

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

探討 retigabine 相似物作用於 KCNQ4 蛋白之分子決定位與
可能的結構作用關係

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 101-2320-B-040-022-
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：林明忠

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：房義順
碩士班研究生-兼任助理人員：黃冠章

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102年10月31日

中文摘要：近年來 retigabine (KCNQ 活化劑)的衍生藥物被開發用來治療癲癇、偏頭痛和神經性疼痛。KCNQ 活化劑主要是介由 KCNQ 鉀離子通道恆態活化曲線過極化的偏移而達到穩定神經細胞膜的作用。為了探討 retigabine 衍生藥物(如 ML-213: (N-(2,4,6-Trimethylphenyl) -bicyclo [2.2.1] heptane-2-carboxamide)作用在 KCNQ4 的分子決定位，我們預測並建構了一系列的變異質體。以便觀察這些變異蛋白對於處理 retigabine 衍生藥物所產生的反應。將這些變異質體分別表達於 HEK293t 細胞株中。之前的研究發現了 R488A 和 R490A 變異蛋白對於 retigabine 所產生活化的反應消失了(10 微 M)，同樣的在 ML-213 的作用中也發現了相似的結果。R488A 和 R490A 是位於細胞膜中靠近 KCNQ4 內面孔道的位置，因此 retigabine 與 ML-213 所產生的活化作用其在 KCNQ4 中的作用位點其中可能包括 R488 和 R490。已知 KCNQ2 的 Trp236 (與 Trp KCNQ4 同源) 位在 S5 段的細胞質端，被認為是 KCNQ2 開關的接點。而本實驗中發現 W242L 變異蛋白對於 ML-213 不具有反應性，這也顯示了不同 Kv7 蛋白亞型其對於 retigabine 與 ML-213 個別的反应性並不相同。其它的變異蛋白顯示 retigabine 與 ML-213 作用於 KCNQ4 所產生的反應與野生型相同，這些位點對於 retigabine 與 ML-213 產生活化的反應是非必要的。這些結果顯示 KCNQ4 的 Arg488，Arg490 與 Trp242 位點參與了 ML-213 活化 KCNQ4 電流的關鍵的位置，此點與 retigabine 不盡相同。

中文關鍵詞：ML-213；KCNQ 活化劑；突變蛋白；HEK293t；分子決定位。

英文摘要：In recent years, retigabine (KCNQ activator) derivative drugs being developed for the treatment of epilepsy, migraine and neuropathic pain. It activates KCNQ K⁺ channels by inducing a large hyperpolarizing shift of steady-state activation. To explore retigabine derivative drugs (such as ML-213) in the acting on molecular determinants of KCNQ4, we predict and construct a series of variant plasmids. Therefore we can observe the response of these variant proteins to the treatment of retigabine derivative. We expressed KCNQ wild-type and these mutants in the mammalian HEK293t cell line. In previous study showed

that mutations of R488A and R490A led to a complete loss of activation by retigabine (10 μ M), likewise in the action of ML-213 (10 μ M) was also found similar results. Since Arg488 and Arg490 in the cytoplasmic part are close to pore region, therefore the effect of retigabine and ML-213 in the activation of KCNQ4 may included the locus R488 and R490. As we Known KCNQ2 Trp236 (homolog to KCNQ4 Trp242) in the cytoplasmic part of S5, considered as the gating hinge, was found to be crucial for the retigabine effect KCNQ4. However, KCNQ4 W242L is still sensitive to the effect of retigabine but not ML-213 in this study. It indicates different subtype of Kv7 proteins may result in different response to retigabine and ML-213. Other mutants L247A, L305A, R161A, R166A, S494A and A651X showed the similar results in response to retigabine and ML-213 with the wild-type, indicated that are not the necessary for the activation response by retigabine and ML-213. These results demonstrated that Arg488, Arg490 and Trp242 in KCNQ4 participate in the effect of KCNQ4 current activation by ML-213 which is not so identical with retigabine,.

英文關鍵詞： ML-213 ; KCNQ activator ; mutations ; HEK293t ; molecular determinants.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告

期末報告

計畫名稱：探討 retigabine 相似物作用於 KCNQ4 蛋白之分子決定位與可能的結構作用關係

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2320-B-040-022

執行期間：101 年 8 月 01 日至 102 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：林明忠

共同主持人：

計畫參與人員：黃冠章, 房義順

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 102 年 10 月 29 日

Abstract

In recent years, retigabine (KCNQ activator) derivative drugs being developed for the treatment of epilepsy, migraine and neuropathic pain. It activates KCNQ K⁺ channels by inducing a large hyperpolarizing shift of steady-state activation. To explore retigabine derivative drugs (such as ML-213) in the acting on molecular determinants of KCNQ4, we predict and construct a series of variant plasmids. Therefore we can observe the response of these variant proteins to the treatment of retigabine derivative. We expressed KCNQ wild-type and these mutants in the mammalian HEK293t cell line. In previous study showed that mutations of R488A and R490A led to a complete loss of activation by retigabine (10 μM), likewise in the action of ML-213 (10 μM) was also found similar results. Since Arg488 and Arg490 in the cytoplasmic part are close to pore region, therefore the effect of retigabine and ML-213 in the activation of KCNQ4 may included the locus R488 and R490. As we known KCNQ2 Trp236 (homolog to KCNQ4 Trp242) in the cytoplasmic part of S5, considered as the gating hinge, was found to be crucial for the retigabine effect KCNQ4. However, KCNQ4 W242L is still sensitive to the effect of retigabine but not ML-213 in this study. It indicates different subtype of Kv7 proteins may result in different response to retigabine and ML-213. Other mutants L247A, L305A, R161A, R166A, S494A and A651X showed the similar results in response to retigabine and ML-213 with the wild-type, indicated that are not the necessary for the activation response by retigabine and ML-213. These results demonstrated that Arg488, Arg490 and Trp242 in KCNQ4 participate in the effect of KCNQ4 current activation by ML-213 which is not so identical with retigabine,.

