

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 探討乙苯胺鹽衍生物對於Kv7.4蛋白活性分析及聽力改善之相關性
------------	-----------------------------------

執行計畫學生：林建弘

學生計畫編號：MOST 106-2813-C-040-032-B

研究期間：106年07月01日至107年02月28日止，計8個月

指導教授：黃相碩

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系藥理學科

中華民國 107年05月24日

(一) 摘要

先天性非症候群聽障(Non-syndromic Autosomal Dominant deafness-2, DFNA2)是一種體染色體顯性遺傳疾病，其主要因素為 KCNQ4 鉀離子通道異常，臨床症狀為漸進式感覺神經聽力損失，目前在臨床上尚未有藥物治療的方法。KCNQ4 主要表現在內耳外毛細胞(outer hair cells)，透過去極化來調控聲音的敏感度。ML213 及 retigabine 為已知 KCNQ2 及 KCNQ4 鉀離子通道活化劑，本研究以 ML213 及 retigabine 作為結構藍圖，合成出可能對於 KCNQ4 鉀離子通道有活化作用的數種衍生物，其中 #5527086、#5540847、#5104864、#5245287、#9044864、#5541532 為 ML213 之衍生物，#5135540 為 retigabine 之衍生物，接著在表現 KCNQ4 鉀離子通道的 HEK293t 細胞株，使用全細胞電位鉗定技術(whole cell patch clamp)進行初步篩選，結果顯示 #5527086、#5540847、#5104864、#5135540 對於 KCNQ4 鉀離子通道有活化作用。研究接著進行斑馬魚毛細胞聽力保護實驗，測試其是否具有改善聽力損傷的作用？實驗結果顯示 #5135540 有聽力保護作用，在臨床上有發展為改善聽障的潛力。

(二) 研究動機與研究問題

生物體中，因為細胞膜內外帶電離子(Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等)的不均勻分布，在生理學上扮演著極為重要的角色(1)。離子通道是由細胞膜上的數個穿膜蛋白所構成，依離子通道開關特性可分成以下兩類：

A. 電壓控制型離子通道(Voltage-gated ion channel):此類離子通道是藉由細胞膜電位的改變來開啟或關閉。

B. 配體結合型離子通道(Ligand-gated ion channel):此類離子通道是藉由生化分子(乙醯膽鹼、GABA等)與離子通道膜蛋白結合，產生動作電位來進行調控(2)。

電壓控制型鉀離子通道 KCNQ(Kv7) 家族有五個成員：KCNQ1(Kv7.1)、KCNQ2(Kv7.2)、KCNQ3(Kv7.3)、KCNQ4(Kv7.4)、KCNQ5(Kv7.5)。KCNQ4 主要表現在內耳、心肌與血管平滑肌，由四個次單元組成，每個次單元由六個穿膜蛋白(S1-S6)組成，其中S1-S4為電壓感覺區域，S5-S6形成離子通道的孔洞(3,4)。若 KCNQ4 突變或異常，會有先天性非症候群聽障(Non-syndromic Autosomal Dominant deafness-2, DFNA2)、高血壓、癲癇(Epilepsy)等相關疾病(5)。先天性非症候群聽障是一種體染色體顯性遺傳疾病，隨著年齡的增長，對於聽覺障礙會逐漸加重，目前在臨床上尚未有藥物治療的方法(6,7)，只能透過戴助聽器及植入人工電子耳來改善日常生活的不便，然而人工電子耳相當昂貴，且植入手術具有侵襲性，而術後還需要花費很長的時間並投入相當多的人力、物力進行復健。相較於人工電子耳所需消耗的資源，藥物的使用可以直接針對缺陷的基因進行治療，對於臨床及醫學上有發展的潛力，本研究針對 KCNQ4(Kv7.4) 作為探討，尋找具有改善聽力損傷的作用之化合物，期望發展臨床上具有改善聽障的藥物。

