdbeschleunigung
G	Guanin
GABA	<i>γ-Aminobutyric acid</i> (γ-Aminobuttersäure)
GGE	Genetische generalisierte Epilepsien
Ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic
IGE	Idiopathisch generalisierte Epilepsie, nach neuer Terminologie der ILAE: Genetische generalisierte Epilepsie
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie
I _m	M-Strom
KcsA	<i>K⁺ channel of streptomyces A</i> (K ⁺ Kanal von Streptomyces A)
LB	Luria Bertani (Medium)
M	Molare Konzentration [mol/l]
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolare Konzentration [mmol/l]

mRNA	<i>messenger RNA</i>
nA	Nanoampere
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNS	Peripheres Nervensystem
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
PNH	<i>peripheral nerve hyperexcitability</i> (Hyperexzitabilitätssyndrom peripherer Nerven)
RMP	Ruhemembranpotential
RTG	Retigabin
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
TEVC	<i>Two electrode Voltage Clamp</i> , Zwei -Elektroden-
Spannungsklemme	
T	Thymin
TM	Transmembran Helices
TTX	Tetrodotoxin, Neurotoxin mit Vorkommen u.a. im Kugelfisch
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
v.a.	vor allem
VE	Voll-entsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
wt	wildtypisch
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle bilden die Grundlage zahlreicher physiologischer Vorgänge. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Homöostase, Osmoregulation, der Erzeugung von Aktionspotentialen sowie in der synaptischen Signalübertragung. Der Durchbruch in der Erforschung ihrer Funktion gelang durch die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik durch Neher und Sakmann (1976), die dafür 1991 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden. Die strukturelle Aufklärung wurde durch MacKinnons Röntgenkristallographie eines bakteriellen Kaliumkanal 1998 entscheidend vorangetrieben. Er erhielt ebenfalls den Nobelpreis (2003). Neuere Fortschritte in der Kryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM) erlauben heute die hochauflösende Darstellung von Ionenkanälen in unterschiedlichen Konformationszuständen (Sun & MacKinnon, 2020).

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die selektiv den Transport von Ionen über die Plasmamembran ermöglichen. Sie bestehen typischerweise aus mehreren Untereinheiten, die sich innerhalb der Lipiddoppelschicht zu einem funktionellen Porenkomplex zusammenlagern. Zusätzlich binden akzessorische Proteine, welche die Lokalisierung, Leitfähigkeit und regulatorische Eigenschaften des Kanals modulieren. Ionenkanäle unterliegen komplexen Regulationsmechanismen und lassen sich grob in spannungsabhängige, ligandengesteuerte, rezeptorgekoppelte sowie konstitutiv aktive Kanäle einteilen (Klinke, 2010). Sie sind dynamische Strukturen, die zyklisch zwischen offenem, geschlossenem und inaktiviertem Zustand wechseln, ein Vorgang, der als Gating bezeichnet wird (Rassow, 2006). Gating-Mechanismen sind entweder Stimuli getriggert, beispielsweise durch Ligandenbindung an einen ligandengesteuerten Ionenkanal, durch Änderung des Membranpotentials bei spannungsabhängigen Ionenkanälen oder aber akzidentiell.

1.2 Membranpotential

Erregbare Zellen, insbesondere Neuronen, weisen im Ruhezustand ein Membranpotential von etwa -50 mV bis -100 mV auf (Silbernagel, 2003). Dieses resultiert aus einer ungleichen Verteilung von Ionen zwischen intra- und extrazellulärem Raum, die hauptsächlich durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird. Diese Pumpe bewirkt unter Energieverbrauch einen Antiport von drei Natriumionen aus der Zelle und zwei Kaliumionen in das Zytosol, wodurch ein Konzentrations- und Ladungsgefälle entsteht mit Entstehung eines negativen Potentials im Zellinneren. Während im Zellinneren eine hohe Kaliumkonzentration ($\sim 140\text{ mmol/l}$) und eine niedrige Natriumkonzentration ($\sim 12\text{ mmol/l}$) herrscht, ist extrazellulär der Natriumgehalt mit etwa 145 mmol/l hoch und der Kaliumgehalt mit ca. 4 mmol/l niedrig. Die Zellmembran weist eine sehr geringe Leitfähigkeit für Natrium jedoch eine deutlich höhere für Kalium auf. Über selektive Kalium-Leckkanäle (K_2P -Kanäle) kann Kalium passiv entlang seines Konzentrationsgradienten aus der Zelle diffundieren (Goldstein et al., 2001). Diese selektive Permeabilität führt zur Ausbildung eines Diffusionspotentials: An der Außenseite der Membran akkumulieren positive Ladungen, während das Zellinnere negativ wird. Das entstehende elektrische Feld wirkt dem weiteren Kaliumausstrom entgegen bis chemische und elektrische Triebkräfte im Gleichgewicht sind – dies entspricht dem sogenannten Kaliumgleichgewichtspotential (Silbernagel, 2003). Zellmembranen sind jedoch auch für andere Ionen wie Chlorid oder Calcium in unterschiedlichem Maße permeabel und das Membranpotential weicht deshalb vom reinen Kaliumgleichgewicht ab - berechenbar nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung.

1.3 Die Familie der Kaliumkanäle

Die Vorstellung selektiver Kaliumkanäle reicht über mehr als ein Jahrhundert zurück. Bereits Julius Bernstein postulierte 1902 in seiner Membrantheorie, dass die Zellmembran erregbarer Zellen in Ruhe vor allem für Kaliumionen durchlässig

ist und das Ruhemembranpotential aus deren ungleicher Verteilung resultiert. Spätere Arbeiten von Hodgkin und Huxley (1952) bestätigten diese Hypothese experimentell und legten den Grundstein der modernen Elektrophysiologie.

Kaliumkanäle bilden die größte und vielfältigste Familie aller Ionenkanäle. Im menschlichen Genom sind etwa 80 Kaliumkanal-kodierende Gene bekannt (Villa, 2016); rund 40 davon sind spannungsgesteuert und werden in zwölf Subfamilien (Kv1–Kv12) eingeteilt (Johnston, 2010). Ihre funktionelle Diversität wird durch alternatives Splicing, Heteromerisierung und zelltypspezifische Expression weiter gesteigert (Hille, 2001). Zahlreiche Isoformen werden zudem entwicklungs- oder gewebespezifisch exprimiert.

Phylogenetisch sind Kaliumkanäle keine Neuentwicklung bei Wirbeltieren, genauso wenig wie die große Zahl der für Kaliumkanäle kodierenden Gene. Sie stellen eine evolutionär hochkonservierte Proteinfamilie dar. Ihre Gene finden sich nicht nur in Wirbeltieren, sondern auch in einfachen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* (76 Kaliumkanalgene; Bargmann, 1998) oder *Drosophila melanogaster* (27 Gene; Littleton & Ganetzky, 2000). Sogar in Prokaryoten, etwa im Archaeobakterium *Aeropyrum pernix*, wurden Kaliumkanäle identifiziert. Damit gelten sie als evolutionäres Grundelement zellulärer Lebensfähigkeit (Hille, 2001).

Die Erforschung von Kaliumkanälen war zunächst schwierig, da geeignete Liganden und stabile Proteinpräparationen fehlten (Berg, 2002). Erst der Fortschritt molekulargenetischer Techniken ermöglichte 1987 die Klonierung des *Shaker*-Gens in *Drosophila melanogaster* (Papazian et al., 1987; Pongs et al., 1988). Dies markierte den Beginn der modernen Kaliumkanalforschung. In der Folge wurden weitere *Drosophila*-Gene (*Shab*, *Shaw*, *Shal*) identifiziert, die homologe menschliche Gene besitzen.

Mit wachsender Zahl identifizierter Gene wurde die Klassifikation der Kaliumkanäle mehrfach revidiert. Heute erfolgt sie anhand struktureller Kriterien (Zahl der Transmembrandomänen und Porenschleifen), funktioneller Eigenschaften (Aktivierungsmechanismus, Leitfähigkeit) und Sequenzhomologien.

Aus struktureller Sicht werden laut Capera (Capera, 2019) vier Gruppen unterschieden:

- Kaliumkanäle aus Tetrameren mit 6 Transmembrandomänen, einer P-Schleife und intrazellulär liegendem N- und C- Terminus, wozu die spannungsabhängigen Kv-Kanäle und damit auch die Kv4 und Kv7- Kanäle gehören, die Teil dieser Arbeit sind und später näher besprochen werden.
- Ca^{2+} -aktivierte Kanäle („*large conductance K_{Ca}*“), die ebenfalls aus einem Tetramer bestehen, dessen Untereinheiten jedoch sechs oder sieben Transmembrandomänen und eine P-Schleife besitzen (Wulff, 2009). Sie werden durch einen intrazellulären Calciumanstieg aktiviert.
- Kaliumkanäle aus Tetrameren mit jeweils nur zwei Transmembrandomänen und einer P-Schleife, wozu die einwärts gleichrichtenden K_{IR} -Kanäle („*inward rectifier*“) gehören, die bei hyperpolarisierten Membranpotentialen im Bereich des Gleichgewichtspotentials von K^+ (ca.-90mV) aktiviert werden und einen höheren Kalium-Influx als Efflux bevorzugen. Bei positiveren Membranpotentialen werden sie durch Polyamine oder Mg^{2+} blockiert, was einen Ausstrom von K^+ während einer Depolarisation verhindert. Damit sind sie wichtig für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials (Ho et al., 1993, Brandes, 2019). Hierzu gehören auch die ATP-sensitiven Kaliumkanäle K_{ATP} , die z.B. in den β -Zellen des Pankreas die Insulinsekretion regulieren. Glucose wird insulinunabhängig in die β -Zelle des Pankreas transportiert, das einen erhöhten ATP-Spiegel bewirkt, wodurch es zum Schluss der ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K_{IR} 6.2) mit konsekutiver Depolarisation kommt. Durch eine nachgeschaltete Signalkaskade hat dies die Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle mit Insulinsekretion zur Folge.
- Tandemporen-Kanäle ($\text{K}_{2\text{P}}$), deren Untereinheiten aus jeweils vier Transmembrandomänen und 2 P-Schleifen bestehen und schon als Dimer einen funktionellen Kanal bilden. Hinsichtlich der Ausbildung von zwei P-Schleifen innerhalb einer Untereinheit geht man davon aus, dass es sich um eine Fusion zweier Untereinheiten handelt. Sie sind Grundlage der Hintergrundleitfähigkeit durch Kalium-Leakströme, komplex regulierbar, teilweise durch Depolarisation, Neurotransmitter, Temperatur, mechanische

Dehnung oder pH-Wert. Physiologische Relevanz besitzen sie neben der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials auch u.a. in Blutdruckregulation, Herzerregung und Schlaf-Wach-Regulation¹.

Die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) bilden die größte Untergruppe der Kaliumkanalfamilie und werden in zwölf Subfamilien (Kv1–Kv12) eingeteilt (Wulff et al., 2009). Einige Vertreter, darunter Kv1, Kv4 und Kv7 aktivieren bereits bei Membranpotentialen nahe dem Ruhemembranpotential und werden daher als *low-voltage-activated* (LVA) bezeichnet (Johnston et al., 2010). Kv4-Kanäle zeichnen sich durch eine schnelle Aktivierung und Inaktivierung aus, erzeugen den sogenannten A-Strom und benötigen zur Reaktivierung eine vorangegangene Hyperpolarisation (Maffie & Rudy, 2008). Im Gegensatz dazu sind Kv7-Kanäle nicht inaktivierbar und weisen eine langsame Kinetik auf. Sie vermitteln einen stetigen, spannungsabhängigen Auswärtsstrom, der das Ruhemembranpotential stabilisiert ohne wesentlich zur Repolarisation einzelner Aktionspotentiale beizutragen (Brown & Adams, 1980; Brown, 2009). Kv4-Kanäle hingegen modulieren die Initiierung und Frequenz von Aktionspotentialen (Hille, 2001). Kv2- und Kv3-Kanäle werden erst bei stärkeren Depolarisationen aktiviert (*high-voltage-activated*, HVA) und bestimmen damit maßgeblich das Feuermuster und die Repolarisationsdynamik neuronaler Aktionspotentiale (Johnston et al., 2010). Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle Kv7.2 und Kv7.3 der KCNQ-Familie sowie Kv4.3.

¹ https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/s12269-015-00082/html?srsId=AfmBOorHkuMjulgU4wdHttu9RF1RPTJ_0M-dwxX8Jie-Zl0x3TDndSG8, Stand 09/2025

1.3.1 Struktur und Funktion von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv-Kanäle)

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) sind die größte und funktionell vielseitigste Untergruppe der Kaliumkanäle. Sie bestehen aus vier α -Untereinheiten, die gemeinsam eine zentrale Pore bilden. Jede Untereinheit weist sechs Transmembransegmente (S1–S6) auf. Die Segmente S1–S4 bilden den Spannungssensordomäne (*Voltage-Sensing-Domain*, VSD), während S5–S6 zusammen mit der P-Schleife (P-Loop) die Porendomäne ausmachen (Noda et al., 1984). Das Segment S4 enthält mehrere positiv geladene Arginin-Reste, die als Spannungssensoren fungieren (Lerche et al., 2000). Bei Änderungen des Membranpotentials werden diese Ladungen, wie in Abb. 2 dargestellt, verschoben und lösen über den S4–S5-Linker eine Konformationsänderung in der Porendomäne aus, die das Öffnen oder Schließen des Kanals steuert (Jensen et al., 2012). Im Ruhezustand werden die positiv geladenen S4-Segmente durch elektrostatische Anziehung zur negativ geladenen Innenseite der Plasmamembran gezogen, wodurch die Pore geschlossen bleibt. Eine Depolarisation bewirkt eine elektrostatische Abstoßung dieser Sensorladungen, die mechanisch über den S4–S5-Linker auf die Porendomäne übertragen wird und zur Öffnung des Kanals führt (Jensen et al., 2012). Neuere molekulardynamische Simulationen und Cryo-EM-Analysen zeigen, dass sich die S4-Helix stufenweise über mehrere Zwischenpositionen („up“, „intermediate“, „down“) um etwa zwei Helixwindungen bewegt. Dadurch wird eine fein abgestufte Kontrolle des Gatings ermöglicht (Mandala & MacKinnon, 2022).

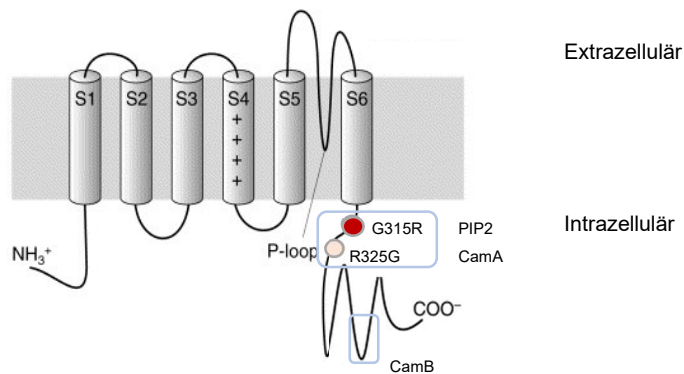


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer K_v7 -Untereinheit sowie weiterer spannungsabhängiger Kaliumkanäle. Die abgebildeten Zylinder stellen die sechs transmembranären α -Helices dar, S4 den positiv geladenen Spannungssensor, S5 bis S6 die porenbildende Domäne. C- und N-Terminus liegen intrazellulär. Dargestellt durch Punkte sind die hier untersuchten *KCNQ2* Punktmutationen G315R (rot) und R325G (ocker) im C-Terminus, welche in der Calmodulin-Bindestelle (CamA) und nahe der PIP2-Bindestelle lokalisiert sind (Millichap et al., 2016).

Modifiziert nach Rogawski, 2000 und Millichap, 2016

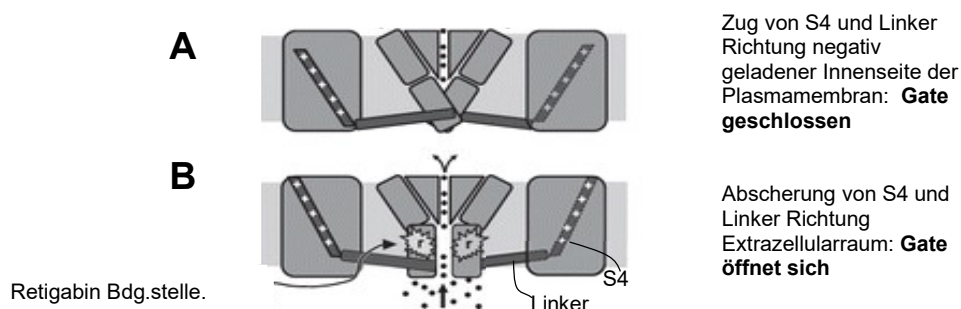


Abbildung 2: Querschnitt eines K_v7 -Kanals.

(A): Bei Ruhemembranpotential wird der Spannungssensor S4 mit beinhaltenden positiv geladenen Argininen in Richtung der negativ geladenen Innenseite der Plasmamembran gezogen: Das Gate ist geschlossen.

(B): Bei Depolarisation erfolgt die elektrostatische Abstoßung von S4 und Innenseite der Plasmamembran. Das Gate öffnet sich. Zusätzlich ist die angenommene Retigabin-Bindestelle (r) am S5 Segment innerhalb der Kanalpore gezeigt.

Modifiziert nach Millichap und Cooper, 2012

hochspezifische Passage von K^+ -Ionen, während Na^+ -Ionen trotz geringerer Größe ausgeschlossen werden. Strukturelle Analysen zeigen, dass K^+ -Ionen im Selektivitätsfilter ihre Hydrathülle verlieren und durch direkte Wechselwirkungen mit Carbonylsauerstoffen der P-Schleife stabilisiert werden. Kaliumionen können den Kanal „nackt“² durchqueren. Dieses Prinzip erlaubt eine schnelle, aber dennoch selektive Ionentranslokation („Knock-on-Mechanismus“; Kopec et al., 2018). Bei Na^+ -Ionen mit höherer Ladungsdichte wäre die Dehydratisierung energetisch ungünstig, ihre Hydrathülle wird deshalb nicht abgestreift und sie können diese Wechselwirkungen mit der P-Schleife nicht eingehen. Zudem ist ihr Durchmesser bei erhaltender Hydrathülle zu groß, weshalb ihnen der Durchtritt durch den Kanal verwehrt und die Kanalselektivität erhalten bleibt (Kopec et al., 2018).

Die tetramere Organisation der Kv-Kanäle zeigt eine deutliche Homologie zu spannungsabhängigen Natrium- (NaV) und Calcium- (CaV) Kanälen, deren α -Untereinheit aus vier homologen, in Serie geschalteten Domänen besteht. Diese Serie entspricht funktionell den vier separaten Untereinheiten der Kv-Kanäle (Berg et al., 2002), das Hinweis auf eine gemeinsame evolutionäre Abstammung ist.

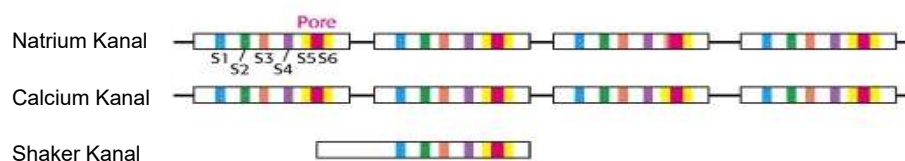


Abbildung 3: Homologie von NaV-, CaV- und Kv-Ionenkanälen; vierfach in Serie geschaltene Domänen der NaV- und CaV-Kanäle entsprechen funktionell der Anordnung im Tetramer der α -Untereinheiten im Kv-Kanal.

Modifiziert nach Berg et.al., 2002

² https://www.mpinat.mpg.de/619856/pr_1819 (Stand 09/25)

1.3.2 Klassifikation der Kv-Kanäle

Der erste klonierte spannungsabhängige Kaliumkanal *Shaker* wurde bei *Drosophila melanogaster* identifiziert. Die Mutation führt durch eine Reduktion des A-Stroms zu charakteristischen Muskelzuckungen, die namensgebend waren (Salkoff, 1981). In der Folge wurden weitere Kv-Kanal-Gene (*Shab*, *Shaw* und *Shal*) kloniert, die jeweils homologe Genfamilien in Säugetieren besitzen: *Shaker* (KCNA-), *Shab* (KCNB-), *Shaw* (KCNC-) und *Shal* (KCND-Genfamilie).

Kv-Kanäle bestehen aus vier α -Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembransegmenten. Häufig lagern sich an die α -Untereinheiten regulatorische β -Untereinheiten an, die selbst keine Ionenkanäle bilden können, jedoch die Kanalcharakteristik modifizieren (Rettig et al., 1994) oder die Oberflächenexpression erhöhen (Shi et al., 1996). Mutationen in β -Untereinheiten können ebenso schwerwiegende neuronale Funktionsstörungen verursachen wie in den α -Untereinheiten - beispielsweise *SCN1B*-Mutationen, die mit dem Dravet-Syndrom assoziiert sind (Aeby et al., 2019). β -Untereinheiten spannungsabhängiger Kv-Kanäle besitzen meist keine Transmembrandomäne und binden intrazellulär an die α -Untereinheiten (Parcej et al., 1992; Gulbis et al., 1999).

Ein funktioneller Kv-Kanal setzt sich aus vier homo- oder heteromeren α -Untereinheiten zusammen. Nicht alle Untereinheiten sind miteinander kombinierbar (Christie et al., 1990). Die Kompatibilität wird typischerweise durch Wechselwirkungen der T1-Domänen bestimmt, die sich N-terminal vor dem ersten Transmembransegment (S1) befinden (Li et al., 1992). Die Untereinheiten der Kv7-Kanäle interagieren im Gegensatz dazu aber über ihren C-Terminus. Durch unterschiedliche Kombinationen von α -Untereinheiten und durch alternative Spleißvarianten entsteht eine erhebliche molekulare Diversität, die eine Anpassung an verschiedene zelluläre Funktionen ermöglicht (Christie et al., 1990). Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, erfolgt die Öffnung der Kv-Kanalpore durch eine Konformationsänderung mit Verschiebung des S4-Segments und Linker. Inaktivierbare Kanäle zeigen entweder eine langsame C-Typ- oder eine schnelle N-Typ-Inaktivierung. Der Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung ist bislang nur teilweise verstanden; angenommen wird eine

Konformationsänderung an der extrazellulären Seite der Pore, die das Schließen des Kanals bewirkt. Die N-Typ-Inaktivierung folgt dagegen dem klassischen „*Ball-and-Chain*“-*Mechanismus* (Armstrong & Bezanilla, 1973; Hoshi et al., 1991): Der flexible N-Terminus einer α -Untereinheit schwenkt nach der Aktivierung in die Kanalpore ein und blockiert diese reversibel.

1.3.3 Kv7-Kanäle aus der Familie der Kv-Kalium

Kv7-Kanäle sind eine phylogenetisch alte Unterfamilie der spannungsabhängigen Kv7-Kanäle. Orthologe Gene von *KCNQ1* und *KCNQ5* finden sich in allen Bilateria, das heißt vom Wurm bis zum Wirbeltier. *KCNQ2* und -3, von denen man vermutet, dass sie durch Genduplikation entstanden sind, sind dagegen jünger und entwickelten sich erst innerhalb der Wirbeltiere (Wei et al., 2005; Cooper, 2010). Trotz langjähriger Erforschung von Kv7-Strömen waren sie die letzte große Gruppe spannungsabhängiger Kaliumkanäle, die kloniert wurden; laut Jentsch wohl aus technischen Gründen wegen des hohen GC-Gehaltes ihrer Sequenz (Jentsch, 2000).

Im menschlichen Genom ist *KCNQ2* auf Chromosom 20 und *KCNQ3* auf Chromosom 8 kodiert. Kv7-Kanäle folgen dem typischen Aufbau von Kv-Kanälen mit vier α -Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen, einer P-Schleife flankiert von Segment S5 und S6 als porenbildende Domäne und Aktivierungstor sowie einen Spannungssensor (S1-S4; VSD) mit positiv geladenem S4-Segment, das je nach Subtyp vier bis sechs Arginine beinhaltet (Lerche et al., 2000). Charakteristisch für Kv7 ist der lange C-Terminus, der mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und Calmodulin (CaM) interagiert.