Key words: ML-213 ; KCNQ activator; mutations; HEK293t; molecular determinants.

中文摘要:

近年來 retigabine (KCNQ 活化劑)的衍生藥物被開發用來治療癲癇、偏頭痛和神經性疼痛。KCNQ 活化劑主要是介由 KCNQ 鉀離子通道恆態活化曲線過極化的偏移而達到穩定神經細胞膜的作用。為了探討 retigabine 衍生藥物(如 ML-213: (*N*-(2,4,6-Trimethylphenyl) -bicyclo [2.2.1] heptane-2-carboxamide)作用在 KCNQ4 的分子決定位，我們預測並建構了一系列的變異質體。以便觀察這些變異蛋白對於處理 retigabine 衍生藥物所產生的反應。將這些變異質體分別表達於 HEK293t 細胞株中。之前的研究發現了 R488A 和 R490A 變異蛋白對於 retigabine 所產生活化的反應消失了(10 μ M)，同樣的在 ML-213 的作用中也發現了相似的結果。R488A 和 R490A 是位於細胞膜中靠近 KCNQ4 內面孔道的位置，因此 retigabine 與 ML-213 所產生的活化作用其在 KCNQ4 中的作用位點其中可能包括 R488 和 R490。已知 KCNQ2 的 Trp236 (與 Trp KCNQ4 同源) 位在 S5 段的細胞質端，被認為是 KCNQ2 開關的接點。而本實驗中發現 W242L 變異蛋白對於 ML-213 不具有反應性，這也顯示了不同 Kv7 蛋白亞型其對於 retigabine 與 ML-213 個別的反應性並不相同。其它的變異蛋白顯示 retigabine 與 ML-213 作用於 KCNQ4 所產生的反應與野生型相同，這些位點對於 retigabine 與 ML-213 產生活化的反應是非必要的。這些結果顯示 KCNQ4 的 Arg488， Arg490 與 Trp242 位點參與了 ML-213 活化 KCNQ4 電流的關鍵的位置，此點與 retigabine 不盡相同。

關鍵詞: ML-213; KCNQ 活化劑; 突變蛋白; HEK293t; 分子決定位。

Introduction

神經元的 Kv7 (或 KCNQ) 通道可以在亞閾值的膜電位範圍被激活。因為經由合成的化學作用劑激活這些通道可能會抑制細胞膜的興奮性，被認為在治療與細胞膜過度興奮性疾病，如癲癇症和神經性疼(Surti and Jan, 2005 ; Lawson and McKay, 2006)有所助益。相反，離子通道突變而失去功能將會導致良一些遺傳性的痙攣綜合病徵(Singh et al., 2003)。Kv7 (KCNQ)蛋白家族廣泛的表達於人體內不同的組織中(Brown, 2008)，Kv7 基因家族的變異會造成人類一些相關的疾病如肌無力症、聽覺障礙、心律不整、癲癇等等(Wang et al., 1996; Charlier et al., 1998; Singh et al., 1998; Biervert et al., 1998; Kubisch et al., 1999; Dedek et al., 2001; Wuttke et al., 2008)。早期 Kubisch 等人的研究就指出 Kv7 家族中的 KCNQ4 與聽覺功能有相關聯性。近年來的研究得知 Kv7 蛋白的活化藥物(activator or opener)在臨床上治療某些相關的疾病具有其價值。Kv7 激活藥物對於 Kv7 蛋白家族特別是 Kv7.2 與 Kv7.3 的分子作用決定位有初步的發現，然而專門探討 Kv7.4 的分子決定位則尚未有探討，畢竟它們彼此之間的保留性也只有四成左右，因此可能會造成分子決定位置的不同。活化劑藥物(activator)對 Kv7 管道蛋白的結合可能引發許多作用，包括穩定管道打開的蛋白結構和促進一系列的蛋白結構的改變以打開渠道。活化劑藥物的效力可能會受到通道蛋白胺基酸殘基的影響去改變或干擾活化劑引發的蛋白結構變化。胺基酸殘基對於活化劑藥物的重要性可以經由操作基因變異的方式來研究。這些活化劑 (小分子化學物質)的作用位置可以被劃分成二個類型：既結合位置和活化位置。目前研究藥物作用在蛋白的分子決定位置主要的研究方式是採取操作基因點突變(site-directed mutagenesis)和基因組合鑲嵌(recombinant chimeric)的方