N-(2,4,6-Trimethylphenyl)-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide (ML213) 是已知 KCNQ2 與 KCNQ4 鉀離子通道活化劑(8)，會放鬆大鼠的胸主動脈、腎動脈及腸系膜動脈(9)，對於電壓控制型鉀離子通道具有強效的活化能力。本研究以 ML213 及 retigabine 作為結構藍圖，利用 ChemBridge 篩選出可能對於 KCNQ4 鉀離子通道有活化作用的化合物，有以下四種化合物：

(A) N-(3-chloro-4-methylphenyl)bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide(編號#5527086)

(B) N-(4-iodo-2-methylphenyl)bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide(編號#5540847)

(C) N-3-pyridinylbicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide(編號#5245287)

(D) N-mesityl-4-biphenylcarboxamide(編號#5104864)

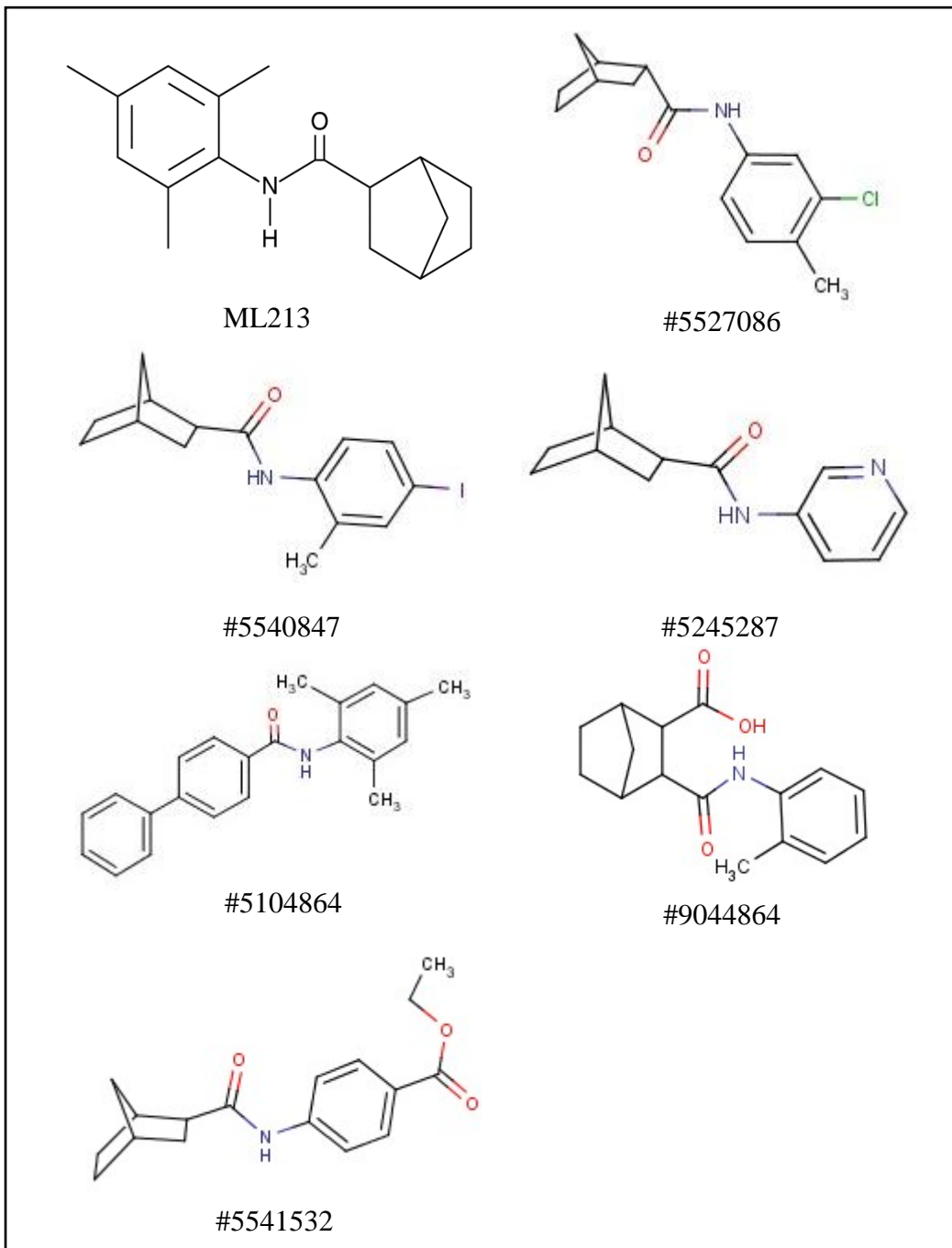
(E) 3-[(2-methylphenyl)amino]carbonylbicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid(編號#9044864)