Kv7-Kanäle unterscheiden sich trotz des ähnlichen Aufbaus von anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen in einigen Punkten (Cooper, 2011). Zum einen fehlt Kv7-Kanälen die T1-Domäne im N-Terminus, über die Kv1-4 tetramerisieren. Die Tetramerisierungsdomäne liegt bei Kv7-Kanäle dagegen c-terminal (Schmitt et al., 2000; Yus-Najera et al., 2002; Maljevic et al., 2003; Schwake et al., 2003; Zhang et al., 2003). Der C-Terminus verfügt zudem über zwei Calmodulin-(CaM)-Bindestellen. CaM spielt eine wichtige Rolle in der

korrekten Proteinfaltung, dem Trafficking, d.h. Ausschleusen des Genprodukts aus dem endoplasmatischen Retikulum und Einbau in die Plasmamembran, dem Assembly und in der funktionellen Regulation (Ca^{2+} -abhängige Modulation). Durch die Interaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) über Bindedomänen (c-terminal und im S4-S5-Linker) mit der VSD und Pore wird die Kanalöffnung stabilisiert (Yus-Nájera et al., 2002; Devaux et al., 2004, Chung et al., 2006, Liu und Devaux, 2014). Ein weiterer Unterschied zu anderen Kv7-Kanälen ist ein 80 Aminosäuren langes, konserviertes „Anker“-Motiv (Ankyrin-G-Bindestelle) weiter distal am C-Terminus, das unter Kv7-Kanälen nur Kv7.2 und -3 Kanäle besitzen. Ankyrin-G vermittelt die Lokalisierung der Kv7-Kanäle am Axoninitialsegment (AIS) und an Ranvierschen Schnürringen, wo Kv7.2/7.3 häufig mit NaV-Kanälen colokalisiert sind. Diese räumliche Koinzidenz ist funktionell wichtig für die Kontrolle der Erregungsinitiation und Wiederverfügbarkeit von NaV-Kanälen.

Kv7-Untereinheiten können homo- und in bestimmten Kombinationen heteromere Kanäle bilden (Schroeder et al., 1998; Kubisch et al., 1999; Lerche et al., 2000). So kann Kv7.3 sowohl mit Kv7.2, Kv7.4 und Kv7.5 interagieren, nicht aber mit Kv7.1. Kv7.1 lagert sich mit β -Untereinheiten der KCNE-Familie (KCNE1 und KCNE3) zusammen (Kubisch et al., 1999; Yus-Nájera et al., 2003; Devaux et al., 2004; Cooper, 2010), nicht aber mit anderen Kv7-Untereinheiten (Berhanin et al., 1996; Schroeder et al., 2000). Wie bereits genannt, interagieren die auxiliären β -Untereinheiten der KCNE-Familie mit Kv7-Kanälen und beeinflussen ihre Funktionsweise. Sie haben - anders als die β -Untereinheiten der weiteren Vertreter von Kv-Kanälen - eine Transmembrandomäne (McCrossan et al., 2004, Tristani-Firouzi et al., 1998).

Experimentell zeigen homomere Kv7.3-Kanäle in heterologer Expression geringe bis keine Ströme, während Kv7.2-Homotetramere deutlich leitfähiger sind. Kv7.2/Kv7.3-Heteromere generieren in der Regel deutlich größere M-Ströme mit in heterologen Systemen ~10-fach größeren Stromamplituden (Yang WP et al., 1998) und einem gesteigerten Plasmamembraneinbau (Schwake et al., 2000). Kv7.2 und Kv7.3 haben ein überlappendes Expressionsmuster, wenngleich sich

die Expressionsdichte der jeweiligen α -Untereinheiten in verschiedenen Neuronen und Entwicklungsphasen unterscheiden (Schroeder et al., 1998). So werden in der neuronalen Proliferationsphase vor allem Kv7.2 Homotetramere exprimiert und erst in einer späteren Phase - während der Differenzierung - heteromere Kv7.2/ Kv7.3 Kanäle gebildet (Hadley 2003, Tinel et al., 1998, Safiulina et al., 2008). Die Expression von Kv7.2 und -3 ist im ZNS breit verteilt (Kortex, Putamen, Nucleus caudatus, Thalamus, Amygdala, Hippocampus, Substantia nigra, (Biervert et al., 1998; Schroeder et al., 1998; Yang et al., 1998)), jedoch auch im peripheren Nervensystem vorhanden (Passmore et al., 2003 und 2012).

Funktionell bilden Kv7.2/7.3 den charakteristischen M-Strom: langsam aktivierend, nicht-inaktivierend, auswärtsgleichrichtend, mit einer Aktivierung im Subschwellenbereich und daher relevant für die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und Unterdrückung repetitiven Feuerns (Cooper, 2000). Neben dieser klassischen Rolle gibt es zunehmende Evidenz für eine Bedeutung von Kv7-Kanälen in neuronaler Entwicklung und Netzwerkreifung (Baculis et al., 2020; Dirx et al., 2020).

1.3.4 M-Strom

Der von Kv7.2- und Kv7.3 Kanälen vermittelte Strom wird als M-Strom (I_M) bezeichnet (Wang et al., 1998). Neben Kv7.2 und Kv7.3-Kanäle vermitteln auch Kv7.4 und Kv7.5-Kanäle M-Strom (Lerche et al., 2000). Es handelt sich um einen langsam aktivierenden, nicht inaktivierenden Auswärts- K^+ -Strom mit Aktivierung bereits im Subschwellenbereich (ca. -60 mV) und vollständiger Aktivität bei Depolarisation (Gutman, 2005; Cooper et al., 2000). Durch den Kaliumausstrom wirkt der M-Strom hyperpolarisierend, stabilisiert das Ruhemembranpotentials und unterdrückt repetitive Aktionspotentialentladungen. Durch die Colokalisation von Kv7.2/7.3 mit spannungsabhängigen Natriumkanälen (NaV) an exzitatorisch relevanten Punkten wie dem Axonhügel und den Ranvier-Schnürringen schränken sie zum einen wiederholtes Feuern ein und sichern zum anderen die NaV-Kanal Verfügbarkeit im steady-state (Chung et al., 2006, Battefeld et al., 2014). Zusätzlich besteht eine hohe Expressionsdichte von Kv7.2 an

präsynaptischen Endigungen, wo sie regulatorische Wirkung auf die Neurotransmitterausschüttung haben (Battefeld et al., 2014).

Namensgebend für den M-Strom war seine Eigenschaft, dass er durch Muscarin, das Gift des Fliegenpilzes, gehemmt werden kann (Brown und Adams, 1980). Der Mechanismus läuft über die Aktivierung des metabotropen, G_q -Protein gekoppelten muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor (mAChR). Der natürliche Aktivator des mAChR ist Acetylcholin. Bei Bindung von Acetylcholin wird die G_q -Untereinheit vom G-Protein abgespalten, die die Phospholipase C aktiviert. Phospholipase C spaltet das an der intrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisierte Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2), das zur Kanalöffnung nötig ist, zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 sorgt als *second messenger* für eine Freisetzung von Ca^{2+} aus Ca^{2+} -Speichern der Zelle (v.a. Endoplasmatisches Reticulum). Ca^{2+} -bindet an Calmodulin, wodurch Calmodulin von der Calmodulin-Bindestelle am C-Terminus der Kv7.2- und Kv7.3 Untereinheit abdiffundiert, das zur Schließung des Kanals und somit Drosselung des M-Stroms führt (Wen and Levitan, 2002; Yus-Najera et al., 2002).

M-Strom-Kanäle lassen sich experimentell pharmakologisch durch Linopirdin oder XE991 hemmen. Dies bewirkt eine Verschiebung der Aktionspotentialschwelle in Richtung negativere Potentiale (Shah et al., 2008) und somit eine neuronale Hyperexzitabilität (Delmas und Brown, 2005). Ursprünglich wurden Linopirdin als Nootropika bei Alzheimer entwickelt und sollte eine verstärkte Acetylcholinausschüttung bewirken. Es zeigte aber in der klinischen Anwendung keine Verbesserung der Gedächtnisleistung (Rockwood et al., 2014). Heute findet man sogar eher Hinweise auf reduzierte M-Ströme im Zusammenhang mit β -Amyloid-Ablagerungen (Colom et al., 2011), was somit nach heutiger Sicht therapeutisch eher für ein Profitieren von Kv7-Kanalöffnern sprechen würde (Dirkx et al., 2020). Selektive Kv7-Kanalöffner wie Retigabin (RTG) wurden bereits in Tierversuchen bei Alzheimer eingesetzt (Zhuang et al., 2024). Neuerdings wurde auch Gabapentin als indirekter Kv7-Öffner identifiziert, dessen Wirkung über dieselbe Tryptophan-Bindestelle im S5-Segment von Kv7.2 wie RTG erfolgt (Manville et al., 2018) und als „precision therapy“ gesehen werden kann (Soldovieri et al., 2020). Weitere Substanzen mit aktivierendem

Effekt auf Kv7-Kanäle sind Somatostatin, Cortistatin und Dynorphin (de Lecea et al., 1996,).

1.3.5 Retigabin/Ezogabin

Das hier untersuchte Retigabin/Ezogabin ist ein direkter Kv7-Kanalöffner mit Spezifität für Kv7.2-Kv7.5. Ausgangssubstanz für Retigabin war das zentral wirksame nicht-opioide Analgetikum Flupirtin, bei dem bereits antiepileptische Effekte diskutiert wurden (Rostock et al., 1996). Es wurde ab 1980 ursprünglich im damals ostdeutschen *Arzneimittelwerk Dresden* entwickelt, dann von GlaxoSmithKline produziert (Gunthorpe, 2012). 2011 erfolgte die Zulassung in der EU und den USA (US-Marktzulassung unter dem Handelsnamen Ezogabine). Schon im Juli 2012 wurde Retigabin wieder vom deutschen Markt zurückgezogen, nachdem es durch den Gemeinsamen Bundesausschuss keinen Zusatznutzen gegenüber Lamotrigin und Topiramat zugesprochen wurde³. Wegen Hinweisen auf Pigmentveränderungen der Haut und Netzhaut erfolgte 2017 der weltweite Marktrückzug⁴.

Funktionell unterscheidet sich Retigabin erheblich von klassischen Antikonvulsiva: Es wirkt nicht primär durch Hemmung von Na⁺- oder Ca²⁺-Kanälen oder Verstärkung der GABAergen Transmission, sondern durch allosterische Öffnung von Kv7 Kanälen (Kv7.2-5) (Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005). Da Kv7-Kanäle im Subschwellenbereich aktiv sind und einen Kaliumausstrom bewirken, hat Retigabin einen hyperpolarisierenden Effekt auf das Membranpotential und führt damit zur Verringerung neuronaler Exzitabilität (Rundfeldt & Netzer, 2000).

Die Retigabin-Bindungstasche liegt zwischen S5 und S6 mit zwei Schlüsselaminosäuren Tryptophan W236 und Glycin G301 (Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005). Im Gegensatz dazu hat Retigabin auf Kv7.1 keinen

³<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/2017-04/retigabin-geht-ende-juni-2017-weltweit-vom-markt/>, 15.11.2018.

Stand:

⁴https://www.bfarm.de/DE/Arzneimittel/Pharmakovigilanz/Risikoinformationen/Rote-Hand-Briefe_Informationsbriefe/_functions/RI_rhb_Filtersuche_Formular.html?resourceId=3495938&input_=3872330&pageLocale=de&oneOfTheseWords=retigabin&versionNr_str=&dateOfIssue_dt=&submit=Filtern, Stand: 15.11.2018.

bis sogar inhibitorischen Effekt, das größtenteils auf strukturelle Unterschiede in der Bindestelle mit fehlenden Schlüsselaminosäuren zurückzuführen ist.

Aktuell wird mit XEN1101 - einem nächsten Generationen Kv7.2/Kv7.3-Öffner mit erhöhter Kv7.2 und 7.3 Selektivität - eine Phase II/IIb Studie bei fokalen Epilepsien durchgeführt; erste Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion der Anfallshäufigkeit bei guter Verträglichkeit (French et al., 2023).

1.4 KCNQ assoziierte Erkrankungen

KCNQ Mutationen verursachen seltene, aber zum Teil schwerwiegende Pathologien (Jentsch et al., 2000, Lehman et al., 2017). Mutationen in *KCNQ1* wird mit dem kongenitalen *Long-QT-Syndrom* assoziiert, das mit einer hohen Prädisposition für Herzrhythmusstörungen wie ventrikuläre Tachykardien und Torsade de Pointes einhergeht. *KCNQ2* und *KCNQ3*-Mutationen verursachen u.a. selbst-limitierende benigne familiäre neonatale Anfälle (BFNS) (Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998). In 60-80% der betroffenen BFNS-Familien ist eine Mutation in *KCNQ2* nachweisbar (Singh et al., 2003) oder seltener in *KCNQ3* (Charlier et al., 1998; Singh et al., 2003).

Diese hereditär autosomal-dominant oder *de-novo* auftretende Erkrankung hat eine unvollständige Penetranz von ca. 80% (Plouin et al., 2012) und manifestiert sich typischerweise innerhalb der ersten Lebensstage in Form von fokalen tonisch/tonisch-klonischen epileptischen Anfällen und Apnoe und remittiert spontan nach Wochen bis Monaten (Ronen et al., 1993). Im EEG zeigen sich typischerweise keine spezifischen Muster. Die Prognose ist gut, jedoch können 10–15 % der Betroffenen im späteren Leben erneut Anfälle entwickeln (Miceli et al., 2010). Bei den bisher entdeckten BFNS-Mutationen in *KCNQ2* handelt es sich um verschiedenste Mutationen (*missense* Mutationen, Spleißstellenverschiebungen, *non-sense* Mutationen, Deletionen, Duplikationen oder Leserasterverschiebungen), die nicht an bestimmten Prädilektionsstellen auftreten, sondern über das ganze Gen verteilt sind (Millichap et al., 2016; Miceli et al., 2016). In *KCNQ3* wurden bis zur Erstellung dieser Arbeit im Zusammenhang mit BFNS ausschließlich *missense* Mutationen identifiziert

(Soldovieri et al., 2011). Die meisten *KCNQ2*-Mutationen im Rahmen von BFNS führen zu einem *Loss-of-function* mit Haploinsuffizienz (Nappi et al., 2024). Bereits eine Reduktion des M-Stroms um 25% reicht aus um BFNS auszulösen (Schroeder et al., 1998). Das neonatale Auftreten und die spontane Remission spiegelt die entwicklungsabhängige Reifung inhibitorischer Systeme wider: In der frühen postnatalen Phase hat GABA noch exzitatorische Wirkung und entwickelt erst im Verlauf inhibitorische Wirkung⁵, was mit der Reifung des K^+/Cl^- -Cotransporters (KCC2) zusammenhängt. Dieser bewirkt sekundär aktiv einen K^+ und Cl^- -Efflux. In der frühen postnatalen Phase ist dieser noch nicht ausreichend exprimiert und somit ist der Cl^- -Spiegel intrazellulär erhöht. Eine Aktivierung des GABA-A Rezeptors bewirkt somit in der frühen Postnatalphase einen Ausstrom (anstatt Einstrom wie in reifen Neuronen) von Cl^- -Ionen und damit eine Depolarisation (Dzahala et al., 2005). Somit ist in dieser frühen Phase des Lebens M-Strom einer der wichtigsten Ströme mit inhibitorischer Wirkung und ein mutationsbedingter Funktionsverlust resultiert in einer Übererregbarkeit von neuronalem Gewebe und einer erhöhten Anfallsanfälligkeit (Peters et al., 2005). Neben den selbstlimitierenden benignen familiären neonatalen Anfällen (BFNS) können *KCNQ2* und -3 Mutationen auch zu einem schwereren Krankheitsverlauf in Form der pharmakoresistenten, entwicklungsbedingten und epileptischen Enzephalopathie (*Developmental and epileptic encephalopathy* (DEE)) führen (Singh et al., 2003; Millichap and Cooper, 2012; Weckhuysen et al., 2012; Orhan et al., 2014). In ~50% der DEE konnte eine genetische Ursache identifiziert werden, wobei *KCNQ2* und -3 Mutationen den Hauptanteil ausmachen (Symonds et al., 2019). Typischerweise handelt es sich um *de-novo*-Mutationen oder autosomal-dominant vererbte Mosaik-Mutationen. Meist besteht ein *Loss-of-function* durch *missense* Mutationen oder *in-frame* Insertionen/Deletionen. Seltener wurden *Gain-of function* Mutationen identifiziert, die sich klinisch hinsichtlich eines meist späteren Manifestationsalters, einer Reichweite von milder bis schwerer kognitiver Einschränkung, z.T. fehlender neonataler Anfälle oder Auftreten nicht epileptischer Myoklonien unterscheiden (Miceli et al., 2015

⁵ MGZ München, <https://www.mgz-muenchen.de/erkrankungen/diagnose/benigne-familiaere-neonatale-und-infantile-epilepsie-bfne-bfnie-bfie.html>, Stand 8.11.2018

und 2022; Millichap et al., 2017; Dirx et al., 2020). DEE auslösende Mutationen konzentrieren sich in funktionell kritischen Regionen: im S4-Segment (VSD), Selektivitätsfilter und in den C-terminalen Calmodulin- und PIP₂-Bindungsdomänen (Millichap, 2016). Klinisch zeigen sich meist motorische mit teilweise vegetativen Komponenten und anschließender Apnoe. Im EEG sind *burst suppression* Muster oder multifokale epilepsietypische Potentiale ableitbar (Miceli, 2010/2018). Die Anfälle sind meist pharmakoresistent, lassen im Verlauf jedoch nach. Im MRT zeigen sich uni- oder bilateral Hyperintensitäten (T1, T2) im Thalamus und Basalganglien (Miceli, 2010/2018). Die Entwicklung der Kinder zeigt meist starke Entwicklungsverzögerung mit motorischer, sprachlicher und kognitiver Beeinträchtigung und meist schlechter Prognose.

Die Phänotyp-Schwere korreliert mit dem molekularen Mechanismus: während bei der milderer Form – der selbstlimitierenden BFNS - eine Haploinsuffizienz, d.h. eine partielle Kompensation der Funktionalität des Genprodukts durch ein wildtypisches Allel vorliegt, weisen DEEs typischerweise einen dominant negativen Effekt auf (Miceli et al., 2013; Orhan et al., 2014; Nappi et al., 2024). *KCNQ2* und -3 werden jedoch nicht nur im ZNS, sondern auch im PNS exprimiert. Mutationen können hier zu peripherer Nervenhyperexzitabilität (PNH) oder Myokymien führen (Dedek K et al, 2001; Wuttke et al., 2007).

Von *KCNQ4*-Mutationen ist die autosomal-dominante, progressive Schwerhörigkeit (DFNA2) bekannt (Kubisch et al., 1999). Für *KCNQ5*, ein hochkonserviertes Gen, das ein breites Expressionsmuster im Gehirn aufweist, aber auch im Skelettmuskel exprimiert wird (Lerche et al., 2000), wurde lange keine Erkrankung in Verbindung gebracht. Mittlerweile kennt man allerdings einige wenige *missense*-Mutationen in *KCNQ5*, die mit einer intellektuellen Beeinträchtigung und zum Teil pharmakoresistenter Epilepsie assoziiert sind (Lehman, 2017).

1.5 Epilepsie

Epilepsie ist eine Erkrankung des Gehirns mit Prädisposition für synchronisierte neuronale Entladungen mit klinisch subjektiver oder objektiver Manifestation.

Nach der S2k-Leitlinie 2023 (DGN/DGfE) wird eine Epilepsie diagnostiziert, wenn gilt: (1) mindestens zwei unprovizierte Anfälle im Abstand von > 24 h, oder (2) das Risiko eines erneuten unprovizierten Anfalls in den nächsten 10 Jahren über 60 % liegt (z.B. bei Epilepsietypischen Potentialen im EEG oder einem strukturellen epileptogenen Fokus im MRT) oder (3) ein Epilepsie-Syndrom vorliegt.

Abhängig, ob nur eine umschriebene Hirnregion oder neuronale Netzwerke, die über beide Großhirnhemisphären reichen, betroffen sind, führen die plötzlichen Potentialentladungen zu fokalen oder generalisierten Anfällen, deren Klinik je nach beteiligter Hirnregion von nicht-motorischen bis motorischen Symptome reicht. Die Unterscheidung in fokale vs. generalisierte Epilepsie ist therapeutisch bedeutsam, da manche Antikonvulsiva - etwa Carbamazepin oder Phenytoin – generalisierte Epilepsien verstärken können (Perucca, 1998).

Ein epileptischer Anfall kann als Teil einer Epilepsie auftreten, die genetische, strukturelle, infektiöse, metabolische oder immunologische Ursachen haben kann. Alternativ kann ein akut symptomatischer Anfall infolge einer vorübergehenden Senkung der Krampfschwelle auftreten, ohne dass eine Epilepsie vorliegt. Die Prävalenz eines einmaligen epileptischen Anfalls liegt bei 0,5%-1% der Allgemeinbevölkerung (Grehl, 2016).

Die medikamentöse Therapie von Epilepsien basierte bisher meist auf rein symptomatischer Therapie mit dem Ziel der Anfallsunterdrückung. Meist wirken Antikonvulsiva auf Ionenkanäle, senken die neuronale Erregbarkeit oder beeinflussen die Transmitterausschüttung. Trotz mehr als 30 verfügbarer Antiepileptika bleibt bei rund einem Drittel der Betroffenen eine Therapieresistenz bestehen. Modifikationen in Therapieansatz und -zielsetzung sind daher notwendig und zielgerichtete Therapien sind erforderlich. Ein Beispiel ist der direkte Kv7-Kanalöffner Retigabin (bzw. selektivere Nachfolgepräparate), welcher im Rahmen dieser Arbeit behandelt wird.

1.6 Klinisches Bild der Träger der *KCNQ2* G315R und R325G Mutation

Die hier untersuchten *KCNQ2* G315R und R325G *missense*-Mutationen wurden im Rahmen der multizentrischen Studie von Weckhuysen et al. (2013) identifiziert. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit sind lediglich jeweils ein Patient mit Mutation G315R bzw. R325G in *KCNQ2* beschrieben (Weckhuysen et al.; 2013). Bei beiden Mutationen handelt es sich um heterozygote *de-novo*-Mutationen im C-Terminus der Kv7.2-Untereinheit innerhalb der proximalen Calmodulin-Bindedomäne. Klinisch traten mehrfach tägliche tonische Anfälle bereits am ersten Lebenstag auf, häufig begleitet von Apnoe-Episoden, Sauerstoffsättigungsabfällen und Bradykardien. Letztere wurden von Weckhuysen et al. als wahrscheinlich reflektorisch im Sinne des Bezold-Jarisch-Reflexes, d.h. Minderung der Herzaktivität im Rahmen einer Hypoxie zum Schutz des Herzmuskels interpretiert und nicht als unmittelbare Folge der *KCNQ2*-Mutation. Alle Mutationsträger zeigten schwere neurokognitive Entwicklungsstörungen mit Defiziten in Motorik, Sprache und kognitiver Entwicklung – entsprechend dem klinischen Bild einer *KCNQ2*-assoziierten DEE. Der Patient mit G315R reagierte bezüglich der epileptischen Anfälle partiell auf Antikonvulsiva (Levetiracetam, Topiramat, Diazepam) und erreichte ab dem 10. Lebensmonat Anfallsfreiheit. Dagegen war beim R325G-Träger die Anfallsfrequenz trotz Therapie mit Phenytoin und Levetiracetam nur reduziert, eine vollständige Anfallsfreiheit wurde nicht erreicht (Weckhuysen et al., 2013).

1.7 Kv4.3-Kanäle und A-Strom

Kv4.3 Kanäle sind spannungsabhängige, schnell aktivierende und inaktivierende Kaliumkanäle. Sie vermitteln einen transienten auswärtsgleichrichtenden Kaliumstrom (A-Strom) mit einer Aktivierungsschwelle von etwa -30 mV (Franqueza et al., 1999; Gutman et al., 2005). Kv4.3-Ströme tragen wesentlich zur Repolarisation und Frequenzadaptation neuronaler Aktionspotentiale bei (Tsaour et al., 1997) und spielen zudem eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Kleinhirns (Hsu et al., 2003; Oberdick et al., 1998). Im humanen Genom ist

KCND3 auf Chromosom 1 lokalisiert und ist ein homologes Gen zu *Shal*. Es existieren zwei Isoformen von Kv4.3, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die längere Isoform (um 19 Aminosäuren verlängert) wird überwiegend im Herz exprimiert (Dilks et al., 1999). Im Zentralnervensystem werden beide Isoformen vorwiegend in den dendritischen Kompartimenten von Pyramidenzellen und im Hippocampus exprimiert (Hille, 2001).