式。目前為止這個實驗方法對於鑑別藥物作用的分子決定位置是比較可行的方法(Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005; Xiong et al., 2007)。主要是研究鑑別化合物作用於 Kv7 蛋白的關鍵胺基酸殘基是將胺基酸殘基突變成丙胺酸(alanine)的方式。例如 Seebohm 等人(2003)主要是探討 R-L3 藥物對於 Kv7.1 的增強作用的分子決定位置。他們操作從 S5 到 S6 胺基酸序段一系列的殘基變異去研究減少 R-L3 增強效力的關鍵位置(Seebohm et al., 2003)。與分子對接(Molecular Docking)分析結合，這些實驗揭露了 R-L3 的關鍵性胺基酸的殘基。開發設計一些小分子的有機化合物去活化離子通道對於臨床上介入某些疾病的治療是重要的策略。由於這些作用藥物的結合會導致蛋白的構形改變促進此蛋白的敏感度，因此去瞭解這些藥物作用在蛋白上的獲得功能的突變(Gain-of-function mutations)分子機制是一個有趣的課題。最近幾年使用基因變異分析 Kv 7 蛋白活化劑 retigabine 的分子作用決定機制已經被釐清(Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005)。Retigabine 對於 Kv7.2 至 Kv7.5 蛋白具有顯著的活化增效作用，但對於 Kv7.1 則不具有反應。研究發現蛋白質中的色胺酸(tryptophan, W) 236 與 270 位置對於 retigabine 作用於 Kv7.2~Kv7.5 是重要的位置，色胺酸突變為 leucine 結果使得 retigabine 對於 Kv7.2~Kv7.5 蛋白失去作用，有趣的是不具反應的 Kv7.1 將原來的 leucine 突變為色胺酸竟發現 retigabine 對於 Kv7.1 產生增效的作用(Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005)。很明顯地 retigabine 對於 Kv7.2 ~Kv7.5 媒介的增強作用色胺基酸殘基的保留性是必要的為。另外也發現一些殘基對 retigabine 要發揮效力的作用是有幫助的，包括在形成通道口的 S6 序段的甘胺酸(glycine)殘基對通道活化作用

是需要的(Wuttke et al., 2005)。此外 Kv7 活化劑丙烯醯胺類、BMS-204352、fenamates 與其衍生物、retigabine 與其衍生物、RL-3 (benzodiazepines 類) 和 zinc pyrithione 這些藥物大部份是探討 Kv7.2, Kv7.3 與 Kv7.1 較多，較少針對 Kv7.4(KCNQ4)做詳盡的探討，本篇主要是探討 ML-213 與 retigabine 作用在 Kv7.4 的分子決定位的研究並比較 ML-213 與 retigabine 之間的異同。我們操縱基因變異以

分析 Kv7 活化藥物作用於 Kv7.4 蛋白的分子決定位置(Su et al., 2006; Su et al., 2009)，建構了約 10 個 Kv7.4 基因變異質體，發現其中幾個蛋白變異點會對於 ML-213 與 retigabine 欲產生增效作用造成影響，其影響在 ML-213 與 retigabine 之間並不盡相同。

Materials and Methods

質體的建構與純化

我們使用 human KCNQ4/pcDNA3.1 用來表達於哺乳類的細胞株 HEK293t 中並來進行基因變異質體的建構基礎。

質體的抽取與純化：

轉型(transformation)：將質體以氯化鈣法轉型至大腸桿菌 (*Escherichia coli*, E.coli) DH5 α -component 菌株中。將帶有質體的 E. coli 於 4 ml LB 培養液 (10g NaCl, 10g Tryptone, 5 g Yeast extract, 1 L ddH₂O, 0.1 mg/ml Ampicillin) 中 37°C 培養 16 小時，以 GeneMark Plasmid Miniprep Plus purification kit 進行質體純化。取出的 Plasmid 以分光光度儀測定 Plasmid DNA 的濃度。再將抽出的 Plasmid DNA 置於 -20 °C 保存。

位置導向點突變技術 (Site directed point mutation)

利用建構好的 KCNQ4-pcDNA3.1 質體作為模板，跟據生物資訊方法預測出來的 Hot Spot，設計出中央具有突變點的 primer。再利用 PCR，以此 primer 複製出有目標突變點的 DNA。PCR 反應時需要的溶液包含 1 μ l Template DNA (100 ng)、1.25 μ l reverse primer (15 μ l)、5 μ l dNTP (2mM)、5 μ l 10X pfu reaction buffer、1 μ l PfuTurobo DNA polymerase (2.5 U/ μ l)、2 μ l DMSO (100%)、33.5 μ l 無菌的二次水，共 50 μ l。PCR 擴增 18

個循環。PCR 結束後，加入 1 μ l Dpn I，在 37°C 下反應 2 小時，將不含突變點的 Template DNA 切開，接下來進行轉型 (Transformation) 的步驟。最後再利用定序方式來確定突變點的存在。

HEK293t 細胞株培養與轉染

細胞株保存與培養：HEK293t 細胞株 (early stages) 冷凍保存所使用之培養液為含有 7% DMSO 之 DMEM 培養液，且細胞冷凍管中之細胞數目需大於 10⁶ cells/ml，並以緩慢降溫為細胞株冷凍保存之要點。HEK293t 細胞株解凍復甦應以快速解凍為要點，以 37°C 水浴於 5 分鐘內解凍完畢，並為減少作為抗凍劑所使用之 DMSO 影響細胞株存活率，解凍後以 2 倍冷凍體積之 DMEM 培養液稀釋之，並以 1000 rpm 離心 5 分鐘，抽除上層培養液後，以新鮮 DMEM 培養液懸浮細胞團塊後分盤培養之。

質體轉染 (transfection)：使用脂小體 (liposome) Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 為轉染至 HEK293t 細胞株之溶媒。將約 10⁶ 細胞數目培養於 3 ml 的 DMEM 培養液中培養 24 小時後進行轉染。將欲轉染之殖體 KCNQ4-pcDNA3.1 與 EGFP-pcDNA3.1 (比例約 10:1) 進行共同轉染 (co-transfection)，然後培養 24 至 48 小時後之細胞既可進行螢光觀測與全細胞電位鉗定之測量。

全細胞鉗定技術 (Whole cell patch-clamp)