(F) ethyl 4-[(bicyclo[2.2.1]hept-2-ylcarbonyl)amino]benzoate(編號#5541532)

(G) diethyl 1,4-phenylenebiscarbamate(編號#5135540)

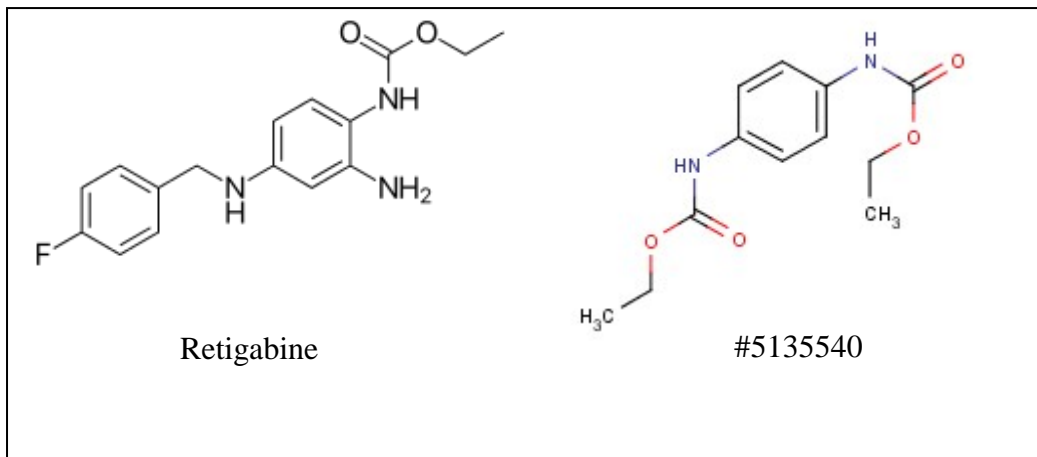
以有效促使 KCNQ4 鉀離子通道活化為篩選目標，利用全細胞電位鉗定技術初步篩選出有效的化合物，將有效的化合物再合成結構類似物，了解化合物的活性位置。之後進一步利用斑馬魚作為模式生物，將初步篩選出有效的化合物作用於斑馬魚內耳或側線系統的毛細胞，探討內耳 KCNQ4 鉀離子通道是否有活化及對於聽力障礙有無改善，也希望了解化合物最佳劑量以及對於細胞毒性的影響。

附件一



本研究 retigabine 作為結構藍圖，利用 ChemBridge 篩選出可能對於 KCNQ4 鉀離子通道有活化作用的化合物 #5135540

附件二



(三)文獻回顧與探討

先天性非症候群聽障(DFNA2)是一種體染色體顯性遺傳疾病，臨床的特徵為漸進式感覺神經聽力損失(10,11,12)，在症狀初期，會先對高頻率的聲音有一定的影響，十年內對於超過 60 分貝的中、低頻率的聲音也會受到影響，後期患者對於所有的頻率皆不敏感(12,13,14)。其主要原因為 KCNQ4 異常所致，KCNQ4 大量表現於人類內耳耳蝸柯蒂氏器(the organ of Corti)外毛細胞(outer hair cells)的基底膜(15)，會將外毛細胞內的鉀離子排到細胞膜外，引起去極化(depolarization)，之後支持細胞(supporting cells)透過鉀-氯的協同運輸(K^+ - Cl^- cotransporter)把鉀離子再送回外毛細胞內，維持外毛細胞膜電位的平衡，來調控對於聲音的敏感度(11,15,16,17)，而患有先天性非症候群聽障的病患會有 KCNQ4 鉀離子通道慢性去極化的現象，隨著病情的加重，鉀離子排出外毛細胞產生去極化的現象漸漸失去(10,11)。雖然先天性非症候群聽障的作用機轉已經被研究的相當明確，但其治療的方法仍受到限制，對於多數患有此病症的患者造成日常生活的不便利，而新型藥物的開發是本研究努力的目標。