Bisher sind *KCND3*-Mutationen hauptsächlich mit Assoziation zu kardialen Erkrankungen publiziert. Während ein *Loss-of-function* Vorhofflimmern (Ji Q, et al., 2013), kardiale Hypertrophie und Myokardinfarkte (Rossow et al., 2004) verursachen kann, ist eine *Gain-of-function* Mutation mit beschleunigter Repolarisation im Rahmen des Brugada Syndroms bekannt (Giudicessi et al., 2011).

Im Jahr 2012 wurde erstmals eine Verbindung zwischen *KCND3*-Mutationen und der Spinocerebellären Ataxie Typ 19/22 (SCA19/22) beschrieben (Lee et al., 2012; Duarri et al., 2012).

Kv4.3 weist den typischen Aufbau spannungsabhängiger Kaliumkanäle auf (siehe Kapitel 1.3). Die Tetramerisierung erfolgt über die T1 Domäne des N-Terminus. Kv4.3-Untereinheiten bilden homo- oder heteromere Kanäle mit anderen Kv4-Familienmitgliedern. Die Kanaleigenschaften werden durch auxiliäre regulatorische Proteine wie beispielsweise des Kv-channel-interacting protein 2 (KChIP) moduliert, das Auswirkungen auf die Expression, Membranlokalisation und Inaktivierungskinetik hat (Chabala et al., 1993; Serodio et al., 1994; Wang et al., 2007).

Bisher sind nur wenige *KCND3*-Mutationen im Zusammenhang mit einer Spinocerebellären Ataxie 19/22 bekannt. Zum Zeitpunkt der Arbeit sind zehn Familien mit entsprechenden Varianten beschrieben (Duarri et al., 2012; Lee et al., 2012; Duarri et al., 2013). Die untersuchte Deletion F227~~del~~ wurde von Lee et al. im Jahr 2012 identifiziert. Sie liegt im Segment 2 und ist Teil des Spannungssensors (S1-S4).

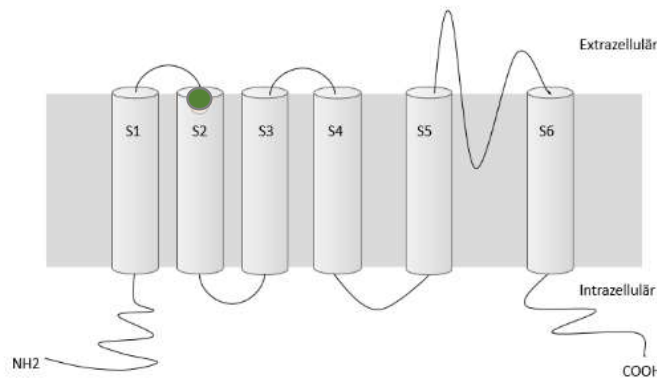


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Kv4.3 Untereinheit mit Markierung der hier untersuchten Deletion F227del in S2 (grün)

Die Zylinder stellen die sechs transmembranären α -Helices dar, S1-S4 bilden den Spannungssensor, S5 bis S6 mit P-Loop bilden die porenbildende Domäne. C- und N-Terminus liegen intrazellulär.

1.8 Spinocerebelläre Ataxie

Spinocerebelläre Ataxien (SCA) bilden eine heterogene Gruppe neurodegenerativer, autosomal-dominant vererbter Erkrankungen, die zu einer progredienten Degeneration und Dysfunktion des Kleinhirns führen. Klinisch dominieren eine Ataxie, Tremor und Dystonie (Jacobi, 2015).

Während bei manchen Formen der SCA die Kleinhirndegeneration führend ist, zeichnen sich andere SCA-Formen zusätzlich durch außerhalb des Kleinhirns liegende Pathologien aus (Hirnstamm, Rückenmark, Retina oder peripheres Nervensystem; Taroni et al., 2004). Spät beginnende Ataxien sind oft erworben, z.B. toxisch oder metabolisch. Ein symmetrischer, langsam progredienter Verlauf mit positiver Familienanamnese spricht dagegen für eine genetisch bedingte Form mit autosomal-dominantem Erbgang. Weitaus häufiger als die SCA ist jedoch die Friedreich-Ataxie mit demgegenüber autosomal-rezessivem Erbgang und in der Regel fehlender positiver Familienanamnese.

Bislang wurden für 32 SCA-Formen chromosomale Genloci beschrieben und 20 auslösende Gene identifiziert (Klockgether et al., 2011; Soong et al., 2007). Die Nummerierung (SCA1–SCA32) erfolgt chronologisch nach Entdeckung.

Nach Paulson (2009) lassen sich SCAs in drei pathogenetische Hauptgruppen einteilen: (1) CAG-*Triplett-Repeat*-Expansionen im codierenden Bereich, (2) intronische Triplett-Repeat-Expansionen und (3) klassische Punkt- oder Strukturmutationen (*missense*, Deletionen, Insertionen, Duplikationen).

1) Die häufigste genetische Ursache der autosomal-dominant vererbten SCAs ist die CAG-*Triplett-Repeat* Expansionen, die im Genprodukt zu einer Poly-Glutaminserie führt und Antizipation zeigt. Trotz gemeinsamem Mechanismus (CAG-Expansion) innerhalb dieser Gruppe sind unterschiedlichste Gene von der Expansion betroffen, die bisher kaum miteinander in Verbindung gebracht werden konnten. Eine Theorie ist eine durch die Poly-Glutaminserie veränderte Proteinfaltung und Aggregation, wobei es auch Hinweise gibt, dass eine Aggregation nicht der krankheitsverursachende Mechanismus sein muss. Nicht in allen *Triplett-Repeat* befallenen Neuronen fanden sich Proteineinschlüsse und einige Studien weisen darauf hin, dass die Aggregate eher einen protektiven Effekt auf die betroffenen Neurone zeigen als den Zelltod bewirken. Eine Vermutung ist, dass die abnormal gefalteten Proteine Interaktionen mit beispielsweise Transkriptionsfaktoren eingehen und somit die Transkription wichtiger Gene verändern (Paulson, 2009).

2) Eine zweite Gruppe entsteht durch intronische Triplett-Repeats. Der Pathomechanismus ist bisher nicht vollständig verstanden (Dick et al., 2006).

3) Eine dritte Gruppe der SCAs beruht auf klassischen Mutationen (*missense*, Deletionen, Duplikationen). Die betroffenen Gene teilen keinen gemeinsamen Signalweg, sondern beeinflussen unterschiedliche zelluläre Prozesse. So wurde beispielsweise eine Mutation in β -Spektrin, einem cytoskelettalen Protein, als Ursache für SCA5 entdeckt oder eine Deletion im Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor 1-Gen für SCA15 (Waters et al., 2006).

1.8.1 Spinocerebelläre Ataxie 19 / 22

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 19 (SCA19) ist eine seltene, milde Form der autosomal-dominanten Ataxie, die sich typischerweise zwischen dem 2. und 5. Lebensjahrzehnt manifestiert. Klinisch zeigen sich Gangataxie, Dysarthrie und

variable kognitive Einschränkungen. Die Prognose gilt als günstig und in der Regel nicht lebensverkürzend.

Der Genlocus von SCA19 liegt auf Chromosom 1p21–q21 und überlappt mit demjenigen von SCA22, das durch Mutationen im selben Gen (*KCND3*) verursacht wird, jedoch meist ein späteres Manifestationsalter (3.–5. Lebensjahrzehnt) zeigt (Lee et al., 2012; Duarri et al., 2012). In einer multizentrischen Studie von Lee et al. (2012) wurden bei mehreren ethnisch unterschiedlichen Familien mit autosomal-dominanter SCA19/22 *missense*-Mutationen sowie in zwei Familien eine *in-frame* Deletion (*F227del*) im *KCND3*-Gen identifiziert, das für den Kv4.3-Kanal kodiert, welcher A-Strom leitet. Sowohl die Deletion als auch die *missense*-Mutationen führten zu einem kompletten *Loss-of-function* des Genprodukts. Im Falle von *F227del* konnte durch Immunofluoreszenz nachgewiesen werden, dass die Dysfunktion auf einem Defekt im Trafficking mit Nichteinbau in der Plasmamembran basiert (Lee, 2012).

1.8.2 Klinik der *KCND3* Mutation *F227del*

Bei der in dieser Arbeit funktionell untersuchten *KCND3* Mutation *F227del* handelt es sich um eine *de-novo*-Mutation. Klinisch fand sich laut Synozik eine Ataxie, eine intermittierend auftretende Dystonie sowie eine hemiplegische Migräne.

1.9 Heterologes *Xenopus laevis* Expressionssystem

Oocyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* stellen seit den Arbeiten von Gurdon et al. (1971) ein etabliertes heterologes Expressionssystem dar. Nach Injektion exogener cRNA exprimieren unreife Oocyten funktionelle Proteine und ermöglichen – ähnlich anderen eukaryotischen Systemen wie Hefe – posttranslationale Modifikationen sowie den korrekten Einbau von Membranproteinen in die Plasmamembran (Kusano et al., 1977). Aufgrund ihrer großen Zellgröße (~1 mm) lassen sich *Xenopus*-Oocyten leicht mikroinjizieren. Zudem besitzen sie nur eine geringe Expression endogener Ionenkanäle, das sie

besonders geeignet für die funktionelle Charakterisierung exogen exprimierter Ionenkanäle und Rezeptoren macht (Miledi & Sumikawa, 1982).

1.10 Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp (TEVC)

Die TEVC-Technik erlaubt es, an einer intakten Zelle ein definiertes Membranpotential zu halten („clampen“) und dabei die resultierenden Ionenströme über die gesamte Zellmembran zu messen. (Sobczak et al., 2009). Als Standardpräparat haben sich Oocyten von *Xenopus laevis* etabliert. Ihr großer Durchmesser (~ 1 mm) ermöglicht die Einführung zweier Mikroelektroden – eine zur Spannungsmessung und eine zur Stromeinspeisung – und damit eine stabile Spannungskontrolle über die gesamte Membran. Sie exprimieren zwar selbst Transportproteine, aber da sie eine „promiske“ (Sobczak et al, 2009) exogene Proteinexpression aufweisen, lässt sich mit *Xenopus laevis* Oocyten von fast jeder injizierten cRNA oder cDNA eine Überexpression fremder Genprodukte erzeugen mit insgesamt geringer Hintergrundaktivität.

Mit der TEVC-Methode lassen sich Strom-Spannungs-Beziehungen spezifischer Ionenkanäle quantifizieren und pharmakologische Effekte (z. B. Kanalblocker / -aktivatoren) präzise untersuchen. Für die Messung befindet sich die Oocyte in einer ND96-Lösung. Kennzeichen des Durchtritts der Elektroden durch die Plasmamembran ist die Senkung des Potentials auf das Niveau des Ruhemembranpotentials. Wie in Abb.5 dargestellt sind die Elektroden Glaskapillare, gefüllt mit einer Kaliumchloridlösung und einem chlorierten Silberdraht (Ag/AgCl), der mit einem Verstärker verbunden ist. Die Elektrode U' misst das Membranpotential, verstärkt durch einen Rückkopplungsverstärker (*Feedback Amplifier*, FBA) und vergleicht es mit dem Sollwert. Über die Elektrode I' wird der Strom, der zur Aufrechterhaltung des gewünschten Membranpotentials nötig ist, injiziert. Die nötige Stromstärke zur Aufrechterhaltung des bestimmten Membranpotential ändert sich durch Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen. Um das gewünschte Klemmpotential an der Zellmembran aufrecht zu erhalten, wird über die Elektrode I' der dafür erforderliche Strom appliziert. I' entspricht somit dem transmembranen Strom (siehe Abb.5).

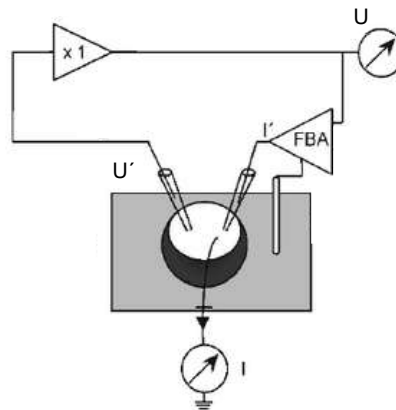


Abbildung 5: Schemadarstellung einer Zwei-Elektroden Voltage Clamp Technik (TEVC). Über die Elektrode U' wird das Membranpotential U der Oocyte gemessen, die mit einem Rückkopplungsverstärker (FBA *Feedback amplifier*) verbunden ist und die den Potential-Istwert mit dem Sollwert vergleicht. Um das gewünschte Klemmpotential an der Zellmembran aufrecht zu erhalten, wird über die Elektrode I' der dafür erforderliche Strom appliziert. I' entspricht dem transmembranen Strom.

Modifiziert nach Wagner et.al., 2000

1.11 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war

- die funktionelle Untersuchung der zwei Punktmutationen in *KCNQ2* G315R und R325G, identifiziert bei zwei Betroffenen mit DEE, mittels TEVC in *Xenopus laevis*-Oocyten.
- die Untersuchung der Wirkung von Retigabin auf G315R und R325G.
- die funktionelle Analyse der *de-novo* *KCND3* Deletion F227del.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Ausstattung

37°C Inkubator	B5028	Heraeus
Agarose Gelkammer	Gel Electrophoresis Systems	Owl Separation Systems
Zentrifuge für Maxipreparation	Heraeus MULTIFUGE X1R Centrifuge	ThermoScientific
Zentrifuge für Minipreparation	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge für RNA/DNA	MIKRO200R	Hettich Zentrifugen
Wasserfiltersystem	Biopak	Millipore
NanoDrop	ND-1000	peqLab
Oocyten Injektionssystem	Roboinject	Multi Channel Systems
Oocyten Messsystem	Roboocyte	Multi Channel Systems
PCR Thermocycler	MJ Mini Personal Thermal Cyclers	BIO RAD
Pipetten	Research	Eppendorf
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Wasserbad	1083	GFL

2.1.2 Verbrauchsmaterial

1,5 ml Tubes	Sarstedt
15 ml Tubes	Sarstedt
50ml Tubes	Sarstedt
96 well Plate	Nunc
Filterspitzen	Biosphere
Injektionsnadeln	Multi Channel Systems
Messköpfe	Multi Channel Systems
PCR Tubes	Sarstedt
Petrischalen	Greiner bio-one
Phase Lock Gel	5Prime
Pipettenspitzen	Eppendorf
Plastikpipetten	Costar

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich (Deisendorf), Roth (Karlsruhe), Invitrogen, Roche (Mannheim), Gibco, Thermo Fisher (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), AppliChem, Biochrom, VWR, Finnzymes, Ampuva, und Bio-Rad und Stratagene (La Jolla, CA).

2.1.4 Kits

Genopure Plasmid Maxi Kit	Roche
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
High Pure Plasmid Isolation Kit for mini prep	Roche
QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SP6 mMessage	Ambition

2.1.5 Enzyme

Enzyme, Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer wurden vom jeweiligen Hersteller verwendet.

Collagenase	Biochrom, Berlin
Dpn I	Thermo Fisher
Mlu I	ThermoFisher
Pac I	ThermoFisher
Pfu Polymerase	Stratagene
Phusion	Thermo Fisher
RNase Inhibitor	Roche
Sp6 RNA Polymerase	Thermo Fisher
T7	Thermo Fisher
Nucleosid Triphosphat	Roche
T4-DNA Ligase	Thermo Fisher

2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit voll entsalztem (VE) Wasser hergestellt und teilweise autoklaviert (LB-Medium, LB-Medium für LB-Platten).

OR2 solution: Ca²⁺ frei, pH 7,6:

NaCl	82,5 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	1,0 mM
HEPES	5,0 mM

Barth's Solution (pH 7,4):

NaCl	88 mM
NaHCO ₃	2,4 mM
KCl	1 mM
CaCl ₂	0,41 mM
MgSO ₄	0,82 mM
Tris HCl	5,0 mM

ND96 10fach Lösung (pH 7,5):

NaCl	93,5 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	2 mM
Hepes	5 mM

Pipetten Lösung Roboocyte 2 (pH 7,2):

KCl	1 M
Kac	1,5 M

LB-Medium:

Hefe 5 g/l , Trypton 10 g/l, NaCl 10 g/l

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l

LB-Platten: LB-Medium, 1.5 % Agar (w/v), 50 - 100 µg/ml Antibiotika

LB-Medium	
Agar	1,5% (w/v)
Antibiotika	50-100 µg/ml

2.1.7 Bakterienstämme

Es wurden Abkömmlinge von One Shot Top 10 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen) verwendet.

2.1.8 Vektoren

Für die Expression von *KCNQ2* wurde der Vektor pTLN verwendet. Dieser Expressionsvektor für *Xenopus laevis*-Oozyten ist eine Abwandlung von pSP64T (Krieg & Melton, 1984). Er enthält zusätzlich einen SP6-RNA-Polymerase-Promotor, ein Ampicillinresistenzgen sowie eine 5'- und 3'-UTR des *Xenopus*- β -Globin-Gens, was eine erhöhte Expression ermöglicht. Downstream der 3'-UTR wurden zusätzliche Restriktionsstellen zur Linearisierung eingefügt (Lorenz et al., 1996; Dedek, 2003).

Der für die heterologe Expression von *KCND3* verwendete pSGEM-Vektor ist ebenfalls ein Expressionsvektor. Er stellt eine Modifikation des pGEMHE-Vektors dar, dessen open reading frame von der 5'- und 3'-UTR des *Xenopus*- β -Globin-Gens flankiert wird (Hollmann, 1994). pSGEM enthält sowohl einen SP6- als auch einen T7-Promotor sowie ein Ampicillinresistenzgen.

2.1.9 Primer

Die Primer wurden von Thermo Fisher Scientific (Ulm) bezogen.

Primer	Sequenz	Anwendung
KCNQ2_G315R-F	5'-GCATCTTGGGATCCCGGTTTGCCCTGAAG-3'	Mutagenese
KCNQ2_G315R-R	5'-CTTCAGGGCAAACCGGGATCCCAAGATGC-3'	Mutagenese
KCNQ2_R207Q-F	5'-TGCAGATTCTGCAGATGATCCGCATGGA-3'	Sequenzierung
KCNQ2_G315R-F	5'-GCATCTTGGGATCCCGGTTTGCCCTGAAG-3'	Sequenzierung
KCNQ2_R532W	5'-TGCGCTTCCTGAAGGTTCTGCGGATGATC-3'	Sequenzierung
KCND3_227del-F	5'-GTGGCCTTCTGCCTGGACA-3'	Mutagenese
KCND3_227del-R	5'-GTGTCCAGGCAGAAGGCCAC-3'	Mutagenese
T7 -F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sequenzierung

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Agarosegele werden standardmäßig zur Auftrennung, Identifikation und Reinigung von Nukleinsäuren verwendet. Für die Analyse der DNA mit einer Molekülgröße von etwa 2,6 kb (bei *KCNQ2* und *KCND3*) wurde ein 1 %-iges Agarosegel eingesetzt. Dafür wurde 1,2g Agarose in 120ml 1x TBE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurde 7µl Red Safe (iNtRon, Biotechnology), ein DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, hinzugegeben. Vor dem Beladen des Gels wurde zu den DNA--Proben Orange-G im Verhältnis 2:1 zugegeben, welches Glycerin enthält. Dies erleichtert das Beladen der Probe und zeigt ein ähnliches Laufverhalten wie ein 50bp DNA-Molekül, womit gleichzeitig die Lauffront des Gels sichtbar gemacht werden kann. Als Größenstandard diente eine 10kB DNA-Leiter (1% TopVisor). Die Elektrophorese erfolgte in 1× TBE-Puffer bei einer Feldstärke von 10 V/cm über etwa 1,5 h.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekulargenetische Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert dabei anhand einer einzelsträngigen DNA-Matrize, ausgehend von einem Oligonukleotid-Primer, den komplementären Strang in 5'-3'-Richtung. In dieser Arbeit wurde die PCR zur gezielten Mutagenese eingesetzt, wobei Primer verwendet wurden, die die gewünschte Mutation enthielten (Mutagenese-Primer). Der PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, gefolgt von der Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen der Template-DNA. Anschließend erfolgt die Strangverlängerung durch die thermostabile DNA-Polymerase. Häufig wird hierfür die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, die jedoch keine Proofreading-Funktion besitzt. Die hier eingesetzte Pfu-Polymerase (aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) sowie die Phusion-Polymerase (ein

Pyrococcus-ähnliches Enzym) verfügen über eine 3'–5'-Exonukleaseaktivität und weisen daher eine deutlich geringere Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden auf.

2.2.3 Zielgerichtete Mutagenese

Die 1982 von Zoller und Smith entwickelte zielgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) basiert auf der Verwendung synthetischer Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten (siehe Kapitel 2.2.2 Polymerasekettenreaktion). In dieser Arbeit wurde die *site-directed mutagenesis* mit dem QuickChange PCR Mutagenese-Kit (Stratagene) durchgeführt.

Die komplementären Mutagenese-Primer (*forward*- und *revers*) enthielten die gewünschte Mutation. Die Amplifikation der DNA erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Pfu- oder Phusion-Polymerase. Anschließend wurde das PCR-Produkt durch einen DpnI-Verdau von der DNA-Matrize selektioniert.

DpnI ist eine Endonuklease mit der Erkennungssequenz 5'-Gm⁶ATC-3' und besitzt die Eigenschaft ausschließlich methylierte oder hemimethylierte DNA zu spalten, nicht jedoch unmethylierte DNA. Da der hier verwendete Bakterienstamm ein Methylierungssystem (*dam*⁺) aufweist, sind Plasmide – im Gegensatz zu den PCR-Produkten – in der Regel methyliert. Folglich wird durch DpnI nur die wildtypische, methylierte DNA-Matrize verdaut, während die neu synthetisierte, mutierte und nicht methylierte DNA unverdaut bleibt.

<u>PCR Protokoll KCNQ2 und KCNQ3</u>	
Primer fw (10µM)	0.5 µl
Primer rev(10µM)	0.5 µl
dNTPs (10mM)	0.5 µl
DNA Template (50ng/µl)	1µl
Pfu Reaction buffer (10X)	2.5µl
Betaine	5µl
Pfu DNA Polymerase	0.5µl
H ₂ O	14.5 µl
Total	25 µl

<u>PCR Protokoll KCND3</u>	
Primer fw (10µM)	0.8 µl
Primer rev(10µM)	0.8 µl
dNTPs (10mM)	0.6 µl
DNA Template (50ng/µl)	0,75 µl
5x HF Phusion buffer	5µl
DMSO	0,4 µl
Phusion Polymerase	0.2 µl
H ₂ O	11.45µl
Total	20 µl

Da bei der zunächst gewählten Annealing-Temperatur von 55 °C aufgrund unspezifischer Primeranlagerungen zusätzliche, unerwünschte Mutationen auftraten, wurde ein Temperaturgradient eingesetzt, um die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen – also jene Temperatur, die eine spezifische Primeranlagerung an die komplementäre Matrizen-DNA ermöglicht und unspezifische Bindungen verhindert. Das ermittelte Temperaturoptimum lag bei 58 °C. Für *KCNQ2* und *KCNQ3* wurde eine vergleichsweise lange Elongationsdauer gewählt, da die Pfu-Polymerase lediglich eine Synthesegeschwindigkeit von etwa 500 bp/min aufweist.

PCR Programm *KCNQ2*:

1. Denaturierung	95°C	50 sec	} 17 x Zyklen
2. Denaturierung	95°C	50 sec	
3. Hybridisierung	58°C	50 sec	
4. Elongation	72°	16 min	
5. Elongation	72°	7 min	
6. Kühlung	4°	über Nacht	

PCR Protokoll *KCND3*:

7. Denaturierung	95°C	10 min	} 19 x Zyklen
8. Denaturierung	95°C	30 sec	
9. Hybridisierung	58°C	30 sec	
10. Elongation	72°	3:30 min	

11. Elongation	72°	10 min
12. Kühlung	4°	über Nacht

Zur Beurteilung von Bandengröße und Qualität des Reaktionsprodukts wurden 1-5 µl der Proben in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4 Aufreinigung

Das PCR-Produkt wurde durch das High Pure PCR Product Purification Kit aufgereinigt, um verbliebene Enzyme, Pufferbestandteile und Primer zu entfernen.

2.2.5 DpnI-Verdau der DNA-Matrize

Die aufgereinigten Proben wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, in dem der DpnI-Verdau der methylierten elterlichen DNA durchgeführt wurde. Dazu wurden 16 µl des Reaktionsansatzes mit 1 µl der Endonuklease DpnI versetzt und 2 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert.