本實驗以經由Invitrogen Lipofectamin LTX轉染 KCNQ4-pcDNA3.1 與 EGFP 質體 (10:1) 之 HEK293t細胞株進行全細胞電位鉗定。將轉染後24至48小時後之 HEK293t細胞株以 10^5 細胞數培養於24*32 mm SUPEØRIOR Micro Cover Glasses 蓋玻片上，置入37°C培養箱30分鐘待多數細胞貼附後將蓋玻片組裝至自製壓克力記錄盤(chamber)，並將DMEM培養液更換為記錄用細胞外溶液(extracellular solution)(140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4)，使用拉針器將玻璃管(Warner Instruments Inc. PATCH GLASS G85150T-3)以適當條件拉出2至5 MΩ阻抗的玻璃電極，並裝填細胞內溶液(intracellular solution)(110 mM KCl, 10 mM EGTA, 30 mM KOH, 5.1 mM CaCl₂, 2.8 mM MgCl₂, 3 mM ATP, 10 mM HEPES, pH 7.2) (Søgaard et al. 2001)，於Ziess Axioscope FS 2 plus 顯微鏡下以可見光與螢光模式進行實驗操作，本實驗以Axon Instruments Digidata 1440A數位類比轉換器連接Axon Instruments Multi Clamp 700B 鉗定放大器與pClamp 10.0 (Axon Instruments)軟體，並將所記錄電流訊號

結果與討論

KCNQ4經轉染於HEK293t cell上之驗證

人類KCNQ4基因經由Lipofectamine LTX試劑將質體轉染於HEK293t cell，我們使用西方墨點法驗證KCNQ4蛋白成功表達於HEK293t細胞株中。但是對照組單獨未處理的HEK293t細胞則無KCNQ4蛋白的表達。此外利用免疫細胞化學方法證實KCNQ4表達於HEK293t的細胞膜上(使用KCNQ4抗體螢光染色得知KCNQ4蛋白表達於HEK293t的細胞膜上)。

轉染於HEK293t cell上表達之KCNQ4鉀離子通道電流特徵

我們使用 KCNQ4-pcDNA3.1 與 EGFP 質體以

以數位形式儲存於電腦中。

本實驗使用的流程為，先將電位鉗定在-80 mV，目的為使離子通道恢復穩定，減少前次電位改變刺激的影響，接著進入電位改變區域，每次紀錄會有13次的連續刺激，依次測量的變動為提升10 mV，總共變動區間為由-80 mV至+40 mV，測量時間為2秒，最終電位鉗定在-30 mV，期間200毫秒，此部份產生的電流稱為尾電流(tail current)。

資料分析

利用 pClamp 10.0 紀錄的電流資料，以 Clampfit 10.0 軟體進行分析。在尾電流流程之中，利用尾電流部份可以推導出不同膜電位之下的離子通道開關頻率和紀錄到之電流成正比，是故可以利用電流來推算不同膜電位之下時的離子通道開關頻率。最後再使用 Two-state Boltzman Function: $I_{tail}(V_m) = I_{tail(max)} / \{1 - \exp[(V_{1/2} - V_m)/K]\}$ 來推算出 $V_{1/2}$ (當離子通道開關頻率為0.5時之膜電位)。 V_m 為當時之膜電位， K 為曲線斜率， $I_{tail(max)}$ 為最大尾電流。結果會以平均值 標準差 (mean±SEM)格式來呈現。

10:1的比例經由Lipofectamine LTX試劑共同轉染於HEK293t cell上，並利用轉染成功之細胞所發出之EGFP螢光訊號於螢光顯微鏡下進行篩選，挑選適當之細胞於光學顯微鏡下進行全細胞電位鉗定記錄。KCNQ4經由Lipofectamin LTX轉染於HEK293t cell上表達之鉀離子通道電流具有KCNQ家族離子通道典型之特性。將表達的KCNQ4離子通道電流記錄下，其記錄鉀離子電流的方式為依照電位鉗定流程，一開始將HEK293t細胞的膜電位鉗定在-80 mV，一次記錄總共會有13次階梯的連續電位刺激條件，每次刺激依序增加10

mV，變動區間由-80 mV至40 mV間變動，最後將HEK293t細胞的膜電位鉗定在-30 mV，並以Clampfit 9.2軟體分析尾電流找出其二分之一活化膜電位(half-activation voltage, $V_{1/2}$)的值。將多次實驗結果作平均，得到平均二分之一活化膜電位之數值。我們也以全細胞電位鉗定技術記錄了無轉染與僅轉染EGFP。結果顯示僅轉染EGFP與無轉染的HEK293t細胞皆無電位依賴型鉀離子電流產生，且僅轉染EGFP與無轉染的HEK293t細胞所產生的背景電流非常相似，可見僅轉染EGFP本身與無轉染的HEK293t細胞均無尾電流的產生，顯示EGFP用以作為轉染成功與否的篩選訊號，並不影響KCNQ4轉染於HEK293t細胞上表達鉀離子通道電流的特徵。

ML-213 對於 KCNQ4 鉀離子通道表達於 HEK293t 之影響

人類Kcnq4基因表達KCNQ4鉀離子通道電流於HEK293t並呈現KCNQ家族離子通道電流具有低閾值(low threshold)、無不活化(non-inactivating)、延遲性(delayed)與電位依賴性(voltage-dependent)特性(Fig. 1A. KCNQ4)。我們分析尾電流獲得二分之一活化膜電位(half-activation voltage, $V_{1/2}$)，將多次實驗結果作平均，得到的平均二分之一活化膜電位為 -13.1 ± 1.0 mV (n=13)，給予KCNQ開啟劑 ML-213 10 μ M，電流於5分鐘(Fig. 1B)與10分鐘(Fig. 1C)，有明顯增加的現象，所得到平均二分之一活化膜電位在10 min 時為 -25.2 ± 1.9 mV (n=6)。