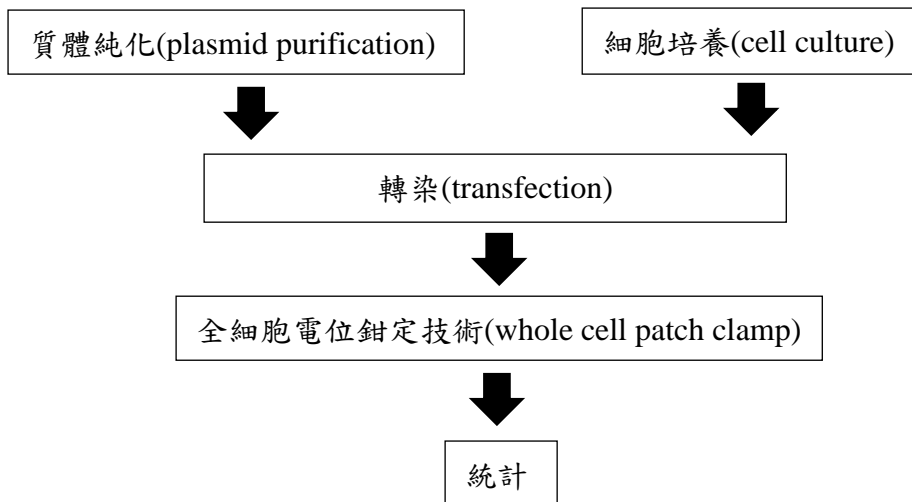
近數十年以來，斑馬魚對於許多領域都作為一個重要的模式生物，例如：發育生物學、遺傳學、生理學、毒理學與環境基因體學等(18)，由於斑馬魚有以下的優點：a. 尺寸小，飼養空間小 b. 生長週期短，發育快 c. 透明胚胎，容易觀察操作 d. 子代數量多，易進行高通量篩選，成本較低等(19)。雖然斑馬魚沒有外耳與中耳的構造及哺乳類動物保有的特化聽覺器官-耳蝸，其耳朵的構造在解剖學上與哺乳類動物有明顯的差異。但斑馬魚與人類之間在基因遺傳同源性有高度相似(20)，亦擁有與哺乳類動物相同的內耳，且外毛細胞的構造與功能與哺乳類動物有高度保留性。

另外，斑馬魚還有一個對於外毛細胞研究的優勢-側線系統(lateral line system)，是由一連串稱為神經丘(neuromasts)的感覺器官組成，神經丘內的外毛細胞與內耳的外毛細胞在結構與功能上非常相似，只是位於皮膚表面，對於直接觀察與實驗的操作上相對而言方便許多，因此大多斑馬魚外毛細胞的研究是使用側線系統的外毛細胞，而不是內耳的外毛細胞(17)。這些條件使得斑馬魚可以作為研究聽力損傷的生物模式。

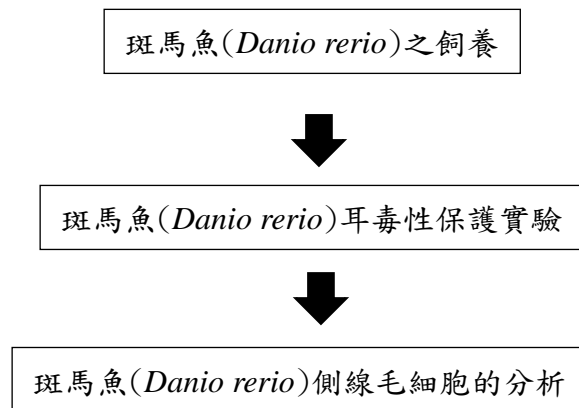
(四)研究方法及步驟

研究流程大綱

(I)