2.2.6 Ligation

Die Ligation des PCR-Produkts erfolgte mit der T4-DNA-Ligase. Zu 1–5 µl des verdauten Mutageneseprodukts wurden 2 µl 5× Ligationspuffer gegeben und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 0,5 µl T4-Ligase hinzugefügt, die Probe vorsichtig geschüttelt, kurz zentrifugiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gestellt.

2.2.7 Herstellung kompetenter Zellen (Calciumchlorid-Methode)

Die Idee bei der Herstellung chemisch kompetenter Zellen ist, dass Ca²⁺-Ionen Poren in der Zellmembran bilden, die Durchlässigkeit der Zellmembran dadurch erhöht wird und nach einem Auslöser wie ein Hitzeschock oder Elektroporation

durch die Maskierung der negativen Ladung von DNA den Übertritt von Fremd-DNA über die Zellmembran erleichtert.

Zur Herstellung kompetenter Zellen werden 2 ml LB-Medium mit Top10 *E.coli* Stocklösung beimpft, die bei -80°C gelagert wurden, und in einer Übernachtskultur bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit 300 µl dieser Übernachtskultur wurde ein größeres Volumen an Antibiotika freiem LB-Medium (50 ml) beimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₅₉₅ von 0,5-0,6 inkubiert. Hier hat das bakterielle Wachstum seine stationäre Phase erreicht, eine weitere Inkubation würde eine geringere Kompetenz der *E.colis* bewirken. Daraufhin wurde die Kultur 15 min auf Eis abgekühlt und für 8 min zentrifugiert (4000rpm bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20ml, 100 mMolarer eiskalter CaCl₂ Lösung resuspendiert und eine Stunde inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, mit 1,5 ml Calciumchlorid gelöst und 0,5ml 50% Glycerol hinzugefügt und gut gemischt. Die Lagerung von 50 µl Aliquots kompetenter Zellen erfolgte bei -80°C.

2.2.8 Transformation

Für die Transformation wurden 50 µl der chemisch kompetenten *E.colis* (Top10) und 2µl der zu transformierenden DNA auf Eis gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. In diesem Schritt wird die DNA in die Bakterien eingeschleust. Die Effizienz der DNA-Aufnahme wurde durch einen 30 sec Hitzeschock bei 42°C im Wärmeblock ohne Schütteln erhöht. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz für 2min erneut auf Eis gestellt. 250 µl des SOC-Mediums, einem bakteriellen Nährmedium mit geringem Salzgehalt, wurde zugegeben, bei 37°C eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert (300rpm) und die Bakterien danach auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Die Plasmide pTLN und pSGEM besitzen als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen, weshalb beide Kulturansätze auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert wurden. Um separierte Kolonien zu erhalten wurden zwei verschiedene Volumina der Bakterienkultur ausplattiert - einmal 20 µl und einmal 80 µl. Nach 12-24 Stunden Inkubation wurde mit einzelnen Kolonien LB_{Amp} für

eine Übernachtskultur angeimpft, aus denen eine Kryokultur sowie eine Plasmidpräparation gemacht werden konnte. Um sicher zu gehen, dass das Plasmid ausschließlich die gewünschte Mutation enthielt, wurden Sequenzierungen durchgeführt.

2.2.9 Kryokultur

Zur Herstellung von Kryokulturen aus transformierten Bakterien wurde ein Glycerin-Stock angelegt. 0,5ml der Übernachtskultur wurden mit 0,5 ml Glycerol (80%) aufgeschichtet, durch Invertieren gut gemischt und sofort bei -80°C eingefroren. Wurden die transformierten Bakterien erneut benötigt, konnte mit einer sterilen Pipette erneut Kulturmedium beimpft werden.

2.2.10 DNA-Isolation aus Bakterien

Mithilfe der Kits (Miniprep: High Pure Plasmid Isolation Kits, Roche bzw. für Maxiprep: Genopure Maxi Kit, Roche) wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden chromatographischen Aufreinigung der Plasmid-DNA über Zentrifugationssäulen mit einer Silikamembranbeschichtung, gewonnen. Für die Gewinnung kleiner DNA-Mengen wurde eine Minipräparation nach Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt. Nach Sicherstellung durch Sequenzierung, dass die Mutagenese erfolgreich war und keine weiteren unerwünschten Mutationen entstanden sind, folgte die Gewinnung größerer Mengen an DNA durch eine Maxiprep. Die Ausbeute an gewonnener DNA ist abhängig von der Plasmidgröße, Kopienzahl und von den transformierten Bakterien. Bei beiden Plasmiden handelte es sich um *high copy* Plasmide.

2.2.11 Miniprep

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits (Roche). Mit einzelnen Kolonien wurden 5-8ml LB- Medium mit dem Zusatz des Selektionsantibiotikums Ampicillin (1:500) angeimpft. Nach einer Inkubation

von 12-14 Stunden (37°C, Schüttler: 200rpm) wurden von der Übernachtskultur jeweils 0,5 ml für die Langzeitaufbewahrung im Glycerinstock entnommen. Die restliche Bakterienkultur wurde 5min zentrifugiert (6000 x g, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in der RNase beinhaltenden Resuspensionslösung (bestehend aus Glucose/Tris/EDTA) resuspendiert. Dann wurden 250 µl Lyse Puffer (NaOH und SDS) hinzugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. In diesem Schritt wurden die Bakterien lysiert und die Lösung wurde viskös und klar. 350 µl vom Neutralisierungspuffer (Kaliumacetat pH 5,2) wurden hinzugegeben, erneut nur vorsichtig gemischt, wobei Kalium-SDS Flocken ausfielen. Die Zellbruchstücke, chromosomale DNA und Kalium-SDS-Flocken wurden abzentrifugiert (10 min, 13000 x g, RT), wogegen die freigesetzte extrachromosomale Plasmid-DNA sich im Überstand befand. Dieser wurde über das Silica-Säulchen des Kits gegeben, und die Plasmid-DNA band unter Hochsalzbedingungen an die Silikamembran. In zwei Waschschritten mit ethanolhaltigem Puffer mit anschließender Zentrifugation (1min, 13000 x g, RT) wurden die Säulen von Proteinen, Salzen und evtl. Zelltrümmern gereinigt und der Durchfluss verworfen. Das Silica-Säulchen wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß platziert und die Plasmid-DNA in Niedrigsalzmilieu eluiert. Dazu wurden 50 µl Elutionspuffer über die Säule gegeben, 2 min inkubiert, und die gewünschte DNA durch anschließende Zentrifugation eluiert.

2.2.12 Plasmid Maxi Präparation

Für die Maxi Präparation wurde das Genopure Maxi Kit (Roche) verwendet, das die gleichen Schritte wie die Mini Prep beinhaltet, lediglich gemäß der Herstelleranleitung größere Volumina zwischen 30-150 ml Bakterienkultur verwendet.

2.2.13 Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch mittels eines Spektrophotometers (NanoDrop 1.0) bei der Wellenlänge von 260nm gemessen. Als Blank diente 1µl ddH₂O, als Probe 1µl jedes aufgereinigten PCR-Produkts.

Mit dem Quotienten der Absorptionswerte von 260 nm und 280 nm wurde die Reinheit der Nukleinsäure ermittelt. Dieser Quotient sollte bei reiner DNA-Lösungen bei ca. 1,8 liegen, bei reinen RNA-Lösungen bei 2,0. Die Größe der Nukleinsäure wurde durch eine Agarose Gelelektrophorese überprüft. Liegt der Quotient deutlich unter dem Sollquotient, deutet es auf eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenol hin.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde durch GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt. Probenvoraussetzung war ein Volumen von 10 µl mit 5µl DNA mit der Konzentration von 100 ng/µl und 5µl Sequenzierungsprimer mit der Konzentration von 5pmol/µl. Verdünnt wurden die Proben mit *Ampuwa* H₂O.

2.2.15 DNA-Linearisierung und Nukleinsäuren Reinigung

Vor der *in vitro* Transkription wurde die DNA, die sich auf dem zirkulären Vektor befand, linearisiert, um eine Transkription über das 3'-Ende der gewünschten Sequenz hinaus zu vermeiden. Mit einem Restriktionsenzym, das eine Schnittstelle hinter dem *Open reading frame* besitzt, wurde der Vektor geschnitten. Für pTLN wurde Mlu1 und für KCND3 PacI verwendet. Zu 10µg DNA wurden je 2 µl Restriktionsenzym und 5 µl 10x Puffer (passend zum verwendeten Enzym) hinzugegeben. Die Proben wurden mit H₂O bis zum Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und zwei Stunden bei 37°C verdaut.

Nach dem Verdau folgte die Nukleinsäuren Reinigung durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Phenol bildet leicht Wasserstoffbrücken aus, kann aber auch hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten eingehen. Es ist deshalb ein gutes Mittel um die DNA von Verunreinigungen, meist durch Proteine, zu trennen und Protein-Nukleinsäuren-Komplexe zu dissoziieren. Die Proteine sammeln sich in der Phenolphase an, oder wenn denaturiert in der Interphase. Allerdings muss dazu das Phenol mit Pufferlösung auf einen pH von 7,8 äquibriert sein, da sich ansonsten auch die DNA darin löst. Chloroform denaturiert Proteine, was eine Phasentrennung verschärft, ebenso der

zugegebene Isoamylalkohol, der starkes Schäumen und Verwischen der Phasengrenze verhindert. Die DNA-Fällung basiert auf einer Alkoholpräzipitation. Es wurden zu den linearisierten Proben 100 µl H₂O und 150 µl Phenol/Chloroform dazugegeben und gemischt, 2min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Der wässrige Überstand, in dem sich die DNA befindet, wurde ohne die Interphase zu berühren in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert. Dann wurde zu der wässrigen Phase 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol gegeben, gemischt und wieder abzentrifugiert. Die DNA befand sich wieder in der wässrigen oberen Phase. Diese wurde in ein anderes Gefäß überführt und 10 µl Ammoniumacetat und 300 µl 100% Ethanol dazugegeben, erneut abzentrifugiert und 60 min bei -80°C inkubiert. Die ausgefallene DNA wird abzentrifugiert (15-60 min bei 12000 rpm, 4°C) und befand sich im Pellet. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Ethanol wurde durch eine letzte Zentrifugation (15min bei 12000 rpm, 4°C) und anschließende Lufttrocknung entfernt. Die DNA wurde mit 10 µl DEPC Wasser aufgenommen und elektrophoretisch auf Größe und Menge überprüft.

2.2.16 RNA-Synthese

Das zu transkribierende Insert befand sich im Fall *KCNQ2* und -3 in einem pTLN-Vektor und im Fall von *KCND3* auf einem pSGEM-Vektor, die vor der *in vitro* Transkription linearisiert wurden. Die Wahl der RNA-Polymerase hängt vom jeweiligen RNA-Promotor ab. pTLN besitzt einen SP6 Promotor, pSGEM einen SP6 und T7-Promotor.

Für die *in vitro* Transkription wurden auf Eis:

2 µl der linearisierten DNA

16 µl DEPC H₂O

2,5 µl 10x Puffer (je nach RNA Polymerase)

1 µl rNTPs

2,5 µl Cap-Analogon

1 µl RNase Inhibitor gemischt und

1 µl RNA-Polymerase (Sp6 Polymerase für *KCNQ2* und -3 bzw. T7 Polymerase für *KCND3*) hinzugegeben.

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C unter Schütteln für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde das Transkriptionsprodukt durch Zugabe von 1 µl rekombinanter DNase I von DNA gereinigt (Roche, Inkubation für 15 min bei 37°C unter Schütteln). DNase I hydrolysiert DNA, lässt RNA aber intakt. Für die Nukleinsäuren Aufreinigung wurde das Reaktionsgemisch mit 100 µl DEPC H₂O verdünnt und zusammen mit 125 µl Phenol/Chloroform auf ein Phase Lock Gel pipettiert, invertiert und abzentrifugiert (5min, 14000 rpm). Denaturierte Proteine und hydrolysierte DNA befanden sich wie in der Nukleinsäuren Reinigung bei der Linearisierung in der Interphase, die RNA im wässrigen Überstand. Dieser wurde abpipettiert und die RNA durch Alkoholfällung unter Zugabe von 375 µl 100% Ethanol und 12,5 µl 3M Natriumacetatlösung ausgefällt (-80°C, 30min). Die ausgefällte RNA wurde abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4°C), eventuelle Phenolreste durch 70% Ethanol ausgewaschen. Zum Schluss wurde das luftgetrocknete Pellet in 15 µl DEPC Wasser gelöst und im Kontrollgel überprüft (Größe für KCNQ2 und KCND3 2,636 kb).

2.3 Oocyten-Präparation

Die Oocyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* wurden vom Institut für Physiologie der Universität Tübingen oder von EcoCyte Bioscience (Castrop-Rauxel, Deutschland) bezogen. Die Oocyten sind im Reifestadium V/VI, weshalb ein Teil des Ovars entfernt werden muss. Das entnommene Ovarfragment wurde mechanisch in kleinere Stücke geteilt. In einer mindestens einstündigen Inkubation unter ständigem Schwenken in Kollagenase Typ II (1 mg/ml), gelöst in OR2-Lösung, wurde das Bindegewebe und Follikelepithel entfernt. Der Verdau wurde durch dreifaches Waschen in zuerst calciumfreier OR2- Lösung, dann in einer Barth Lösung beendet. Die Oocyten wurden in eine 96 well Platte plaziert, mit je einer Oocyte pro Well plus 200 µl Barth-Lösung mit dem Zusatz von 50 µg/ml Gentamycin. Die Injektion der RNA erfolgte mittels eines automatisierten Systems Roboocyte2 (Multichannel System, Reutlingen). Es wurden einheitlich pro Platte 50-70nl RNA mit einer Konzentration von 0,8

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ je Oocyte injiziert, was einer RNA-Menge von 25-56 ng entspricht. Die injizierten Oocyten wurden 2-4 Tage bei 17°C inkubiert.

2.4 Zwei-Elektroden Voltage clamp (TEVC) und das Voltage Clamp Protokoll

Nach 2-4 Tagen Inkubation bei konstanten 17°C mit heterologer Expression von Kv7.2 und 7.3 bzw. Kv4.3 wurden die Zellen mit dem automatisierten Zwei-Elektroden- Voltage-clamp System (TEVC; Roboocyte 2, Multichannel System, Reutlingen) bei Raumtemperatur (20-22°C) gemessen. Beide Glasmikroelektroden wurden mit 1 M KCl/1,5M KAc Lösung gefüllt, ihre Widerstände lagen in der verwendeten Badlösung (ND96) zwischen 0.3 und 1 M Ω . Die Ströme von Kv7 wurden mit einer Frequenz von 1kHz aufgenommen, Kv4.3 mit einer Frequenz von 5kHz. Die Aktivierung von Kv7.2 und Kv7.3 erfolgte von einem Haltepotential von -80mV in zwei sekundigen Depolarisationsschritten um 10mV von -80 bis +50 mV, gefolgt von einem 0,5-sekundigen Potential auf -30mV zur Messung des Tail Currents, um die Triebkraft des Kationenflusses allein durch das Anlegen von Spannung möglichst konstant zu halten. Für die Retigabin Messungen wurde die Zellmembran in 20 mV Schritten auf Testpotentiale von -100 bis +60mV depolarisiert. Die Oocyten wurde vor und nach der Applikation von in Barth Solution gelöstem Retigabin ($c=10 \mu\text{M}$) gemessen. Kv4.3 wurde von einem Haltepotential von -100 mV in 10mV Intervallen von -80mv bis +70 mV depolarisiert.

2.5 Datenanalyse

Die Messungen der TEVC-Untersuchungen wurden mit Roboocyte2 (Multichannel System, Reutlingen) durchgeführt. Ausgewertet und geplottet wurde mit Roboocyte 2+, Excel (Microsoft, USA), Clampfit 10.2 (pClamp, Axon Instruments, Sunnyvale, CA), Origin (Origin-Lab Corp., Northampton, USA) und SigmaPlot 12.0 (Systat Software GmbH).

Die maximalen Stromamplituden wurden während eines 2-sekündigen Depolarisierungsschritt auf +40mV gemessen. Sie wurden auf den Mittelwert von am selben Tag gemessenen Oocyten mit Expression wildtypischer Kv7.2 bzw. Kv7.2 + Kv7.3 Kanäle normalisiert. Die normalisierten Amplituden verschiedener Versuchstage wurden zusammengefasst.

Das Strom-Spannungsverhältnis der Aktivierung wurde ermittelt über die Relation zwischen den Strömen im *Tail* von jedem Testpotential (Intervall 10mV von -80 -+40mV) und des maximalen Stroms. Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit einer Boltzmannfunktion gefittet: $I = I_{\max}/(1+\exp((V-V_{0,5})/K))+C$ mit I als gemessene Stromamplitude, $I_{\max}$ als maximaler Strom, $V_{1/2}$ als Potential, bei der eine halbmaximale Aktivierung erreicht ist; k als Steigungsfaktor, und C als Steigungskonstante.

Die Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung wurden durch einen Datenfit mit einer *first order* Exponentialgleichung für jeden Spannungsschritt beschrieben.

Alle Daten wurden mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angezeigt. Die Ermittlung statistischer Signifikanz erfolgte anhand des *one way analyses of variance* (ANOVA) *on ranks* und *paired t-Test* mit SigmaPlot 12.0. Für die Untersuchung des Grads an Konservierung der genomischen Abschnitte, die von der Mutation in *KCNQ2* und *KCND3* betroffen sind, erfolgte ein Aminosäuren Alignment mit Hilfe von Clustal Omega von EMBL-EBI und NCBI.

3 Ergebnisse

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die funktionelle Untersuchung zweier *missense*-Mutationen G315R und R325G in *KCNQ2*, welche im proximalen C-Terminus der α -Untereinheit von Kv7.2 liegen. Identifiziert wurden die Mutationen bei Neugeborenen mit einer pharmakoresistenten, entwicklungsbedingten und epileptischen Enzephalopathie (DEE) in einer multizentrischen Studie von Weckhuysen et al. (2013). Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Analyse der pharmakologischen Wirkung des Kv7-Kanalöffners Retigabin (Ezogabin) auf die mutierten Kv7.2-Kanäle in Coexpression mit Kv7.3, um mögliche therapeutische Effekte zu evaluieren. Im dritten Teil der Arbeit wurde die funktionelle Konsequenz der Deletion F227~~del~~ in *KCND3* untersucht, welches zur Deletion von Phenylalanin in Segment S2 des Kv4.3-Kanals führt. Diese Mutation wurde bei einem Patienten mit autosomal-dominanter spinocerebellärer Ataxie identifiziert.

Alle funktionellen Analysen erfolgten im heterologen *Xenopus laevis*-Expressionssystem unter Verwendung der Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp-Technik (TEVC).

3.1 Sequenzvergleich

Kaliumkanäle enthalten konservierte Domänen, die essenzielle strukturelle und funktionelle Determinanten für ihre elektrische Aktivität und Regulation darstellen (Capera et al., 2019). Daher war es von Interesse zu untersuchen, in welchem Maße die Aminosäuresequenzen der hier analysierten Mutationen phylogenetisch konserviert sind. Das Alignement der Aminosäuresequenzen von Kv7.2 zeigte, dass die Positionen G315 und R325 innerhalb konservierter Bereiche unter Wirbeltieren liegen, was auf eine funktionelle Relevanz dieser Regionen hinweist. R325 ist ebenso im *Shab*-und *Shal*-Genprodukt in *Drosophila melanogaster* konserviert. Bei Kv4.3 zeigte sich, dass auch Phenylalanin auf Position 227 in allen Wirbeltieren und bis auf *Shab* in allen Homologen (Kv1;Kv3 und Kv4) von *Drosophila* konserviert ist. Durch die Lokalisation der untersuchten Mutationen in konservierten Bereichen kann man annehmen, dass

bei Kv7.2 der Austausch der neutralen Aminosäure Glycins mit der basischen Aminosäure Arginin bzw. bei Kv4.3 die Deletion des unpolaren Phenylalanins F227del potentiell von funktioneller Relevanz ist.



Abbildung 6: Multiples Alignment der Aminosäuresequenz von Kv7.2 (Isotyp a, Isotyp c), verschiedener Wirbeltiere und *Shaker*, *Shab*, *Shaw*, *Shal* aus *Drosophila melanogaster*. Die Pfeile markieren die Position der *missense*-Mutationen G315R (blau) und R325G (schwarz).

Auf homologen Positionen der Aminosäure 315 in Kv7.2 ist bei allen Wirbeltieren die neutrale Aminosäure Glycin eingebaut, auf Position 325 das basische Arginin.

In den Homologen Kv1-4 ist Glycin auf Pos. 315 durch die ebenfalls neutrale Aminosäure Asparagin (N) ersetzt. Arginin auf Position 325 ist auch im *Shab*- (Kv2) und *Shal*- (Kv4) Genprodukt erhalten. Das Alignment erfolgte mit Clustal Omega.



Abbildung 7: Multiples Alignment der Aminosäuresequenz vom humanen Kv4.3 verschiedener Wirbeltiere und den spannungsabhängigen Kaliumkanälen *Shaker*, *Shab*, *Shaw*, *Shal* aus *Drosophila melanogaster*. Position F227 (Pfeil) ist in allen Wirbeltieren wie auch in *Shaker*, *Shaw*, *Shal* konserviert. Das Alignment erfolgte mit Clustal Omega.

3.2 KCNQ2

Bei den hier untersuchten Punktmutationen in *KCNQ2* G315R und R325G handelt es sich um *missense*-Mutationen. In der Variante G315R wurde die neutrale Aminosäure Glycin durch die basische Aminosäure Arginin ersetzt, während in R325G Arginin durch Glycin ausgetauscht wurde. Beide Mutationen betreffen den proximalen C-Terminus.

3.2.1 Funktionelle Untersuchung homomerer Kv7.2-Kanäle

Die funktionelle Untersuchung der Mutationen G315R und R325G in Kv7.2 erfolgte in *Xenopus laevis* Oocyten unter Verwendung einer automatisierten Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (TEVC, Robocyte2, Multichannel Systems) 2–4 Tage nach der cRNA-Injektion gemäß dem beschriebenen Messprotokoll (siehe Kapitel 2.4 und 2.5).

Bei der homomeren Expression beider Mutationen fand sich ein kompletter *Loss-of-function* (siehe Abb. 8 und Abb.9). Die gemessenen Ströme ähnelten eher endogenen Strömen als dem typischen M-Strom (nicht dargestellt). Die Stromamplituden waren im Vergleich zum wildtypischen Kv7.2-Kanal stark reduziert (G315R: Reduktion um 96 % gegenüber WT; R325G: Reduktion um 95 %).