ML-213 對於變異蛋白W242L之影響

KCNQ4-W242L是與KCNQ2-W236L為同源位點，在KCNQ2的實驗中得知retigabine (10-100 μ M)對於W236L變異蛋白之作用具有阻抗性(Schenzer et al., 2005)，然而在本實驗中卻發現retigabine (10 μ M) 對於KCNQ4-W242L仍具有活化反應性(Fig.2A-2B)，二分之一活化膜電位從 -21.2 ± 1.5 mV至 29.3 ± 2.1 mV (n=3)，

然而ML-213 10 μ M對於KCNQ4-W242L卻無顯著的作用(Fig. 2C-2D)。由此得知不同的KCNQ蛋白亞型(subtype, 如KCNQ2與KCNQ4)對於藥物的反應仍具差異性。

ML-213 對於變異蛋白R-488A之影響

本實驗中發現ML-213 10 μ M 對於KCNQ4-R488A變異蛋白並無顯著之作用(Fig.3)，給予ML-213 10 μ M 5分鐘(Fig. 3B)與10分鐘(Fig.3C)發現二分之一活化膜電位從 -13.2 ± 0.9 mV至 12.8 ± 0.7 mV (n=4)，並無明顯的差異。因此R488A可能是ML-213作用於KCNQ4產生增加反應的一個重要位點。

ML-213 對於變異蛋白R490A之影響

ML-213 10 μ M 對於KCNQ4-R490A變異蛋白並無顯著之作用(Fig.4)，給予ML-213 10 μ M 5分鐘(Fig. 4B)與10分鐘(Fig.4C)其電流大小並無顯著的變化，二分之一活化膜電位從 -14.2 ± 1.3 mV至 14.4 ± 1.5 mV (n=3)，並無意義的差異。因此R490A也可能是ML-213作用於KCNQ4上產生增加反應的一個重要位點。

ML-213 對於變異蛋白R492A之影響

ML-213 10 μ M 對於KCNQ4-R492A變異蛋白具有顯著之作用(Fig.5)。R492A變異蛋白在加了ML-213 (10 μ M)之後的5-10分鐘會產生顯著的反應(Fig.5A-5C)，顯示S492可能不是retigabine作用的關鍵性位點。

ML-213 對於變異蛋白R494A之影響

ML-213 10 μ M 對於S494A變異蛋白的作用與野生型(wild-type)並無顯著的差異。給予ML-213 10 μ M 5-10分鐘逐漸的增加電流的振幅大小(Fig.6A, before; and Fig.6B-6C after 5-10 min)，二分之一活化膜電位從 -11.6 ± 0.9 mV至 16.1 ± 1.2 mV (n=3)，顯示S494可能不是retigabine作用的關鍵性位點。

本篇研究藉由位置導向點突變技術(site

directed point mutation)將可能的ML-213作用點做位點突變為。結果顯示R488A和R490A與EGFP以10:1方式進行轉染HEK293t細胞，以全細胞電位鉗定技術進行記錄鉀離子電流對於ML-213產生的反應，與野生型相互比較發現電流大小與二分之一活化膜電位曲線均無明顯的變化 (Fig.5 和 Fig.6)，證實Arg488與Arg490對於ML-213要產生活化作用為重要的分子決定位。此外ML-213對於W242變異蛋白也並無產生作用，此點與retigabine之作用不同，retigabine仍然會對W242變異蛋白產生活化作用，證實不同亞型的KCNQ其關鍵作用結合位不盡相同。

A651del為無意突變(nonsense mutation)造成KCNQ4蛋白結構在第651個胺基酸至695個胺基酸共45個胺基酸的缺失，結果顯示A651del/EGFP(10:1)轉染HEK293t以全細胞電位鉗定技術可記錄到鉀離子通道電流，電流大小與二分之一活化膜電位與KCNQ4/EGFP(10:1)對於retigabine與ML-213的反應無明顯差異。由此可知KCNQ4第651位置之後對於retigabine與ML-213之作用無必

要性。

ML-213與retigabine對於R492A與S494A變異蛋白之作用仍產生活化作用(activation action)，因此初步推論R492A與S494A單一胺基酸突變所導致的變異與野生型相類似，可能R492與S494並不是ML-213與retigabine產生活化作用的關鍵位置。

有關於KCNQ4可能的ML-213與retigabine分子作用位點分析如下：

本實驗已完成ML-213與retigabine對於W242L, L247A, L305A, R161A, R166A, R488A, R490A, R492A, S494A and A651X等變異位點作用的研究，分析結果顯示Arg488和 Arg490對於ML-213與retigabine產生其活化的作用具有關鍵性，然而Trp242的變異蛋白不會對ML-213產生反應但卻會對retigabine產生反應性，此點可知不同的衍生物因其結構不同不一定會有相同的活化位點。

另外從A651del的變異蛋白得知Ala651之後的位置對於ML-213與retigabine要發揮作用並無重要的影響性。

参考文献(Reference)