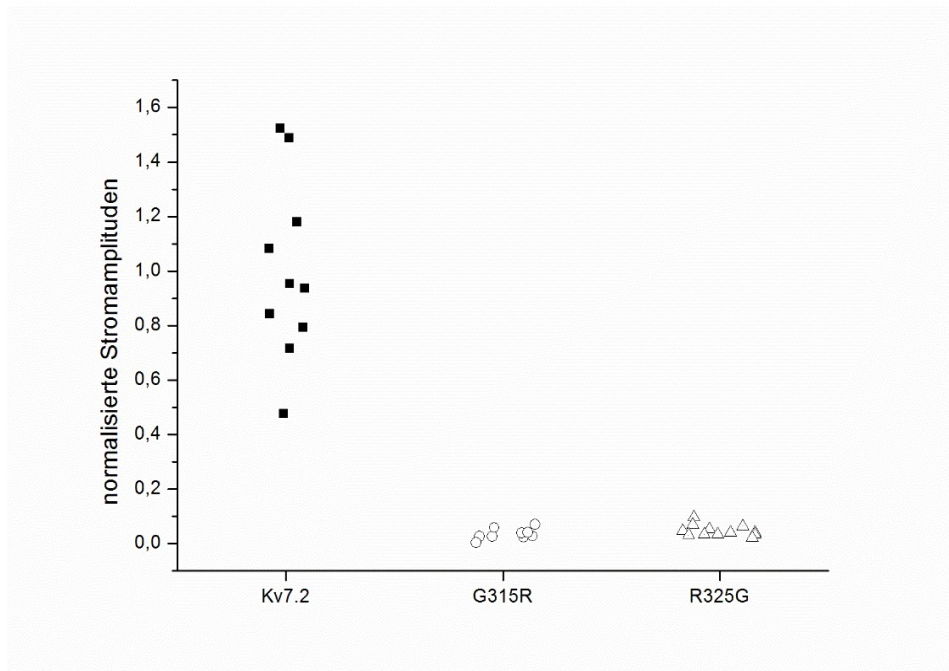


Abbildung 8: Streudiagramm der normalisierten Stromamplituden einzelner Zellen bei homomerer Expression von Kv7.2 WT bzw. Mutation G315R und R325G. Kv7.2: n=10; G315R: n=9; R325G: n=12

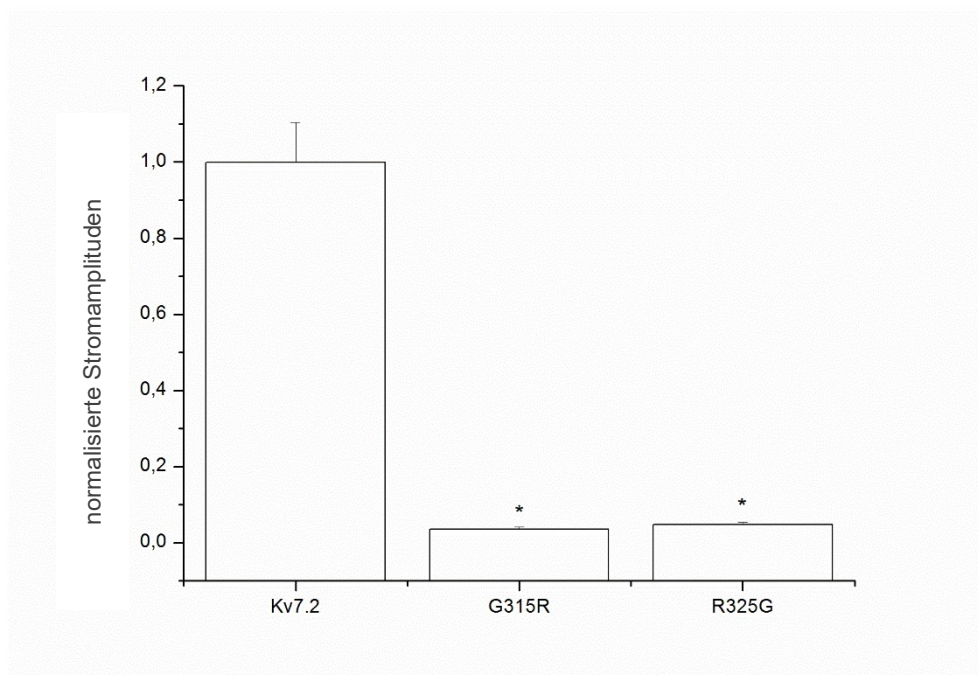


Abbildung 9: Normalisierte Stromamplituden bei homomerer Expression von Kv7.2 WT bzw. Mutation G315R und R325G. Kv7.2: Normalisierter Mittelwert: $1,0 \pm 0,10$; n=10; G315R: n=9, Mittelwert: $0,04 \pm 0,01$; R325G: n=12, Mittelwert: $0,05 \pm 0,01$; Statistisch signifikante Unterschiede (ANOVA on ranks) werden dargestellt als $*p < 0,05$.

Zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen der Mutationen wurde der Stromvergleich im Injektionsverhältnis 1:1 durchgeführt, d. h. ein Anteil wildtypischer cRNA wurde mit einem Anteil Wasser oder mutierter cRNA kombiniert. Als Kontrolle wurden die Ströme mit der Expression von zwei Anteilen wildtypischer cRNA (Kv7.2/Kv7.2) verglichen, das einem homozygot wildtypischen Zustand entspricht. Bei Haploinsuffizienz wären bei Expression von wt Kv7.2/Mutation (1:1) gleich hohe Stromamplituden wie bei Injektion von wt *KCNQ2*-cRNA/H₂O zu erwarten gewesen sowie maximal um 50 % reduzierte Amplituden im Vergleich zu Expression von wt Kv7.2/Kv7.2.

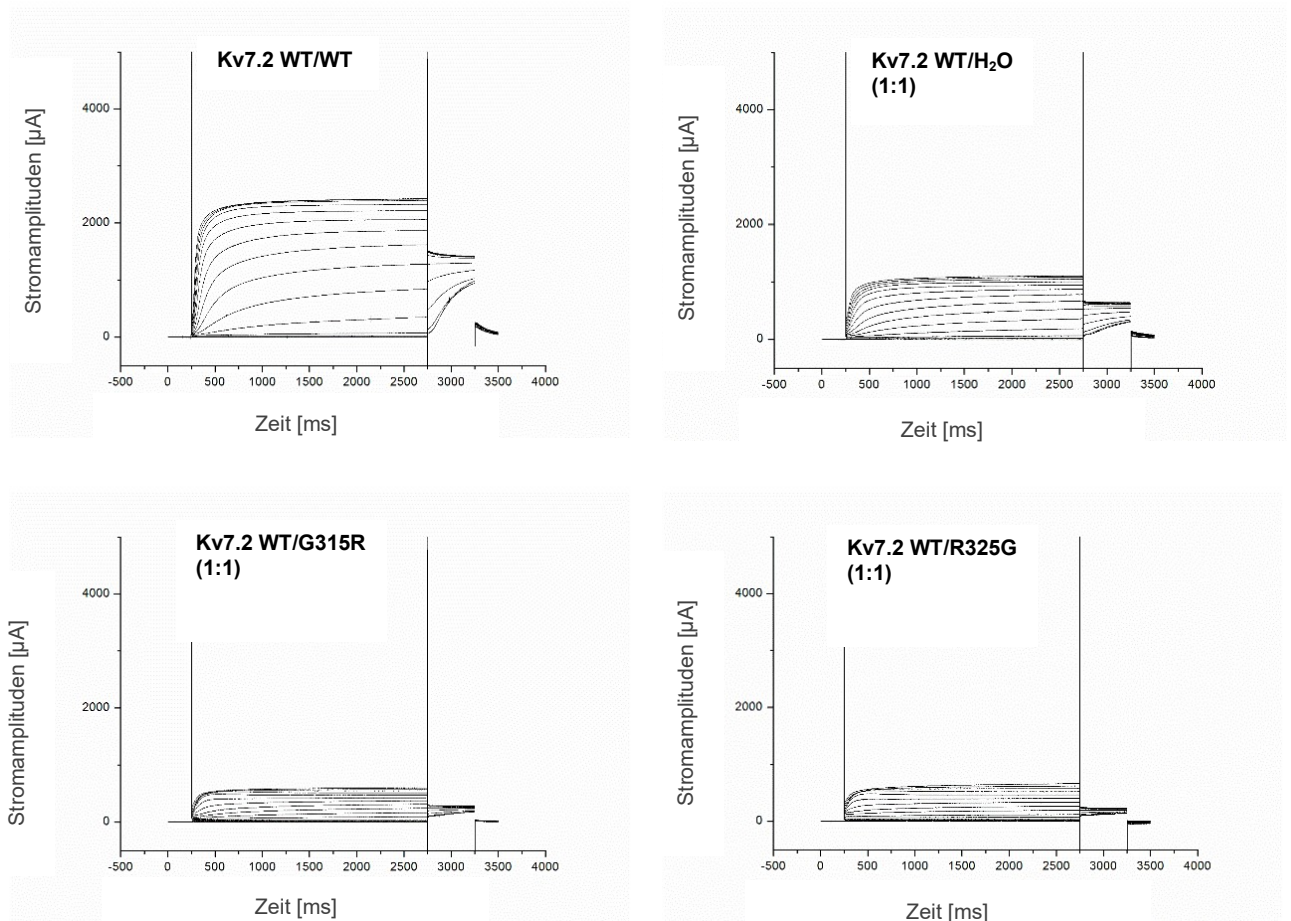


Abbildung 10: Charakteristische Stromverläufe bei Expression von wt Kv7.2, wt Kv7.2/H₂O sowie WT Kv7.2 /G315R (1:1) und WT Kv7.2/R325G (1:1) bei Testpotentialen von -80 bis +50mV ($\Delta 10\text{mV}$).

Die gepoolten Messergebnisse der Stromamplituden von Kv7.2/G315R (1:1) zeigten im Vergleich zu Kv7.2/Kv7.2 eine Amplitudenreduktion um 57%, Kv7.2/R325G (1:1) eine Reduktion um 69%. (siehe Abb. 11). Im Vergleich der Kombinationen Mutation/WT (1:1) mit Kv7.2/H₂O (1:1) waren die Amplituden beider Mutationen unterhalb denen von Kv7.2/H₂O: bei G315R um 14 %, bei R325G um 26 %. Somit erreichten die Amplituden in einer 1:1 Coinjektion von mutierter und wildtypischer cRNA nicht die 50%-Marke von Kv7.2/ Kv7.2 und lagen unterhalb des Kv7.2/H₂O Niveaus. Beide Ergebnisse sprechen für einen dominant negativen Effekt. Aufgrund der geringen Zellzahl wurde das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) nicht durchgehend erreicht; die Daten zeigen teils nur einen Trend. In Zusammenschau mit den reduzierten Amplituden in Coexpression mit Kv7.3 (1:1:2) um mehr als 25% (siehe Kapitel 3.2.2) kann jedoch von einem dominant negativen Effekt ausgegangen werden.

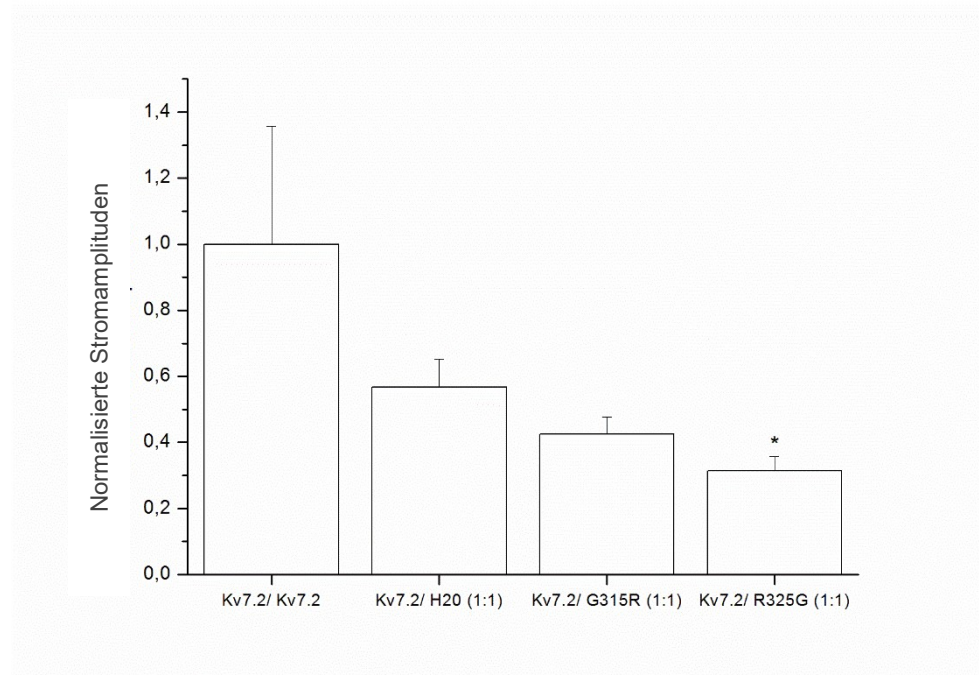


Abbildung 11: Normalisierte Stromamplituden bei Expression homozygot wt Kv7.2/ Kv7.2 Kanäle, nach Injektion einem Anteil wt KCNQ2-cRNA mit einem Anteil H₂O (Kv7.2/H₂O; entsprechend einer Haploinsuffizienz), nach Coexpression wt und mutierter Kv7.2-Untereinheiten (1:1). Es zeigte sich bei WT/ Mutation (1:1) eine >50 % Reduktion im Vergleich zu Kv7.2/Kv7.2 und geringere Stromamplituden als bei Kv7.2/H₂O. Dies ist vereinbar mit einem dominant negativen Effekt. Kv7.2: n=4; Normalisierter Mittelwert $1,0 \pm 0,36$; Kv7.2/H₂O: n= 6, Mittelwert= $0,57 \pm 0,09$; Kv7.2/G315R (1:1): n=4, Mittelwert= $0,43 \pm 0,05$; Kv7.2/R325G: n=3, Mittelwert= $0,31 \pm 0,04$. Das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nur bei Kv7.2/R325G (1:1) im Vergleich zu Kv7.2/Kv7.2 erreicht.

3.2.2 Funktionelle Untersuchung heteromerer Kv7.2/ Kv7.3-Kanäle

Die Coexpression von wildtypischen Kv7.2 und Kv7.3 α -Untereinheiten führte unter Annahme der Zusammenlagerung zu einem heteromultimeren Kanal zu sechs- bis zehnfach höheren Stromamplituden im Vergleich zu homomeren Kv7.2-Kanälen (siehe Abb. 12).

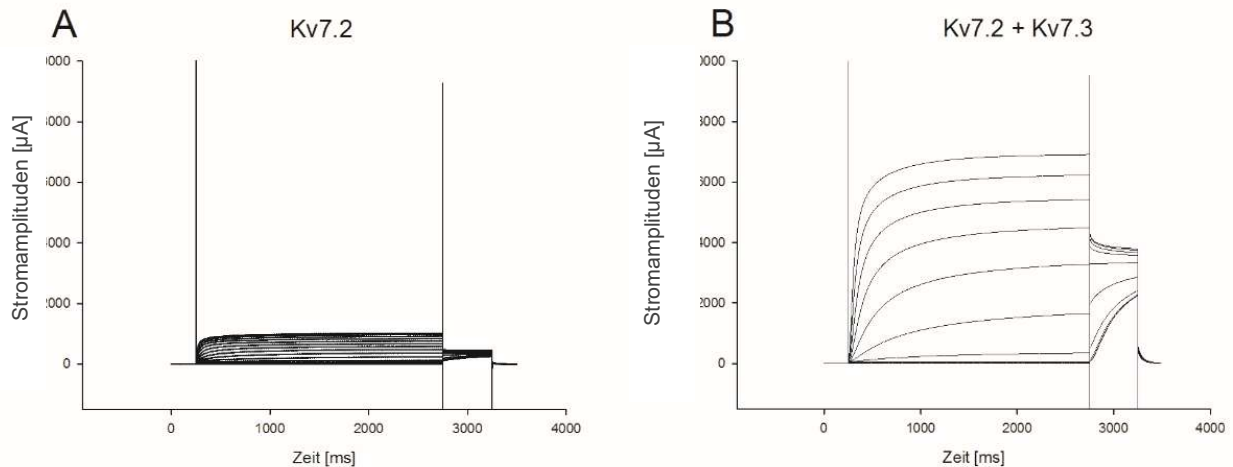


Abbildung 12: Charakteristische Stromverläufe von homomeren Kv7.2 vs. heteromeren Kv7.2/Kv7.3 Kanälen.

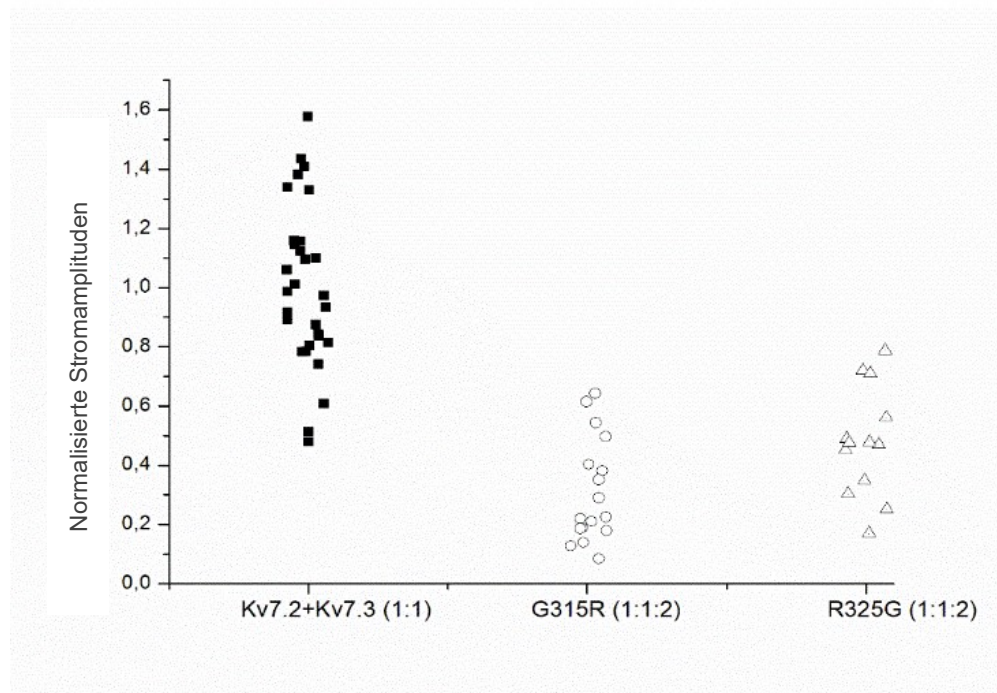


Abbildung 13: Streudiagramm der Verteilung der normalisierten Stromamplituden bei

Expression heteromerer Kanäle aus wildtypischen (wt) Kv7.2-Untereinheiten (UE), mutierten Kv7.2-UE und Kv7.3-UE im Verhältnis 1:1:2 im Vergleich zu wt-Kv7.2/Kv7.3 (1:1)-Kanälen.
Kv7.2+Kv7.3 (1:1): n=31; G315R (1:1:2): n=18, R325G (1:1:2): n=13

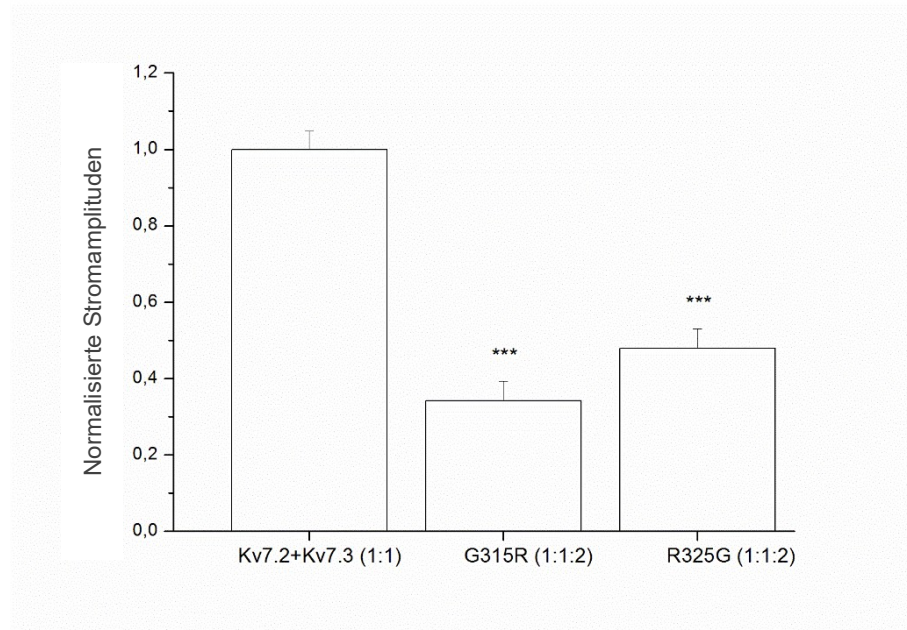
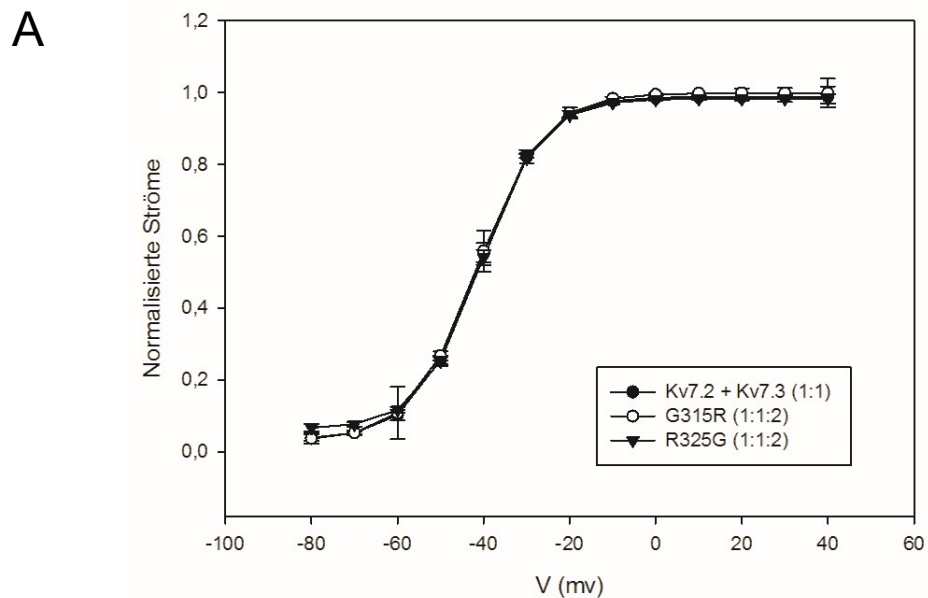


Abbildung 14: Normalisierte Stromamplituden bei Expression heteromerer Kanäle aus wildtypischer (wt) Kv7.2-Untereinheiten (UE), mutierter Kv7.2-UE und Kv7.3-UE im Verhältnis 1:1:2 im Vergleich zu wt-Kv7.2/Kv7.3 (1:1) Kanälen.
Kv7.2/Kv7.3 (1:1): n=31; Mittelwert= $1 \pm 0,05$; G315R (1:1:2): n=18, Mittelwert: $0,35 \pm 0,05$; R325G (1:1:2): n=13, Mittelwert: $0,48 \pm 0,05$; Statistisch signifikante Unterschiede (ANOVA on ranks) werden dargestellt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$**

Bei Injektionsverhältnissen in der physiologisch vermuteten Stöchiometrie von 1:1:2 von *KCNQ2*-Wildtyp, -Mutation und *KCNQ3* zeigte sich im Vergleich zur homomeren Expression eine deutliche Steigerung der Ströme. Jedoch waren sie im Vergleich zum wildtypischen heteromeren Kv7.2/Kv7.3-Kanal signifikant > 25% reduziert: Reduktion G315R (1:1:2) um 65%, R325G (1:1:2) um 52%. Auch in dieser Konstellation spricht das Ergebnis für einen dominant negativen Effekt (siehe Abb.14).

Anders als die Stromamplituden, ist wie in Abb.15 dargestellt das Strom-Spannungsverhältnis der Aktivierung bei G315R und R325G in 1:1:2

Coexpression nicht verändert. Ihre Steigungskonstante k ist unverändert gegenüber wildtypischer heteromerer Kanäle. Da mutierte Homotetramere nahezu keinen Strom vermitteln, konnte ein Strom-Spannungsverhältnis hierfür nicht bestimmt werden.



B

	$V_{1/2}$ (mV)	SEM	n
Kv7.2+Kv7.3	-41,3	$\pm 0,82$	8
G315R (1:1:2)	-41,4	$\pm 0,50$	6
R325G (1:1:2)	-40,6	$\pm 1,16$	9

Abbildung 15: Strom-Spannungsverhältnis der Aktivierung der coexprimierten Kanäle (1:1:2). Die Datenpunkte wurden mit einer Boltzmannfunktion gefittet. $V_{1/2}$ ist die halbmaximale Aktivierung, ihre Werte sind in Tabelle B dargestellt. Es lag keine Verschiebung der Aktivierungskurve vor.

Auch die Aktivierungskinetik der 1:1:2 coexprimierten Kv7.2 und -3 Kanäle mit c-terminal lokalisierten Mutationen zeigt keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu wildtypischen Kv7.2/Kv7.3 Kanälen (siehe Abb.16.).

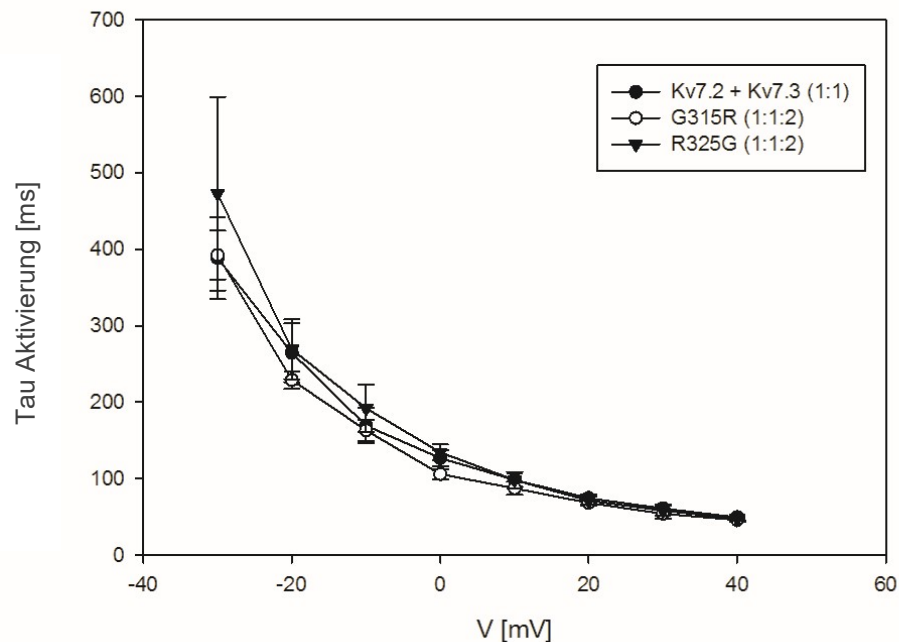


Abbildung 16: Aktivierungskinetik der coexprimierten Kv7.2 und -3 Kanäle (1:1:2). Die Zeitkonstanten τ -Aktivierung wurden durch einen first order Exponentialfit berechnet. Beide Mutationen G315R (1:1:2) und R325G (1:1:2) zeigten in ihrer Aktivierungskinetik keine signifikanten Veränderungen. Kv7.2/Kv7.3 (1:1): n=9, G315R (1:1:2): n=10; 325G (1:1:2):n= 10

Auffällig dagegen war der Vergleich der Ruhemembranpotenziale (RMP) von Oocyten, in denen wildtypische bzw. mutierte Kv7.2- und Kv7.3-Untereinheiten exprimiert wurden (siehe Abb.17). Zellen mit wildtypischer Kv7.2-Expression zeigten ein RMP von ca. -59 mV, während das RMP bei der Bildung homomerer G315R- und R325G Kanäle bei - 29 mV lag. Dies entspricht in etwa dem endogenen RMP der untersuchten Oocyten im Reifestadium V-VI (vgl. RMP bei alleiniger H₂O-Injektion: -31 mV).

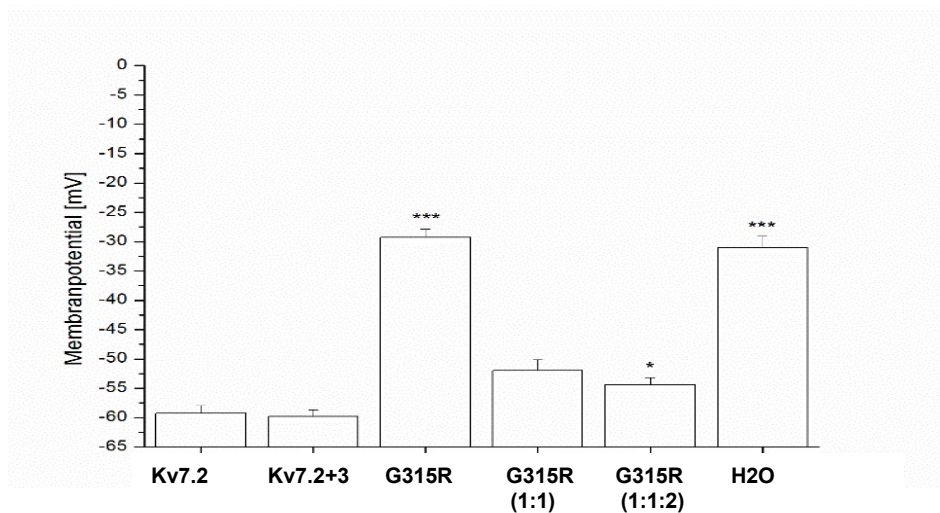
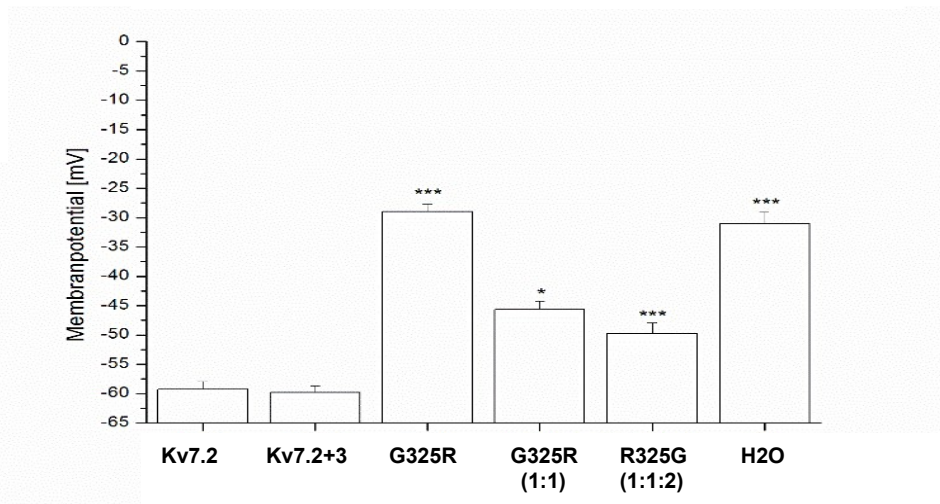
A**B**

Abbildung 17: Vergleich der Ruhemembranpotenziale (RMP) bei Expression wt Kv7.2 bzw wt Kv7.2/7.3 Kanäle vs. mutierter Kv7.2-Kanäle G315R und R325G, bei Coexpression wt/mutierter Kv7.2-UE (1:1) und heteromerer Kv7.2/Kv7.3-Kanäle (1:1:2). Zur Kontrolle Zellen ohne heterologe Expression (H₂O)

Beide Mutationen zeigten gegenüber dem Wildtyp eine signifikante Positivierung des RMP. Durch Coexpression von wildtypischen Kv7.2- und Kv7.3-Untereinheiten konnte ein teilweiser Rescue beobachtet werden mit jedoch weiter bestehender signifikanter Positivierung des RMP. Bei Expression homomer mutierter Kv7.2-Kanäle entsprach das RMP dem von Oocyten im Reifestadium V-VI.

A: Kv7.2/ Kv7.2: n=14, Mittelwert $-59,3 \pm 1,3$; Kv7.2 + Kv7.3: n=31, Mittelwert $-59,8 \pm 1,5$; G315R: n= 16, Mittelwert $-29,3 \pm 1,43$; Kv7.2/G315R (1:1): n= 4, Mittelwert $-52,0 \pm 1,9$; G315R(1:1:2): n=19, Mittelwert $-54,4 \pm 1,3$; H₂O: n=5, Mittelwert $-31,0 \pm 2,0$

B: K_v7.2: n=14, Mittelwert $-59,3 \pm 1,3$; Kv7.2 + K_v7.3: n=31, Mittelwert $-59,8 \pm 1,16$; R325G: n=8, Mittelwert $-29,0 \pm 1,3$; R325G (1:1): n=3, Mittelwert $-45,7 \pm 1,5$; R325G (1:1:2) n= 11, Mittelwert $-49,7 \pm 1,8$;

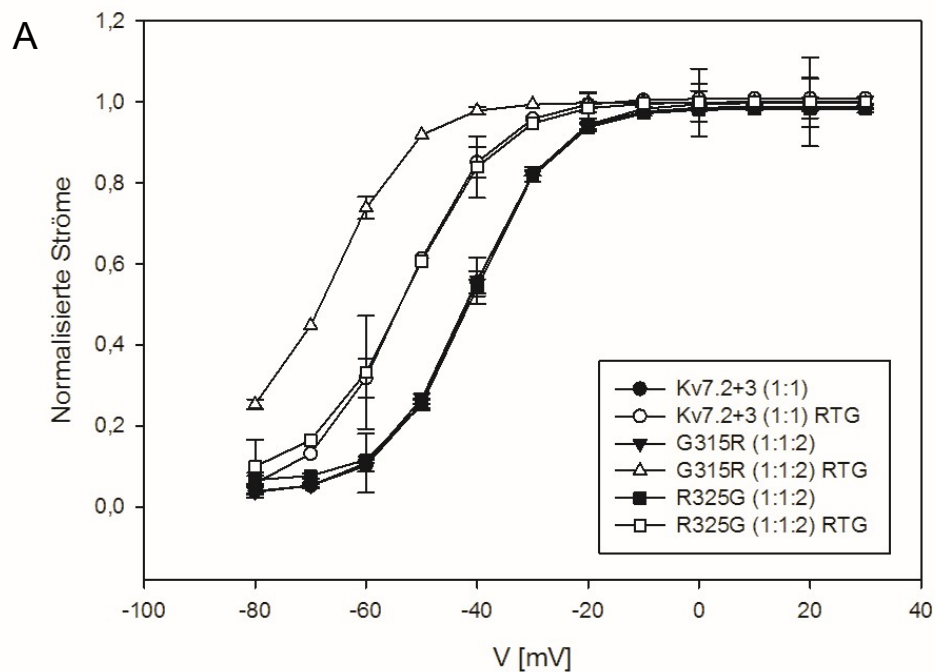
Statistisch signifikante Unterschiede (ANOVA on ranks) werden dargestellt als *p<0,05, **p<0,01 und ***p <0,001

Bei Coexpression der mutierten Kv7.2-Untereinheiten mit wildtypischer Kv7.2- α -Untereinheiten (1:1) war im Vergleich zu homomeren mutierten Kanälen eine Negativierung des Ruhemembranpotenzials (RMP) nachweisbar (RMP von G315R (1:1): -52,0 mV vs. G315R: -29,3 mV; RMP von R325G (1:1) -45,7 mV vs. R325G -29,0mV). Signifikant war dies bei R325G (1:1), bei G315R konnte es nur als Trend gezeigt werden. Eine zusätzliche Anlagerung von Kv7.3-Untereinheiten in den tetrameren Kanal erbrachte bei wildtypischen Kv7.2-Kanälen keine Veränderung, während sie bei den untersuchten Mutationen einen weiteren leichten Shift in Richtung hyperpolarisierte Potentiale bewirkte: G315R (1:1:2) RMP von -54,4 mV (Δ +5,4mV vs Kv7.2/7.3), R325G (1:1:2) RMP von -49,7 mV (Δ +10,1mV vs Kv7.2/7.3). Beide Ergebnisse entsprechen noch immer einer signifikanten Depolarisation des RMP gegenüber dem wildtypischen Kanal.

3.2.3 Retigabin

Im diesem Versuchsteil wurde die Auswirkung von Retigabin (10 μ M) auf die von G315R und R325G betroffenen Kv7.2-Kanäle untersucht. Retigabin wirkt als direkter Kv7-Kanalöffner und stellt somit eine Art "precision therapy" dar (siehe Kapitel 1.3.5).

Im untersuchten Strom-Spannungsverhältnis zeigte die Zugabe von Retigabin (RTG) bei wildtypischen heteromeren Kanälen (Kv7.2/Kv7.3) eine Verschiebung um -12 mV in Richtung Hyperpolarisation. Der gleiche Shift wurde bei R325G (1:1:2) beobachtet (-12 mV). Bei G315R (1:1:2) führte Retigabin zu einer Verschiebung der Strom-Spannungskurve um sogar -22 mV in Richtung negativere Potentiale.



B

	$V_{1/2}$ ohne RTG	$V_{1/2}$ mit RTG
Kv7.2+Kv7.3	-41,3 mV	-53,2 mV
R325G (1:1:2)	-40,6 mV	-52,5 mV
G315R (1:1:2)	-41,4 mV	-63,4 mV

Abbildung 18: (A) Strom-Spannungs-Kurven mit und ohne Retigabin (RTG, 10 μ M). Sowohl bei wt Kv7.2/Kv7.3 als auch bei G315R (1:1:2) und R325G (1:1:2) bewirkte RTG eine signifikante Verschiebung der Aktivierung in Richtung Hyperpolarisation.

(B). Halbmaximale Aktivierungspotentiale ($V_{1/2}$). Verschiebung von $V_{1/2}$ unter RTG des wt Kv7.2/Kv7.3 von $-41,3 \pm 0,8$ auf $-53,2 \pm 1,0$ mV ($p < 0,001$) und bei R325G (1:1:2) von $-40,6 \pm 1,2$ auf $-52,5$ mV ($p < 0,001$). Bei G315R (1:1:2) zeigte sich ein noch ausgeprägter Shift in Richtung Hyperpolarisation von $-41,4 \pm 0,50$ mV auf $-63,4 \pm 1,01$ mV ($p < 0,001$; $n = 6-8$).

3.3 KCND3

In diesem Versuchsteil erfolgte die funktionelle Untersuchung im *Xenopus laevis*-Oozyten-Expressionssystem mittels TEVC einer *in-frame*-Deletion F227~~del~~ im *KCND3*-Gen, das für den spannungsabhängigen, schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden und auswärts gleichrichtenden Kaliumkanal KV4.3 kodiert. Die Deletion liegt in einem konservierten Bereich bei Wirbeltieren, dem Homologen *Shal*, dem ebenso A-Strom leitenden *Shaker* sowie dem delayed rectifier *Shaw*. Die Mutation betrifft das Transmembransegment S2, das Teil des Spannungssensors ist (siehe Abb.4). Die Deletion wurde als Auslöser der Spinocerebellären Ataxie 19/22 (SCA) 2012 von Lee et al. beschrieben. Im Gegensatz zu Lee et al. mit identifizierter hereditär aufgetretenen Mutation handelt es hier um eine *de-novo* Mutation.

3.3.1 Funktionelle Untersuchung von Kv4.3-Kanälen

Mit der Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp Technik (TEVC, Roboocyte2, Multichannelsystem) erfolgten 2-4 Tage nach cRNA-Injektion die Messungen der Kv4.3-Kanal exprimierenden Oocyten. Von einem Haltepotential von -100 mV wurden die Oocyten in 10mV Intervallen von -80mv bis +70 mV depolarisiert. Wie in Abb. 19 dargestellt, zeigen die wildtypischen Kv4.3-Kanäle schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden auswärts gerichteten Kaliumstrom (A-Strom), während über die homomeren F227~~del~~-Kanäle kein A-Strom ableitbar waren. Die gemessenen Ströme der Deletion waren nicht vom endogenen Strom abgrenzbar. In den homomeren mutierten Kanälen war somit ein kompletter *Loss-of-function* zu verzeichnen. Auch bei Coexpression von wildtypischen mit mutierten α -Untereinheiten im Verhältnis 1:1 war kein typischer A-Strom nachweisbar. Der mittlere *Peak current* war auch in wt-Kv4.3//F227~~del~~ (1:1) um 94 % reduziert; ein Rescue war nicht erkennbar. Somit ist von einem ausgeprägten dominant-negativen Effekt auszugehen.

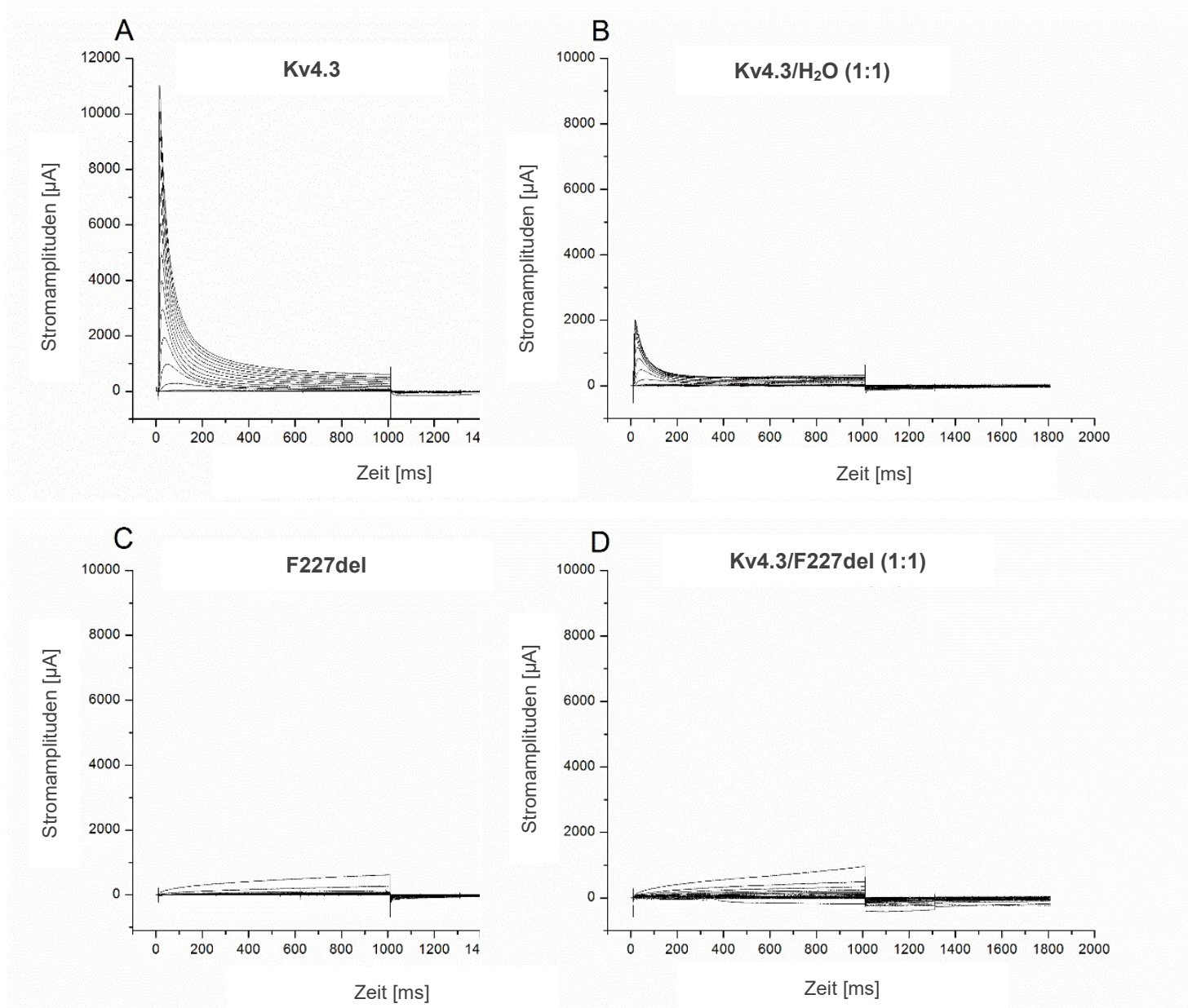


Abbildung 19: Charakteristische Rohdaten der Stromverläufe bei (A) wildtypischer Expression von Kv4.3- Kanäle (B) Expression bei Coinjektion wt KCND3/H2O, was einen monoallelischen Ausfall widerspiegelt, (C) Expression von F227del und (D) Expression von wt Kv4.3/F227del (1:1). Die Testpotentiale lagen zwischen -80 - +70mV (10mV).

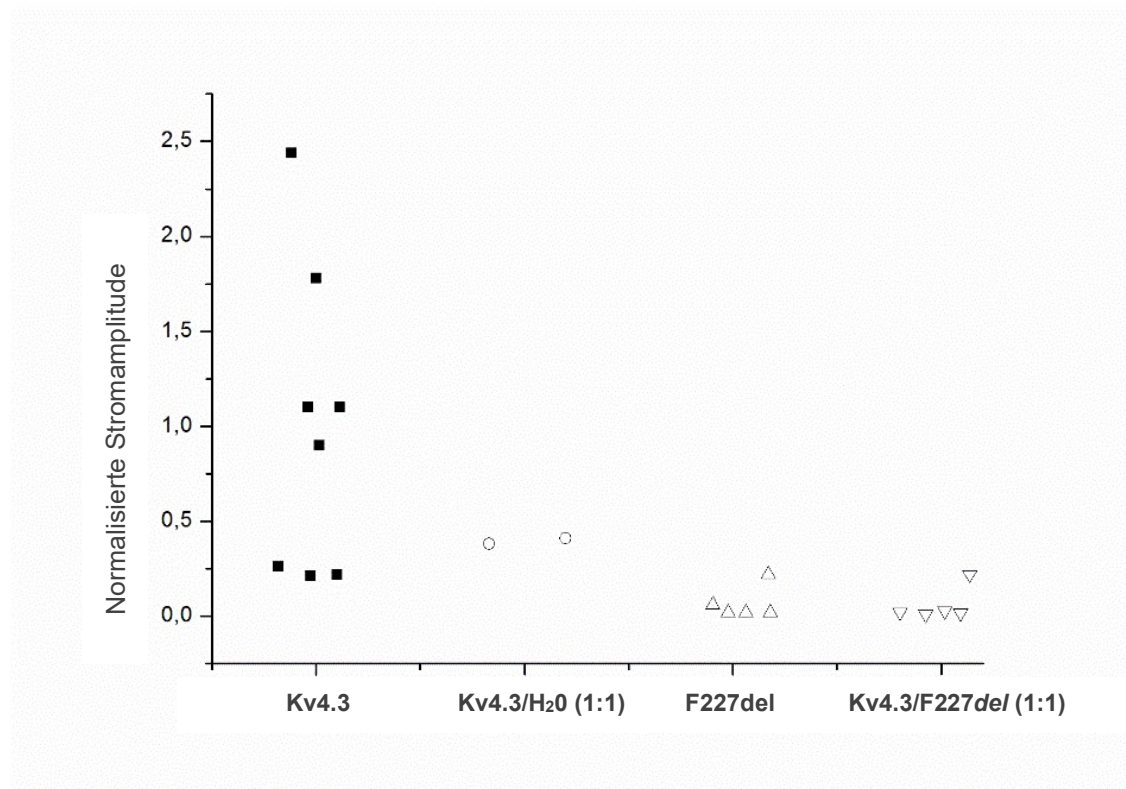


Abbildung 20: Streudiagramm der normalisierten Stromamplituden einzelner Zellen bei Expression von wildtypischer Kv4.3-Kanäle, bei Coinjektion von einem Teil H₂O anstatt *KCND3*-cRNA (Kv4.3/H₂O (1:1)), Expression von F227del sowie wt Kv4.3/F227del (1:1). Kv4.3: n= 8, Kv4.3/H₂O (1:1): n=2, F227del: n=5, Kv4.3/F227del (1:1): n=5.

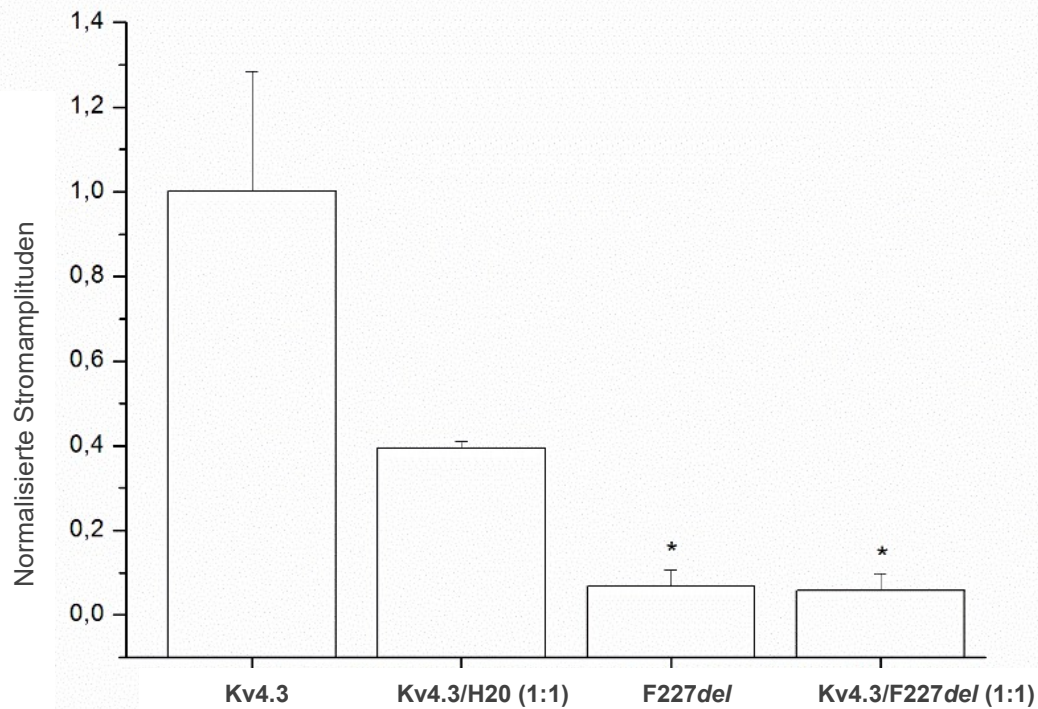


Abbildung 21: Normalisierte Stromamplituden bei Expression wildtypischer Kv4.3-Kanäle, bei Coinjektion von einem Teil H20 anstatt KCND3-cRNA (Kv4.3/H20 (1:1)), Expression von F227del sowie wt Kv4.3/F227del (1:1). Sowohl die Ströme des homomeren mutierten Kanals F227del als auch bei Coexpression von wildtypischen und mutierten Kv4.3-Untereinheiten (Kv4.3/F227del (1:1)) fand sich ein kompletter *Loss-of-function* (F227del Reduktion um 93%, Kv4.3/F227del (1:1) Reduktion 94%).