- Bentzen BH, Schmitt N, Calloe K, Dalby Brown W, Grunnet M, Olesen SP (2006) The acrylamide (S)-1 differentially affects Kv7 (KCNQ) potassium channels. *Neuropharmacology* 51:1068-1077.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403-406.
- Brown DA (2008) Kv7 (KCNQ) potassium channels that are mutated in human diseases. *J Physiol* 586:1781-1783.
- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18:53-55.
- Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, Kunst H, Schatteman I, Van Velzen D, Meyers J, Ensink RJ, Verstreken M, Declau F, Marres H, Kastury K, Bhasin S, McGuirt WT, Smith RJ, Cremers CW, Van de Heyning P, Willems PJ, Smith SD, Van Camp G (1999) Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Mol Genet* 8:1321-1328.
- Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch TJ, Steinlein OK (2001) Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12272-12277.
- Dupuis DS, Schroder RL, Jespersen T, Christensen JK, Christophersen P, Jensen BS, Olesen SP (2002) Activation of KCNQ5 channels stably expressed in HEK293 cells by BMS-204352. *Eur J Pharmacol* 437:129-137.
- Gutman GA et al. (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55:583-586.
- Kamada F, Kure S, Kudo T, Suzuki Y, Oshima T, Ichinohe A, Kojima K, Niihori T, Kanno J, Narumi Y, Narisawa A, Kato K, Aoki Y, Ikeda K, Kobayashi T, Matsubara Y (2006) A novel KCNQ4 one-base deletion in a large pedigree with hearing loss: implication for the genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet* 51:455-460.
- Korsgaard MP, Hartz BP, Brown WD, Ahring PK, Strobaek D, Mirza NR (2005) Anxiolytic effects of Maxipost (BMS-204352) and retigabine via activation of neuronal Kv7 channels. *J Pharmacol Exp Ther* 314:282-292.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437-446.
- Lawson, K., and McKay, N. G. (2006) Are potassium channels realistic therapeutic targets? *Curr. Pharm. Des.* 12, 459-470.
- Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450:376-382.
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol* 120:663-676.
- Marks R, Pearse AD, Walker AP (1985) The effects of a shampoo containing zinc pyrithione on the

control of dandruff. *Br J Dermatol* 112:415-422.

Patten CD, Caprini M, Planells-Cases R, Montal M (1999) Structural and functional modularity of voltage-gated potassium channels. *FEBS Lett* 463:375-381.

Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, Attali B (2005) Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* 67:1053-1066.

Peretz A, Sheinin A, Yue C, Degani-Katzav N, Gibor G, Nachman R, Gopin A, Tam E, Shabat D, Yaari Y, Attali B (2007) Pre- and postsynaptic activation of M-channels by a novel opener dampens neuronal firing and transmitter release. *J Neurophysiol* 97:283-295.

Schenzer A, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch TJ, Grotzinger J, Schwake M (2005) Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci* 25:5051-5060.

Schroder RL, Jespersen T, Christophersen P, Strobaek D, Jensen BS, Olesen SP (2001) KCNQ4 channel activation by BMS-204352 and retigabine. *Neuropharmacology* 40:888-898.

Seeböhm G, Pusch M, Chen J, Sanguinetti MC (2003) Pharmacological activation of normal and arrhythmia-associated mutant KCNQ1 potassium channels. *Circ Res* 93:941-947.

Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18:25-29.

Singh, N. A., Westenskow, P., Charlier, C., Pappas, C., Leslie, J., Dillon, J., Anderson, V. E., Sanguinetti, M. C., and Leppert, M. F. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum (2003) *Brain* 126,2726–2737.

Su CC, Li SY, Yang JJ, Su MC, Lin MJ (2006) Studies of the effect of ionomycin on the KCNQ4 channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 348:295-300.

Su TR, Chen CH, Huang SJ, Lee CY, Su MC, Chen GH, Li SY, Yang JJ, Lin MJ (2009) Functional study of the effect of phosphatase inhibitors on KCNQ4 channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Acta Pharmacol Sin* 30:1220-1226.

Surti, T. S., and Jan, L. Y. (2005) A potassium channel, the M-channel, as a therapeutic target. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 6, 704–711.

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12:17-23.

Wu YJ, Boissard CG, Chen J, Fitzpatrick W, Gao Q, Gribkoff VK, Harden DG, He H, Knox RJ, Natale J, Pieschl RL, Starrett JE, Jr., Sun LQ, Thompson M, Weaver D, Wu D, Dworetzky SI (2004) (S)-N-[1-(4-cyclopropylmethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazin-6-yl)-ethyl]-3-(2-fluoro-phenyl)-ac

rylamide is a potent and efficacious KCNQ2 opener which inhibits induced hyperexcitability of rat hippocampal neurons. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1991-1995.

Wuttke TV, Seeböhm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H (2005) The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Mol Pharmacol* 67:1009-1017.

Wuttke TV, Penzien J, Fauler M, Seeböhm G, Lehmann-Horn F, Lerche H, Jurkat-Rott K (2008) Neutralization of a negative charge in the S1-S2 region of the KV7.2 (KCNQ2) channel affects voltage-dependent activation in neonatal epilepsy. *J Physiol* 586:545-555.

Xiong Q, Sun H, Li M (2007) Zinc pyrithione-mediated activation of voltage-gated KCNQ potassium channels rescues epileptogenic mutants. *Nat Chem Biol* 3:287-296.

Figures:

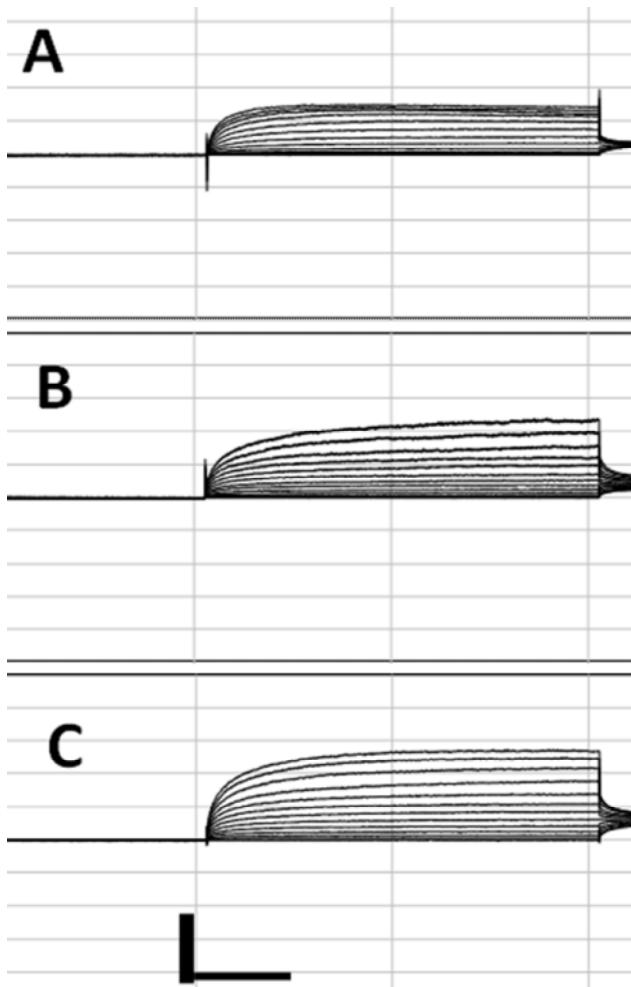


Fig.1 ML-213 sensitivity of wild-type channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4 (A) is shown before (A) and during perfusion with 10 μ M ML-213 (B, 5 min; C, 10 min). The voltage protocol is shown as in Materials and Methods. Scale: 2 nA; 1 sec.

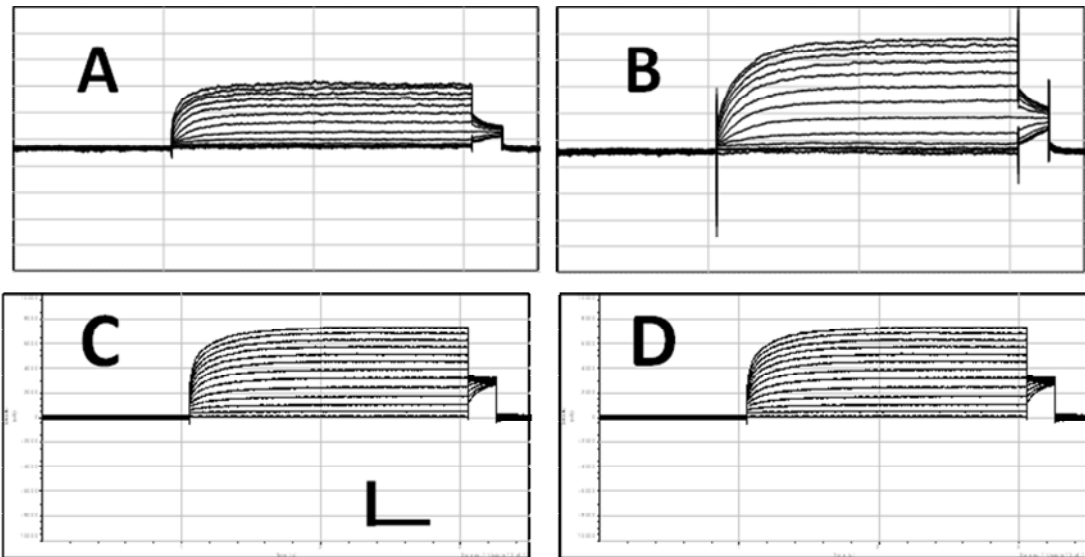


Fig.2 Retigabine and ML-213 sensitivity of KCNQ4-W242L channels. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-W242L (A) is shown before (A and C) and during perfusion with 10 μ M retigabine and 10 μ M ML-213 respectively (B and D; 10 min). Scale: A and B: 1.5 nA; 0.3 sec; C and D: 1.5 nA; 0.3 sec.

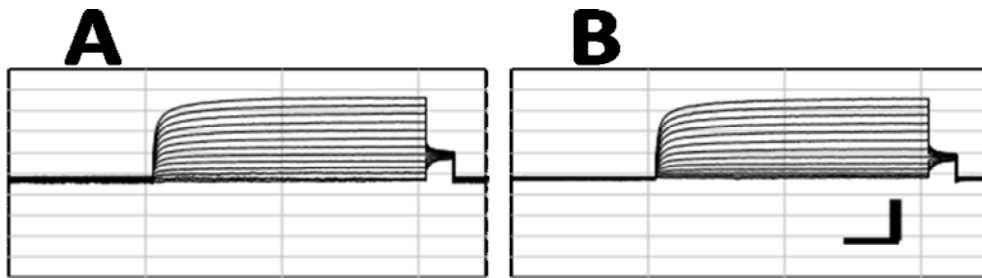


Fig.3 ML-213 sensitivity of KCNQ4-R488A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-R488A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10 μ M ML-213 (B, 10 min). Scale: 1.5 nA; 0.3 sec.

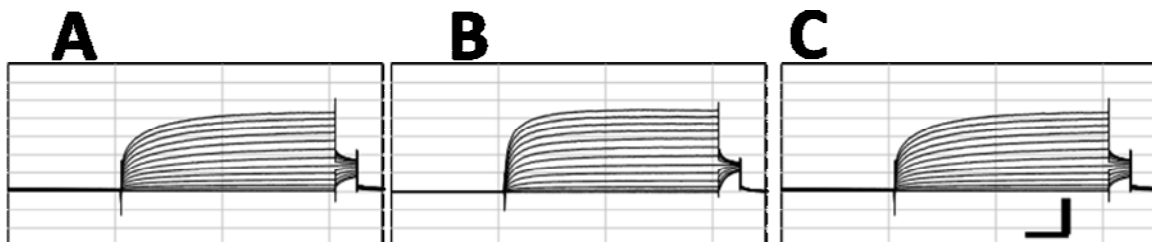


Fig.4 ML-213 sensitivity of KCNQ4-R490A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-R490A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10 mM ML-213 (B, 5 min; C, 10 min). Scale: 1.5 nA; 0.3 sec.