Kv4.3: n=8, Mittelwert 1.0 ± 0.28 ; Kv4.3/H₂O: n=2, Mittelwert 0.40 ± 0.02 ; F227del: n = 5, Mittelwert 0.07 ± 0.04 , K Kv4.3/F227del: n=5, Mittelwert 0.06 ± 0.04 . Statistisch signifikante Unterschiede (ANOVA on ranks) werden dargestellt als *p<0,05, **p<0,01 und ***p <0,001

4 Diskussion

4.1 KCNQ2/KCNQ3

Die funktionelle Charakterisierung der beiden *de-novo*-Mutationen G315R und R325G in *KCNQ2* im heterologen *Xenopus laevis*-Oozyten-Expressionssystem mittels Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp (TEVC) zeigte in beiden Fällen einen *Loss-of-function* mit deutlicher Reduktion des M-Stroms. Die Mutationen wurden bei zwei Neugeborenen mit einer entwicklungsbedingten und epileptischen Encephalopathie (DEE) in einer multizentrischen Studie von Weckhuysen et al. 2013 identifiziert. Für G315R lagen bislang keine funktionellen Daten vor; die hier erhobenen Ergebnisse für R325G stimmen jedoch mit früheren Untersuchungen in CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) überein (Soldovieri et al., 2016).

Kanäle, die ausschließlich aus mutierten Kv7.2-Untereinheiten bestanden, zeigten keinen vom Hintergrund abgrenzbaren Strom. Die Simulation der heterozygoten Situation durch Coexpression von mutierten und wildtypischen Kv7.2-Untereinheiten (1:1) führte zu einem partiellen Rescue, wobei die Dysfunktion des Kanals stärker ausgeprägt war als es durch eine reine Haploinsuffizienz erklärbar wäre: Die Reduktion der Stromamplituden von Wt/Mutation (1:1) betrug in beiden Fällen über 50 % vs. dem homozygot wildtypischen Zustand (Kv7.2/Kv7.2). Auch im Vergleich zur Injektion von einem Anteil wildtypischer *KCNQ2*-cRNA plus einem Anteil Wasser (Kv7.2/H₂O) - entsprechend einem monoallelischen Funktionsausfall- konnten bei beiden Mutationen (Wt/Mutation (1:1)) verminderte Amplituden nachgewiesen werden. Somit scheinen die exprimierten G315R und R325G Kv7.2 α -Untereinheiten nicht eine insuffiziente, sondern eine dysfunktionelle Auswirkung auf die Ausbildung wildtypischer Kanäle zu besitzen. Wir sahen einen dominant negativen Effekt für beide Mutationen.

Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen überein, die eine Korrelation zwischen dem Grad des funktionellen Defizits und der klinischen Schwere zeigen: Varianten, die benigne familiäre neonatale Krampfanfälle

(BFNS) verursachen, zeigen *in vitro* meist eine Haploinsuffizienz, während DEE-assoziierte Varianten einen dominant negativen Mechanismus aufweisen (Miceli et al., 2013; Orhan et al., 2014). Diese Genotyp-Phänotyp-Korrelation bestand auch in dieser Arbeit. Ursachen für die beobachtete Reduktion der Kaliumströme können, wie in jüngeren funktionellen Studien gezeigt, eine verminderte Ionenleitfähigkeit, reduzierte Kanalexpression, gestörtes Trafficking, abnormes Gating oder eine veränderte Antwort auf Regulatorproteine sein (Nappi et al., 2024). Beide untersuchten Mutationen liegen im proximalen C-Terminus der Kv7.2 α -Untereinheit nahe der hochkonservierten A-Domäne, die für die Tetramerisierung essenziell ist, und der Cp-Domäne, die ebenfalls die Subunit-Assemblierung unterstützt (Maljevic et al., 2013). Sie befinden sich innerhalb der Calmodulin(CaM)-Bindedomäne, welche für die korrekte Faltung, Trafficking und die Tetramerisierung von Kv7.2 entscheidend ist (Weckhuysen et al., 2013; Maljevic & Lerche, 2014). Da funktionelle Kv7-Kanäle nur als Tetramere in die Plasmamembran eingebaut werden (Papazian, 1999), könnten die Mutationen die Interaktion mit anderen α -Untereinheiten beeinträchtigen und so den Einbau verhindern. Zudem kann die Integration einer defekten Untereinheit den gesamten Kanal „vergiften“ (*dominant-negative interference*), wie für DEE-assoziierte KCNQ2-Varianten beschrieben (Millichap et al., 2016). Beide Mutationen liegen c-terminal unmittelbar distal des Transmembransegments S6, einem Bereich, der sowohl an der Pore als auch am Gating beteiligt ist. C-terminal sind ebenso PIP₂-Bindestellen lokalisiert. PIP₂ wirkt als essenzieller Cofaktor, der über mehrere cytosolische Bindungsstellen (am C-Terminus, Spannungssensor (VSD) und Porendomäne (PD)) eine Konformationsänderung induziert, den Spannungssensor mechanisch mit der Porendomäne koppelt und somit die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht (Zhang et al., 2013). Eine reduzierte PIP₂-Bindeaffinität bewirkt eine Dysfunktion des Gatings und wäre somit als Mechanismus der M-Stromreduktion durch die hier untersuchten Mutationen denkbar. Da für einen funktionellen Kanal auch immer alle vier α -Untereinheiten öffnen und schließen müssen, kann eine Fehlfunktion in einer einzigen Untereinheit zum Funktionsausfall des gesamten Ionenkanals führen (Millichap, 2016). Experimentell zeigte die heteromere

Coexpression (1:1:2) von Kv7.2/Kv7.3 zusammen mit den Mutationen keine signifikanten Veränderungen der Aktivierungskinetik oder Spannungsabhängigkeit. Damit ist ein gestörtes Gating als Hauptursache der M-Stromreduktion bei G315R und R325G unwahrscheinlich.

Des Weiteren konnte bei Expression beider *KCNQ2*-Mutationen eine signifikante Veränderung des Ruhemembranpotentials (RMP) beobachtet werden, welches als „schicksalsbestimmender“ Faktor für neuronale Proliferation und Differenzierung gilt (Dirkx et al., 2020; Sontheimer et al., 1989; Rao et al., 2015). Oozyten, die wildtypische Kv7.2- oder Kv7.2/Kv7.3-Kanäle exprimierten, zeigten ein RMP von etwa -59 mV. Homozygot mutierte Kanäle zeigten ein deutlich depolarisiertes RMP, ähnlich dem endogenen Oocyten-RMP im Reifestadium V-VI. Bei Simulation des heterozygoten Zustands (wt/Mutation (1:1)) kam es zu einer Verschiebung in Richtung negativere Potentiale, dennoch waren die RMP im Vergleich zu wt Kv7.2-Kanälen signifikant depolarisiert. Die zusätzliche Coexpression von Kv7.3-Untereinheiten (1:1:2) führte – im Gegensatz zu den Wildtypbedingungen – zu einer weiteren partiellen Negativierung, die RMPs blieben jedoch weiterhin um 6–10 mV depolarisiert (RMP von G315R (1:1:2): -54,4 mV; RMP von R325G (1:1:2): -49,7 mV). Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus *NGN2*-Neuronen jüngerer Studien überein, die aus patientenabgeleiteten iPSC-Modellen gewonnen wurden. In diesen zeigte sich bei Expression mutierter *KCNQ2*-Kanäle in einer frühen Messung (nach 3–4 Tagen) eine Depolarisation des RMP um ~ 7 mV gegenüber Wildtypzellen (Rosa et al., 2025). Der Reifegrad dieser *NGN2*-Neuronen entspricht in etwa der menschlichen fetalen Hirnentwicklung im 2. Trimester (Rosa et al., 2020). Oozyten des Stadiums V–VI, wie sie typischerweise für heterologe Expressionsexperimente eingesetzt werden, befinden sich in der Prophase I der Meiose und repräsentieren ebenso ein frühes Reifestadium (Meneau et al., 2020). Wie Dirkx et al. (2020) betonen, ist die Aufrechterhaltung eines phasenspezifischen RMPs während der neuronalen Entwicklung essenziell. In frühen Entwicklungsphasen, die durch Zellproliferation geprägt sind, ist ein depolarisiertes RMP charakteristisch. Dieses wird durch niedrige M-Ströme hervorgerufen, bedingt durch die Expression des verkürzten fetalen Transkripts

e (Dirkx et al., 2020), dem zwei PIP₂- Bindedomänen fehlen (Suh & Hille, 2002). Mit zunehmender Expression des längeren Transkripts *c* (Linta et al., 2013), dessen Produkt funktionelle Kv7.2-Kanäle bildet, verschiebt sich das RMP in Richtung Hyperpolarisation, was als Signal für neuronale Differenzierung gilt (Dirkx et al., 2020).

Die beobachtete Depolarisation der RMPs bei G315R und R325G im *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem im Vergleich zur Expression wildtypischer Kv7.2/Kv7.3-Kanäle könnte somit den Hinweis in Zellkulturexperimenten auf eine Entwicklungsverzögerung bei Mutationen, die eine M-Strom-Reduktion bewirken, unterstreichen. In iPSC-Neuronen (Rosa et al., 2025) konnte bei Depolarisation des RMP anstatt einer Hyperexzitabilität, das als zentraler Mechanismus von KCNQ2-assoziierten Epilepsien gilt (Miceli et al., 2015), eine gestörte AP-Generierung und Reduktion der ersten Synchronisationen („*giant depolarization events*“ (GDEs); Rosa et al., 2025) nachgewiesen werden. Die in unreifen Zellen beobachtete Reduktion der AP-Rate und Nachlassen der Amplitude in stimulationsinduzierten Messungen des Aktionspotentialverhaltens könnte Folge der Colokalisation von Kv7.2 und Kv.7.3-Kanäle mit spannungsabhängigen Natriumkanälen sein, welche zur Aktivierung eine vorherige Hyperpolarisation benötigen. Der experimentell nachgewiesene weitere Rescue des RMP durch Coexpression von Kv7.3. ist klinisch wahrscheinlich für die postnatale neuronale Entwicklung von Bedeutung, da eine relevante Kv7.3 Expression erst ab der Geburt beginnt (Zinel et al., 1998, Zhang et al., 2016).

Retigabin ist ein mittlerweile vom Markt genommener allosterischer Kv7-Öffner, der über die Bindung an einer hydrophoben Tasche zwischen S5 und S6 an Schlüsselaminosäuren wie einer Tryptophan-Seitenkette in der S5-Helix bindet und so den Kanal im geöffneten Zustand stabilisiert. Passend zu früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Retigabin das Strom-Spannungsverhältnis sowohl bei wildtypischer Kv7.2/Kv7.3 (1:1) Kanalexpression als auch bei Expression beider Mutationen G315R und R325G (1:1:2) signifikant in Richtung negativerer Potentiale verschiebt, mit einem Shift zwischen -12 bis -22 mV (WT (1:1:2) Δ -12mV; G315R (1:1:2) Δ -22mV, R325G (1:1:2) Δ -12mV). Warum die Verschiebung bei G315R so viel deutlicher ist, bleibt unklar. Möglicherweise führt

der Austausch der kleinen, flexiblen Glycin-Seitenkette gegen eine große, positiv geladene Arginin-Gruppe zu einer erhöhten Zugänglichkeit der Bindungstasche zwischen S5 und S6 für Retigabin und somit höherem Medikamenteneffekt.

Durch die Verschiebung der Strom-Spannungs-Verhältnisse in Richtung Hyperpolarisation könnten – bei vergleichbarem Verhalten *in vivo* – sowohl Patienten mit der G315R- als auch mit der R325G *missense*-Mutationen von einer Therapie mit Retigabin bzw. einem selektiveren Kv7-Kanalöffner der zweiten Generation wie XEN1101, der sich aktuell in klinischen Phase-II/IIb-Studien befindet (Löscher, 2025), profitieren. Der durch die reduzierte Kanalfunktion bedingte verminderte M-Strom könnte durch eine schon bei negativeren Potentialen aktivierte Kanalöffnung teilweise kompensiert werden. Postnatal bewirkt dies klinisch eine Reduktion der Anfallshäufigkeit (French et al., 2023), in fetalen Zellen könnte es eine Hyperpolarisation des Membranpotentials bewirken und somit die neuronale Reifung und Netzwerk-Synchronisation unterstützen. Weitere Studien sind hierzu erforderlich.

4.2 KCND3

Die funktionelle Untersuchung (ebenso im Oocyten-Expressionssystem, TEVC) des A-Strom vermittelnden Kv4.3 Kanals mit F227~~del~~, welche im Rahmen einer Spinocerebellären Ataxie (SCA) identifiziert wurde, zeigte einen kompletten *Loss-of-function* sowohl bei der Expression homomerer Deletionskonstrukte als auch bei Coexpression mit wildtypischen Kv4.3 α -Untereinheiten (1:1).

Die Deletion der aromatischen Aminosäure Phenylalanin an Position 227 des Proteins betrifft das Transmembransegment S2 und ist Teil des Spannungssensors. Somit lag die initiale Vermutung nahe, dass die Sequenzveränderung in S2 eine Verschiebung des Strom-Spannungsverhältnis und Öffnungsverhalten bewirken könnte. Allerdings konnte bei der homomeren Expression von F227~~del~~-Untereinheiten sowohl bei Expression nur mutierter Kv4.3-Untereinheiten als auch bei Coexpression mit wildtypischen Kv4.3 Untereinheiten (1:1) kein Strom abgeleitet werden. Das Strom-

Spannungsverhältnis und die Aktivierungskinetik konnten somit nicht beurteilt werden.

Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit denen von Lee et al., 2012. Sie konnten darüber hinaus durch Immunfluoreszenzfärbungen nachweisen, dass die Deletion F227~~del~~ - trotz Lokalisation im Spannungssensor und nicht im für die Tetramerisierung von Kv4 bedeutsamen N-Terminus - ein gestörtes Trafficking bewirkt. Das veränderte Protein wurde nicht über das endoplasmatische Retikulum ausgeschleust, sondern verblieb intrazellulär. Ätiologisch ist denkbar, dass die Deletion der neutralen, unpolaren Aminosäure eine Störung der Helixgeometrie und Hydrophobizität bewirkt und somit einem Trafficking entgegensteht (Lee et al., 2012).

5 Zusammenfassung

Kv7 Kanäle stabilisieren die Zelle durch den sogenannten M-Strom im Subschwellenbereich von APs, kontrollieren dadurch die Erregbarkeit der Zelle und repetitives Feuern. Kv7.2 und -3 Kanäle werden hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert, sowohl im ZNS als auch im PNS. Mutationen in *KCNQ2* und -3 können u.a. zu selbstlimitierenden benignen familiären neonatalen Anfällen (BFNS) führen, können aber auch Ursache schwererer Verläufe wie der entwicklungsbedingten und epileptischen Enzephalopathie (DEE) sein.

Kv4 sind spannungsabhängige Kaliumkanäle, die A-Strom vermitteln. Neben der Repolarisation spielen sie eine große Rolle bei der Regulation der AP-Frequenz. Lange wurden sie vor allem mit kardialen Erkrankungen in Verbindung gebracht wie Vorhofflimmern, Herzhypertrophie und dem Brugada-Syndrom. *KCND3* wurde erstmalig 2012 als verursachendes Gen der Spinocerebellären Ataxie Typ 19/22 identifiziert.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand aus der Untersuchung von zwei c-terminal lokalisierten *de-novo*-Punktmutationen in *KCNQ2* G315R und R325G, die bei neugeborenen Kindern mit einer entwicklungsbedingten und epileptischen Enzephalopathie (DEE) identifiziert wurden. Die Fragestellung war, inwieweit sich das elektrophysiologische Verhalten der mutierten Kanäle von wildtypischen unterscheidet. Mittels Mutagenese, *in vitro*-Transkription und cRNA-Injektion

wurden die Kanäle im heterologen *Xenopus laevis* Oocyten-Expressionssystem exprimiert und das elektrophysiologische Verhalten über die Zwei-Mikroelektroden Voltage Clamp Technik (TEVC) gemessen. Beide KCNQ2-Mutationen G315R und R325G zeigten einen *Loss-of-function* (LoF): Bei Expression von lediglich mutierter α -Untereinheiten fand sich ein kompletter LoF, in Coexpression mit zusätzlich wildtypischer Kv7.2 α -UE (1:1) zeigte sich weiterhin eine über 50% Reduktion der Stromamplituden, das für einen dominant negativen Effekt spricht. Eine Änderung des Gatings war nicht nachweisbar. Ursächlich für den dominant negativen Effekt kann somit wegen der c-terminalen Lokalisation beider Mutationen innerhalb der Calmodulin-Bindedomäne ein gestörtes Trafficking, Tetramerisierung oder eine Funktionsstörung des Gesamtkanals bei Integration einer dysfunktionalen α -Untereinheit sein.

Beim Vergleich der Ruhemembranpotentiale, welches für Proliferation und Differenzierung ein relevanter Faktor ist (Dirkx et al, 2020), fand sich bei Expression nur mutierter Kv7.2-Kanäle eine massive Depolarisation des RMP von ca +30mV in beiden Mutationen. Bei Coexpression der Mutationen mit wildtypischen Kv7.2-Untereinheiten (1:1), entsprechend eines heterozygoten Zustands, bestand weiterhin eine Depolarisation von +7 bis 14 mV, im heteromultimeren Zustand mit Kv7.3 α -Untereinheiten (1:1:2) weiterhin von +5 bis 10mV. Dass eine Depolarisation bei reifen Neuronen mit einer erhöhten Exzitabilität und somit auch erhöhter Anfallsbereitschaft einhergeht, ist in früheren Studien mehrfach nachgewiesen worden (Miceli et al., 2015). Dass in unreifen Zellen eine Depolarisation des RMP auch eine Reduktion der AP-Frequenz und Synchronisation bewirken kann, möglicherweise durch eine geringere Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle, die mit M-Strom vermittelnden Kanälen u.a. im Axonhügel colokalisiert sind, und somit eine Störung der neuronalen Reifung und Netzbildung bewirken kann, war Gegenstand jüngerer Studien (Rosa et al, 2025). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Verschiebung des RMP in Richtung Depolarisation in Oocyten, Stadiums V–VI, die ebenso einem frühen Reifestadium entsprechen, unterstreicht eine mögliche Auswirkung des veränderten RMP auf

Zelldifferenzierung, neuronale Entwicklung und Entstehung einer DEE neben der erhöhten Anfallsbereitschaft peri- und postnatal.

Retigabin (RTG) - ein Antikonvulsivum, das als allosterischer Modulator den Offenzustand von spannungsabhängigen Kaliumkanälen *KCNQ2-5* stabilisiert, verursachte eine Verschiebung des Strom-Spannungs-Verhältnis in Richtung hyperpolarisierende Membranpotentiale sowohl bei den wildtypischen Kv7.2/Kv7.3 als auch mutierten Kanälen G315R (1:1:2) und R325G (1:1:2). Besonders ausgeprägt war der Shift bei Mutation G315R (1:1:2) sogar um -22 mV (dazu im Vgl.: WT und R325G: Δ -12mV). Erklärbar ist dies ggf. durch eine große Nähe der Mutation zur Retigabin-Bindestelle und durch den Austausch der kleinen Glycin-Seitenkette gegen eine große, positiv geladene Arginin-Gruppe mit möglicherweise erhöhter pharmakologischer Zugänglichkeit in der Bindungstasche.

Im Teil der funktionellen Untersuchung von *KCND3 F227del* mit Deletion der aromatischen Aminosäure Phenylalanin an Position 227 im Segment S2 im Spannungssensor war ein kompletter *Loss-of-function* zu beobachten. Auch in der Coexpression deletierter Kv4- mit wildtypischen Untereinheiten (1:1) vermittelten die Kv4 Kanäle keinen Strom. Wie durch eine vorherige Studie immunhistochemisch nachgewiesen (Lee et al., 2012) ist dies durch eine gestörte Faltung und Trafficking bedingt und nicht durch eine Veränderung des Gatings. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass die Deletion der neutralen, unpolaren Aminosäure eine Störung der Helixgeometrie und Hydrophobizität verursacht und somit den Einbau in die Plasmamembran verhindert (Lee et al., 2012).

6 Literaturverzeichnis

- Aeby A. SCN1B-linked early infantile developmental and epileptic encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019 Dec;6(12):2354-2367. doi: 10.1002/acn3.50921.
- Armstrong CM & Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature.* 1973 Apr 13;242(5398):459-61. doi: 10.1038/242459a0.
- Baculis BC, Zhang J, Chung HJ. The Role of Kv7 Channels in Neural Plasticity and Behavior. *Front Physiol.* 2020 Sep 18;11:568667. doi: 10.3389/fphys.2020.568667.
- Bargmann CI. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science.* 1998 Dec 11;282(5396):2028-33. doi: 10.1126/science.282.5396.2028.
- Barhanin J. K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature.* 1996 Nov 7;384(6604):78-80. doi: 10.1038/384078a0.
- Battefeld A. Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated axons. *J Neurosci.* 2014 Mar 5;34(10):3719-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4206-13.2014.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002): *Biochemistry.* 5.Aufl., New York, USA: W H Freeman.
- Biervert C. Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Hum Genet.* 1999 Mar;104(3):234-40. doi: 10.1007/pl00008713.
- Biervert C. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):403-6. doi: 10.1126/science.279.5349.403.
- Borgatti R. A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology.* 2004 Jul 13;63(1):57-65. doi: 10.1212/01.wnl.0000132979.08394.6d.
- Brandes R, Lang F (2019): *Physiologie des Menschen*, 32.Aufl., Berlin, Deutschland: Springer-Verlag.
- Brown D. M-currents: an update. *Trends Neurosci.* 1988 Jul;11(7):294-9. doi: 10.1016/0166-2236(88)90089-6.
- Brown DA, Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature.* 1980 Feb 14;283(5748):673-6. doi: 10.1038/283673a0.
- Brown DA, Passmore GM. Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol.* 2009 Apr;156(8):1185-95. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00111.x.
- Capera J, Serrano-Novillo C, Navarro-Pérez M, Cassinelli S, Felipe A. The Potassium Channel Odyssey: Mechanisms of Traffic and Membrane Arrangement. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 9;20(3):734. doi: 10.3390/ijms20030734.
- Charlier C. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet.* 1998 Jan;18(1):53-5. doi: 10.1038/ng0198-53.
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron.* 1990 Mar;4(3):405-11. doi: 10.1016/0896-6273(90)90052-h.
- Chung HJ. Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 6;103(23):8870-5. doi: 10.1073/pnas.0603376103. Epub 2006 May 30.
- Cooper EC. Made for "anchorin": Kv7.2/7.3 (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. *Semin Cell Dev Biol.* 2011 Apr;22(2):185-92. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.10.001.
- Dzhala VI. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med.* 2005 Nov;11(11):1205-13. doi: 10.1038/nm1301.