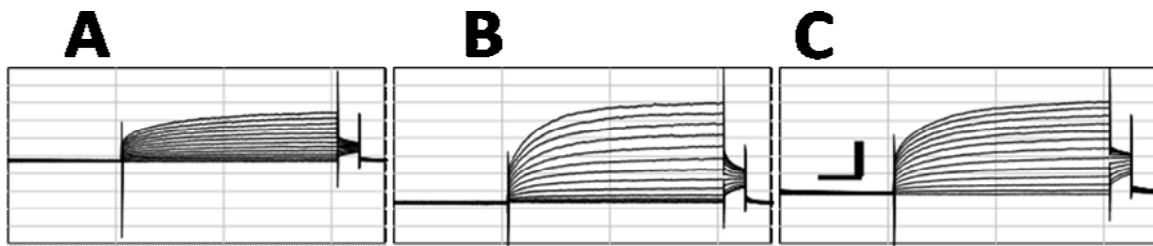


Fig.5 ML-213 sensitivity of KCNQ4-R492A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-R492A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10 μ M ML-213 (B, 5 min; C, 10 min). Scale: 1.5 nA; 0.3 sec.

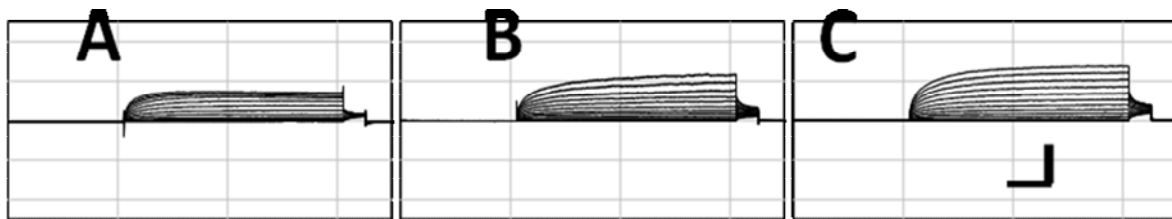


Fig.6 ML-213 sensitivity of KCNQ4-S494A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-S494A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10 μ M ML-213 (B, 5 min; C, 10 min). Scale: 1.5 nA; 0.3 sec.

計畫成果自評部分: 計畫之研究成果已完成此計畫”探討retigabine相似物作用於KCNQ4蛋白之分子決定位與可能的結構作用關係”之主題既retigabine相似物ML-213產生作用的幾個可能作用位點分子位點。分析結果顯示Arg488和 Arg490對於ML-213與retigabine產生其活化的作用具有關鍵性，然而Trp242對於ML-213產生其活化的作用具有關鍵性但retigabine卻不是。此點可知不同的衍生物因其結構不同，不一定會有相同的活化位點。較可惜的是我們今年 (民國102年8月)國科會計畫並未通過因此此一延續性的研究因此中斷。儘管如此此成果已寫成論文投稿中 (去年的部份成果已發表: Tzu-Rong Su, Wen-Shan Zei, Ching-Chyuan Su, George Hsiao and Min-Jon Lin* (2012). The effects of the KCNQ openers retigabine and flupirtine on myotonia in mammalian skeletal muscle induced by a chloride channel blocker. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 803082: 1-9.)

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/31

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討retigabine相似物作用於KCNQ4蛋白之分子決定位與可能的結構作用關係
	計畫主持人: 林明忠
	計畫編號: 101-2320-B-040-022- 學門領域: 藥學
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：林明忠		計畫編號：101-2320-B-040-022-					
計畫名稱：探討 retigabine 相似物作用於 KCNQ4 蛋白之分子決定位與可能的結構作用關係							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	1	1	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>(去年的部份成果已發表：Tzu-Rong Su, Wen-Shan Zei, Ching-Chyuan Su, George Hsiao and Min-Jon Lin* (2012). The effects of the KCNQ openers retigabine and flupirtine on myotonia in mammalian skeletal muscle induced by a chloride channel blocker. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 803082: 1-9.)</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

計畫成果自評部分：計畫之研究成果已完成此計畫'探討 retigabine 相似物作用於 KCNQ4 蛋白之分子決定位與可能的結構作用關係' 之主題既 retigabine 相似物 ML-213 產生作用的幾個可能作用位點分子位點。分析結果顯示 Arg488 和 Arg490 對於 ML-213 與 retigabine 產生其活化的作用具有關鍵性，然而 Trp242 對於 ML-213 產生其活化的作用具有關鍵性但 retigabine 卻不是。此點可知不同的衍生物因其結構不同，不一定會有相同的活化位點。較可惜的是我們今年（民國 102 年 8 月）國科會計畫並未通過因此此一延續性的研究因此中斷。儘管如此此成果已寫成論文投稿中。

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

對於未來治療神經疾病藥物之開發是有助益的，由於生理上 KCNQ 通道的重要位置具有作為藥物靶點的潛在作用，因此獲得的決定位置對於 KCNQ 通道活化藥物的開發具有一定的貢獻與幫助。我們從而確定何關鍵的氨基酸，為重要的 KCNQ 活化藥物作用的產生靈敏度具有貢獻（去年的部份成果已發表：Tzu-Rong Su, Wen-Shan Zei, Ching-Chyuan Su, George Hsiao and Min-Jon Lin* (2012). The effects of the KCNQ openers retigabine and flupirtine on myotonia in mammalian skeletal muscle induced by a chloride channel blocker. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 803082: 1-9.)