- de Lecea L. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*. 1996 May 16;381(6579):242-5. doi: 10.1038/381242a0.
- De Vivo DC. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med*. 1991 Sep 5;325(10):703-9. doi: 10.1056/NEJM199109053251006.
- Dedek K. Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 9;98(21):12272-7. doi: 10.1073/pnas.211431298.
- Dedek, Karin (2003): Charakterisierung von KCNQ-Kaliumkanälen und ihren β -Untereinheiten. Dissertation, Biologie, Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg.
- Dedek K, Fusco L, Teloy N, Steinlein OK. Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2. *Epilepsy Res*. 2003 Apr;54(1):21-7.
- Delmas P & Brown DA. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Nov;6(11):850-62. doi: 10.1038/nrn1785.
- Devaux JJ. KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci*. 2004 Feb 4;24(5):1236-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4512-03.2004.
- Devinsky O. Epilepsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 May 3;4:18024. doi: 10.1038/nrdp.2018.24.
- Dick KA. Dominant non-coding repeat expansions in human disease. *Genome Dyn*. 2006;1:67-83. doi: 10.1159/000092501.
- Dilks D. Cloning and expression of the human kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol*. 1999 Apr;81(4):1974-7. doi: 10.1152/jn.1999.81.4.1974.
- Dirx N. The Role of Kv7.2 in Neurodevelopment: Insights and Gaps in Our Understanding. *Front Physiol*. 2020 Oct 28;11:570588. doi: 10.3389/fphys.2020.570588.
- Duarri A. Mutations in potassium channel *kcnd3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Ann Neurol*. 2012 Dec;72(6):870-80. doi: 10.1002/ana.23700.
- Duarri A. The L450F [Corrected] mutation in KCND3 brings spinocerebellar ataxia and Brugada syndrome closer together. *Neurogenetics*. 2013 Nov;14(3-4):257-8. doi: 10.1007/s10048-013-0370-0. Epub 2013 Aug 21. Erratum in: *Neurogenetics*. 2015 Jul;16(3):243. doi: 10.1007/s10048-015-0447-z.
- Ferrer T. Mechanisms responsible for the altered cardiac repolarization dispersion in experimental hypothyroidism. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012 Apr;204(4):502-12. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02364.x.
- Figueiro-Silva J. Neuronal pentraxin 1 negatively regulates excitatory synapse density and synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2015 Apr 8;35(14):5504-21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2548-14.2015.
- Fontana DJ. Linopirdine (DuP 996) improves performance in several tests of learning and memory by modulation of cholinergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994 Dec;49(4):1075-82. doi: 10.1016/0091-3057(94)90267-4.
- Franqueza L. Functional expression of an inactivating potassium channel (Kv4.3) in a mammalian cell line. *Cardiovasc Res*. 1999 Jan;41(1):212-9. doi: 10.1016/s0008-6363(98)00220-x.
- Frech, M., Mikosch, T., Schröder, M., Stassen, M. (2007). Allgemeine Methoden. In: M. Jansohn (Hrsg.), *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Heidelberg, Deutschland: Spektrum der Wissenschaft, Springer-Verlag (Seite. 1-35).
- French JA. Efficacy and Safety of XEN1101, a Novel Potassium Channel Opener, in Adults With Focal Epilepsy: A Phase 2b Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2023

- Nov 1;80(11):1145-1154. doi: 10.1001/jamaneurol.2023.3542. Erratum in: JAMA Neurol. 2024 Feb 1;81(2):200. doi: 10.1001/jamaneurol.2023.5238.
- Giudicessi JR. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2011 Jul;8(7):1024-32. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.02.021.
 - Goldstein SA. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Mar;2(3):175-84. doi: 10.1038/35058574.
 - Gómez-Posada JC. A pore residue of the KCNQ3 potassium M-channel subunit controls surface expression. *J Neurosci*. 2010 Jul 7;30(27):9316-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0851-10.2010.
 - Gunthorpe MJ. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy. *Epilepsia*. 2012 Mar;53(3):412-24. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03365.x. Epub 2012 Jan 5.
 - Gutman GA. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2003 Dec;55(4):583-6. doi: 10.1124/pr.55.4.9.
 - Hadley JK. Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 potassium channels and subunit composition of native ganglionic M channels deduced from block by tetraethylammonium. *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):5012-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-12-05012.2003.
 - Hagiwara S. Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium-rich media. *J Physiol*. 1961 Mar;155(3):470-89. doi: 10.1113/jphysiol.1961.sp006640.
 - Heginbotham L. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*. 1994 Apr;66(4):1061-7. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80887-2.
 - Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3.Aufl., Sunderland, MA: Sinauer Associates.
 - Ho K. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):31-8. doi: 10.1038/362031a0.
 - Hoffman DA. K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):869-75. doi: 10.1038/43119.
 - Hodgkin AL & Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952 Aug;117(4):500-44. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764.
 - Hoshi T. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*. 1991 Oct;7(4):547-56. doi: 10.1016/0896-6273(91)90367-9.
 - Hsu YH. Contrasting expression of Kv4.3, an A-type K⁺ channel, in migrating Purkinje cells and other post-migratory cerebellar neurons. *Eur J Neurosci*. 2003 Aug;18(3):601-12. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02786.x.
 - Jacobi H. Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*. 2015 Nov;14(11):1101-8. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00202-1.
 - Jensen MØ. Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science*. 2012 Apr 13;336(6078):229-33. doi: 10.1126/science.1216533.
 - Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*. 2000 Oct;1(1):21-30. doi: 10.1038/35036198.
 - Ji Q. Expression changes of ionic channels in early phase of cultured rat atrial myocytes induced by rapid pacing. *J Cardiothorac Surg*. 2013 Sep 29;8:194. doi: 10.1186/1749-8090-8-194. Erratum in: J Cardiothorac Surg. 2015 Jan 23;10:10. doi: 10.1186/s13019-015-0210-4.

- Johnston D. Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol.* 2000 May 15;525 Pt 1(Pt 1):75-81. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00075.x.
- Johnston J. Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol.* 2010 Sep 1;588(Pt 17):3187-200. doi: 10.1113/jphysiol.2010.191973.
- Kamb A. Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell.* 1987 Jul 31;50(3):405-13. doi: 10.1016/0092-8674(87)90494-6.
- Kanaumi T. Developmental changes in KCNQ2 and KCNQ3 expression in human brain: possible contribution to the age-dependent etiology of benign familial neonatal convulsions. *Brain Dev.* 2008 May;30(5):362-9. doi: 10.1016/j.braindev.2007.11.003.
- Klink R, Page H, Kurtz A, Silbernagl S (2009): *Taschenatlas Physiologie*, 6.Aufl., Stuttgart, Deutschland: Thieme-Verlag.
- Klockgether T. Update on degenerative ataxias. *Curr Opin Neurol.* 2011 Aug;24(4):339-45. doi: 10.1097/WCO.0b013e32834875ba.
- Kopec W. Direct knock-on of desolvated ions governs strict ion selectivity in K⁺ channels. *Nat Chem.* 2018 Aug;10(8):813-820. doi: 10.1038/s41557-018-0105-9. Epub 2018 Jul 20.
- Krieg PA & Melton DA. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 1984 Sep 25;12(18):7057-70. doi: 10.1093/nar/12.18.7057.
- Kubisch C. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell.* 1999 Feb 5;96(3):437-46. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80556-5.
- Kusano K. Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature.* 1977 Dec 22-29;270(5639):739-41. doi: 10.1038/270739a0.
- Lee YC, Durr A, Majczenko K, Huang YH, Liu YC, Lien CC, Tsai PC, Ichikawa Y. Mutations in KCND3 cause spinocerebellar ataxia type 22. *Ann Neurol.* 2012 Dec;72(6):859-69. doi: 10.1002/ana.23701.
- Li-Smerin Y. alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J Gen Physiol.* 2000 Jan;115(1):33-50. doi: 10.1085/jgp.115.1.33.
- Linta L. Microarray-Based Comparisons of Ion Channel Expression Patterns: Human Keratinocytes to Reprogrammed hiPSCs to Differentiated Neuronal and Cardiac Progeny. *Stem Cells Int.* 2013;2013:784629. doi: 10.1155/2013/784629. Epub 2013 Apr 15.
- Lehman A. Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutations in KCNQ5 Cause Intellectual Disability or Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2017 Jul 6;101(1):65-74. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.05.016. Epub 2017 Jun 29.
- Lehmann-Horn F, Lerche H, Mitrovic N, Jurkat-Rott K. (2000) Ionenkanalerkrankungen – Krankheitsbilder. *Dtsch Arztebl*, 97(27): A-1902 / B-1634 / C-1518. Erreichbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/23544/Ionenkanalerkrankungen-allgemeine-Charakteristika-und-Pathomechanismen>)
- Lerche C. Chromanol 293B binding in KCNQ1 (Kv7.1) channels involves electrostatic interactions with a potassium ion in the selectivity filter. *Mol Pharmacol.* 2007 Jun;71(6):1503-11. doi: 10.1124/mol.106.031682.
- Lerche C. Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22395-400. doi: 10.1074/jbc.M002378200.
- Lerche H. A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol.* 1999 Sep;46(3):305-12. doi: 10.1002/1531-8249(199909)46:3<305::aid-ana5>3.0.co;2-5.

- Lerche H. Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Curr Pharm Des.* 2005;11(21):2737-52. doi: 10.2174/1381612054546815.
- Lerche H., Weber Y. (2011): Anfallsartige Erkrankungen. In: M. Sitzer M und H. Steinmetz (Hrsg.), Lehrbuch Neurologie, München, Deutschland: Urban und Fischer, S.75-102.
- Lezmy J. M-current inhibition rapidly induces a unique CK2-dependent plasticity of the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Nov 21;114(47):E10234-E10243. doi: 10.1073/pnas.1708700114. Epub 2017 Nov 6.
- Li M. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science.* 1992 Aug 28;257(5074):1225-30. doi: 10.1126/science.1519059.
- Li Y, Gamper N. Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci.* 2005 Oct 26;25(43):9825-35. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2597-05.2005.
- Long SB. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science.* 2005 Aug 5;309(5736):903-8. doi: 10.1126/science.1116270. Epub 2005 Jul 7.
- Lorenz C. Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 12;93(23):13362-6. doi: 10.1073/pnas.93.23.13362.
- Madamba SG. Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. *J Neurophysiol.* 1999 Oct;82(4):1768-75. doi: 10.1152/jn.1999.82.4.1768.
- Maffie J & Rudy B. Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons. *J Physiol.* 2008 Dec 1;586(23):5609-23. doi: 10.1113/jphysiol.2008.161620. Epub 2008 Oct 9.
- Maljevic S. C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *J Physiol.* 2003 Apr 15;548(Pt 2):353-60. doi: 10.1113/jphysiol.2003.040980.
- Maljevic S & Lerche H. Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *J Neurol.* 2013 Sep;260(9):2201-11. doi: 10.1007/s00415-012-6727-8. Epub 2012 Nov 11.
- Mandala VS & MacKinnon R. Voltage-sensor movements in the Eag Kv channel under an applied electric field. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 Nov 16;119(46):e2214151119. doi: 10.1073/pnas.2214151119. Epub 2022 Nov 7.
- Manville RW & Abbott GW. Gabapentin Is a Potent Activator of KCNQ3 and KCNQ5 Potassium Channels. *Mol Pharmacol.* 2018 Oct;94(4):1155-1163. doi: 10.1124/mol.118.112953. Epub 2018 Jul 18.
- McCrossan ZA & Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology.* 2004 Nov;47(6):787-821. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.06.018.
- Meneau F. Translational Control of *Xenopus* Oocyte Meiosis: Toward the Genomic Era. *Cells.* 2020 Jun 19;9(6):1502. doi: 10.3390/cells9061502.
- Miceli F. Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain-of-function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. *J Neurosci.* 2015 Mar 4;35(9):3782-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4423-14.2015.
- Miceli F, Soldovieri MV, Weckhuysen S, Cooper E, Taglialetela M. KCNQ2-Related Disorders. 2010 Apr 27 [updated 2022 May 19]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2025.
- Miceli F. KCNQ2 R144 variants cause neurodevelopmental disability with language impairment and autistic features without neonatal seizures through a gain-of-function mechanism. *EBioMedicine.* 2022 Jul;81:104130. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104130.

- Miledi R. Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus oocytes*. *EMBO J*. 1982;1(11):1307-12. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01315.x.
- Millichap JJ & Cooper EC. KCNQ2 Potassium Channel Epileptic Encephalopathy Syndrome: Divorce of an Electro-Mechanical Couple? *Epilepsy Curr*. 2012 Jul;12(4):150-2. doi: 10.5698/1535-7511-12.4.150.
- Millichap JJ. KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots, and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurol Genet*. 2016 Aug 22;2(5):e96. doi: 10.1212/NXG.0000000000000096.
- Millichap JJ. Infantile spasms and encephalopathy without preceding neonatal seizures caused by KCNQ2 R198Q, a gain-of-function variant. *Epilepsia*. 2017 Jan;58(1):e10-e15. doi: 10.1111/epi.13601. Epub 2016 Nov 9.
- Mulley JC. Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Curr Opin Neurol*. 2003 Apr;16(2):171-6. doi: 10.1097/01.wco.0000063767.15877.c7.
- Nappi M. Constitutive opening of the Kv7.2 pore activation gate causes KCNQ2-developmental encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024 Dec 3;121(49):e2412388121.
- Neher E & Sakmann B. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol*. 1976 Jul;258(3):705-29. doi: 10.1113/jphysiol.1976.sp011442.
- Noda M. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 1984 Nov 8-14;312(5990):121-7. doi: 10.1038/312121a0.
- Oberdick J. From zebra stripes to postal zones: deciphering patterns of gene expression in the cerebellum. *Trends Neurosci*. 1998 Sep;21(9):383-90. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01325-3.
- Orhan G. Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2014 Mar;75(3):382-94. doi: 10.1002/ana.24080.
- Pan Z. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci*. 2006 Mar 8;26(10):2599-613. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4314-05.2006.
- Papazian DM. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*. 1987 Aug 14;237(4816):749-53. doi: 10.1126/science.2441470.
- Pant S. PIP₂-dependent coupling of voltage sensor and pore domains in Kv7.2 channel. *Commun Biol*. 2021 Oct 14;4(1):1189. doi: 10.1038/s42003-021-02729-3.
- Passmore GM. KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci*. 2003 Aug 6;23(18):7227-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-18-07227.2003.
- Passmore GM. Functional significance of M-type potassium channels in nociceptive cutaneous sensory endings. *Front Mol Neurosci*. 2012 May 14;5:63. doi: 10.3389/fnmol.2012.00063.
- Paulson HL. The spinocerebellar ataxias. *J Neuroophthalmol*. 2009 Sep;29(3):227-37. doi: 10.1097/WNO0b013e3181b416de.
- Perucca E. Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures. *Epilepsia*. 1998 Jan;39(1):5-17. doi: 10.1111/j.1528-1157.1998.tb01268.x.
- Peters HC. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci*. 2005 Jan;8(1):51-60. doi: 10.1038/nn1375. Epub 2004 Dec 19.

- Prasad AN & Hoffmann GF. Early onset epilepsy and inherited metabolic disorders: diagnosis and management. *Can J Neurol Sci.* 2010 May;37(3):350-8. doi: 10.1017/s0317167100010246.
- Rao VR. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. *Cancers (Basel).* 2015 May 22;7(2):849-75. doi: 10.3390/cancers7020813.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2006): Duale Reihe Biochemie, 1.Aufl., Stuttgart, Deutschland: Thieme-Verlag.
- Rettig J. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature.* 1994 May 26;369(6478):289-94. doi: 10.1038/369289a0.
- Rockwood K. A randomized, controlled trial of linopirdine in the treatment of Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci.* 1997 May;24(2):140-5. doi: 10.1017/s031716710002148x.
- Rogawski MA. KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci.* 2000 Sep;23(9):393-8. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01629-5.
- Ronen GM, Rosales TO, Connolly M, Anderson VE, Leppert M. Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology.* 1993 Jul;43(7):1355-60. doi: 10.1212/wnl.43.7.1355.
- Rosa F. In Vitro Differentiated Human Stem Cell-Derived Neurons Reproduce Synaptic Synchronicity Arising during Neurodevelopment. *Stem Cell Reports.* 2020 Jul 14;15(1):22-37. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.05.015. Epub 2020 Jun 18.
- Rosa F. Kv7.2 channel dysfunction delays neuronal maturation and undermines early network development in a hiPSC model of KCNQ2-DEE. *Neurobiol Dis.* 2025 Sep 23;216:107120. doi: 10.1016/j.nbd.2025.107120. Epub ahead of print. PMID: 40998073.
- Rossow CF. NFATc3-induced reductions in voltage-gated K⁺ currents after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004 May 28;94(10):1340-50. doi: 10.1161/01.RES.0000128406.08418.34. Epub 2004 Apr 15.
- Rostock A. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 1996 Apr;23(3):211-23. doi: 10.1016/0920-1211(95)00101-8.
- Roulet-Perez E. Glut-1 deficiency syndrome masquerading as idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 2008 Nov;49(11):1955-8. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01654.x. Epub 2008 May 9.
- Rundfeldt C & Netzer R. The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci Lett.* 2000 Mar 17;282(1-2):73-6. doi: 10.1016/s0304-3940(00)00866-1.
- Salkoff L & Wyman R. Genetic modification of potassium channels in Drosophila Shaker mutants. *Nature.* 1981 Sep 17-23;293(5829):228-30. doi: 10.1038/293228a0.
- Safiulina VF. Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *J Physiol.* 2008 Nov 15;586(22):5437-53. doi: 10.1113/jphysiol.2008.156257.
- Schenzer A. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci.* 2005 May 18;25(20):5051-60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0128-05.2005.
- Schmitt N. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J.* 2000 Feb 1;19(3):332-40. doi: 10.1093/emboj/19.3.332.
- Schroeder BC. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem.* 2000 Aug 4;275(31):24089-95. doi: 10.1074/jbc.M003245200. PMID: 10816588.

- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature*. 1998 Dec 17;396(6712):687-90. doi: 10.1038/25367.
- Schroeder BC. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature*. 2000 Jan 13;403(6766):196-9. doi: 10.1038/35003200.
- Schubert J. Mutations in STX1B, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nat Genet*. 2014 Dec;46(12):1327-32. doi: 10.1038/ng.3130. Epub 2014 Nov 2.
- Schwake M. Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem*. 2000 May 5;275(18):13343-8. doi: 10.1074/jbc.275.18.13343.
- Schwake M.. A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep*. 2003 Jan;4(1):76-81. doi: 10.1038/sj.embor.embor715.
- Seeböhm G. Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine. *Mol Pharmacol*. 2003 Jul;64(1):70-7. doi: 10.1124/mol.64.1.70.
- Shah MM, Migliore M, Valencia I, Cooper EC, Brown DA. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 3;105(22):7869-74. doi: 10.1073/pnas.0802805105.
- Shellhaas RA. Profile of neonatal epilepsies: Characteristics of a prospective US cohort. *Neurology*. 2017 Aug 29;89(9):893-899. doi: 10.1212/WNL.0000000000004284.
- Shi G. Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*. 1996 Apr;16(4):843-52. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80104-x.
- Silbernagl S, Despopoulos A: *Taschenatlas der Physiologie*, Stuttgart: Thieme, 2003.
- Sitzer M, Steinmetz H: *Lehrbuch Neurologie*, München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2011.
- Singh NA. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet*. 1998 Jan;18(1):25-9. doi: 10.1038/ng0198-25.
- Singh NA. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain*. 2003 Dec;126(Pt 12):2726-37. doi: 10.1093/brain/awg286. Epub 2003 Oct 8.
- Smets K. First de novo KCND3 mutation causes severe Kv4.3 channel dysfunction leading to early onset cerebellar ataxia, intellectual disability, oral apraxia and epilepsy. *BMC Med Genet*. 2015 Jul 21;16:51. doi: 10.1186/s12881-015-0200-3.
- Sobczak K. Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods*. 2010 May;51(1):183-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.12.001. Epub 2009 Dec 4.
- Soldovieri MV. Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology (Bethesda)*. 2011 Oct;26(5):365-76. doi: 10.1152/physiol.00009.2011.
- Soldovieri MV. Gabapentin treatment in a patient with KCNQ2 developmental epileptic encephalopathy. *Pharmacol Res*. 2020 Oct;160:105200. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105200. Epub 2020 Sep 15.
- Sontheimer H. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron*. 1989 Feb;2(2):1135-45. doi: 10.1016/0896-6273(89)90180-3.
- Soong BW, Paulson HL. Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol*. 2007 Aug;20(4):438-46. doi: 10.1097/WCO.0b013e3281fbd3dd.
- Steinlein OK. Benign familial neonatal convulsions: always benign? *Epilepsy Res*. 2007 Mar;73(3):245-9. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2006.10.010. Epub 2006 Nov 28.

- Steinlein OK. Genes and mutations in human idiopathic epilepsy. *Brain Dev.* 2004 Jun;26(4):213-8. doi: 10.1016/S0387-7604(03)00149-9.
- Suh BC, Hille B. Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron.* 2002 Aug 1;35(3):507-20. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00790-0.
- Sun J, MacKinnon R. Structural Basis of Human KCNQ1 Modulation and Gating. *Cell.* 2020 Jan 23;180(2):340-347.e9. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.003. Epub 2019 Dec 26.
- Suls A. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain.* 2008 Jul;131(Pt 7):1831-44. doi: 10.1093/brain/awn113. Epub 2008 Jun 24.
- Symonds JD. Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain.* 2019 Aug 1;142(8):2303-2318. doi: 10.1093/brain/awz195
- Tinel N. The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett.* 1998 Nov 6;438(3):171-6. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01296-4.
- Taroni F. Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Aug;5(8):641-55. doi: 10.1038/nrn1474.
- Tsaur ML. Cloning, expression and CNS distribution of Kv4.3, an A-type K⁺ channel alpha subunit. *FEBS Lett.* 1997 Jan 3;400(2):215-20. doi: 10.1016/s0014-5793(96)01388-9.
- Tristani-Firouzi M. Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J Physiol.* 1998 Jul 1;510 (Pt 1)(Pt 1):37-45. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.037bz.x.
- Villa C. Potassium Channels and Human Epileptic Phenotypes: An Updated Overview. *Front Cell Neurosci.* 2016 Mar 30;10:81. doi: 10.3389/fncel.2016.00081.
- Wagner CA. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10(1-2):1-12. doi: 10.1159/000016341.
- Wang H. Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci.* 2007 Jan;10(1):32-9. doi: 10.1038/nn1822. Epub 2006 Dec 24. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2007 Feb;10(2):263.
- Wang HS. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science.* 1998 Dec 4;282(5395):1890-3. doi: 10.1126/science.282.5395.1890.
- Waters MF. Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet.* 2006 Apr;38(4):447-51. doi: 10.1038/ng1758.
- Weber YG. GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J Clin Invest.* 2008 Jun;118(6):2157-68. doi: 10.1172/JCI34438.
- Weckhuysen S. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2012 Jan;71(1):15-25. doi: 10.1002/ana.22644.
- Weckhuysen S. Extending the KCNQ2 encephalopathy spectrum: clinical and neuroimaging findings in 17 patients. *Neurology.* 2013 Nov 5;81(19):1697-703. doi: 10.1212/01.wnl.0000435296.72400.a1. Epub 2013 Oct 9.
- Wei AD. KCNQ-like potassium channels in *Caenorhabditis elegans*. Conserved properties and modulation. *J Biol Chem.* 2005 Jun 3;280(22):21337-45. doi: 10.1074/jbc.M502734200.

- Wulff H. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Dec;8(12):982-1001.
- Wuttke TV. The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Mol Pharmacol.* 2005 Apr;67(4):1009-17.
- Yang WP. Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem.* 1998 Jul 31;273(31):19419-23.
- Yang WP. KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 15;94(8):4017-21.
- Yus-Najera E. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;277(32):28545-53.
- Zhou N. Suppression of KV7/KCNQ potassium channel enhances neuronal differentiation of PC12 cells. *Neuroscience.* 2016 Oct 1;333:356-67.
- Zhang Y. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, 2016; 89(1):37-53. doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.013.
- Zhang Q. Dynamic PIP2 interactions with voltage sensor elements contribute to KCNQ2 channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 10;110(50):20093-8. doi: 10.1073/pnas.1312483110.
- Zhuang D. The Kv7 channel opener Retigabine reduces neuropathology and alleviates behavioral deficits in APP/PS1 transgenic mice. *Behav Brain Res.* 2024 Aug 5;471:115137. doi: 10.1016/j.bbr.2024.115137.

7 Danksagung

Mein bester Dank gilt Prof. Dr. Holger Lerche für die Überlassung des spannenden Themas, die großartige Möglichkeit diese Arbeit am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung durchzuführen, das Korrekturlesen und seine gute und konstruktive Kritik.

Des Weiteren danke ich Dr. Thomas Wuttke und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch für die gute und freundliche Betreuung meiner Arbeit und ihre Kollegialität. Zudem danke ich Dr. Snezana Maljevic für die vor allem initiale Unterstützung, sogar vom anderen Ende der Welt und Filip Rosa für die Anleitung im Labor.

Ein weiteres Dankeschön geht an Heidi Löffler und die ganze Arbeitsgruppe, die ebenso einen großen Beitrag zum Gelingen der Arbeit geleistet haben.

Ganz besonders danke ich jedoch meiner Familie: für alles!

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung Tübingen unter Betreuung von Prof. Holger Lerche durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Thomas Wuttke, Arzt und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch, Postdoc und Snezana Maljevic, Postdoc.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Heidi Löffler, Filip Rosa, Dr. Thomas Wuttke und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Thomas Wuttke und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch durch mich. Zur sprachlichen Korrekturunterstützung wurde ChatGPT verwendet.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 5.01.2026

Susanne Krepp