(II)



細胞培養(cell culture)-繼代培養

細胞長到七、八成滿即可繼代培養，首先觀察細胞的狀態是否良好，將舊的 medium(10%FBS，900ml DMEM、100ml FBS、10ml glutamax、10ml NaHCO₃)全部吸出，加入 4ml PBS:NaCl 13.7、KCl 0.26、KH₂PO₄ 14.6、Na₂HPO₄ 1.52(mM),pH=7.2 沖洗 dish，之後吸出，共沖洗兩次，再加入 500μl Trypsin(TE,胰蛋白酶)，放置 37°C 培養箱中作用 3~5 分鐘，使細胞的黏著蛋白切除，讓細胞呈現球形的漂浮狀態，之後加入 2.5ml medium 中止 TE 作用，把細胞全部吸到 15ml 離心管中，以每分鐘 800 轉速、25°C 離心 3 分鐘，使細胞附著在離心管底部，倒掉上清液後，加入 1 ml medium 打散細胞團塊，取適量細胞種回已加入 3ml medium 的 dish 中，放回 37°C 培養箱中。

質體純化(plasmid purification)

將大腸桿菌於 5ml LB(yeast extract、tryptone、NaCl) 放置在培養箱，以 37°C、每分鐘 150-200 的轉速培養 12-16 小時。利用 GeneMark 的 Plasmid Miniprep Plus Purification Kit 來質體純化。首先把大腸桿菌菌液 5ml 分次加入 2ml tube，以每分鐘 5000 的轉速，離心 5 分鐘，把上清液倒掉。加入 200μl solution I (glucose、EDTA、Tris-HCl、RNase)，vortexing 或 pipetting 直到附著於 tube 底部的大腸桿菌

菌塊完全不見。再加入 200 μ l solution II (SDS、NaOH)，輕輕搖晃 tube 5 次，使細胞膜瓦解與 DNA 和蛋白質變性，液體會逐漸變清澈。最後加入 200 μ l solution III (Sodium acetate, 醋酸鈉)，質體 DNA 可立即恢復成雙股 DNA，並有白色固體(蛋白質、RNA、染色體 DNA 等雜質)析出，再以最高轉速每分鐘 13000 轉離心 13 分鐘，使白色固體雜質附著於 tube 底部。把上清液分 3 次，每次 200 μ l 加入插在 collection tube 上的 spin column，以最高轉速離心 1 分鐘，倒掉 collection tube 的液體，此時質體 DNA 已經濃縮在 spin column 上。再加入 500 μ l Endotoxin Removal Wash Solution，等待 2 分鐘，使 solution 與殘留的內毒素完全作用，以最高轉速離心 1 分鐘，倒掉 collection tube 液體。再加入 700 μ l washing solution，以最高轉速離心 1 分鐘，丟掉 collection tube 液體，此步驟共兩次。最後空轉 5 分鐘，排除不要的液體。將 spin column 移至 1.5ml tube，加入 50 μ l Elution solution，等待 2 分鐘，讓 solution 與質體 DNA 作用完全，以最高轉速離心 1 分鐘，最終產物就是我們要的質體 DNA，把質體 DNA 測吸光值(O.D 值)，比值 A260/A280 介於 1.8-2.0 最為理想，若小於 1.8 表示蛋白質雜質較多。

轉染(transfection)

將 1.5ml tube①、②各加入 250 μ l 無血清 medium(DMEM)，提供作用時所需的養分，tube①以 10:1 的比例加入質體純化出來的質體 DNA(wild-type)與 EGFP(綠螢光蛋白質體)，作用 5 分鐘，使質體作用完全；tube②加入 8 μ l Lipofectamine 2000 Reagent，把 tube①加到 tube②，作用 20 分鐘後，加入細胞中，利用 liposome(脂小體)把所要的質體送入細胞內。6-8 小時後要更換 medium，防止 Lipofectamine 2000 Reagent 轉染造成細胞死亡的現象。

全細胞電位鉗定技術

HEK293t 轉染 wild-type KCNQ4 或點突變質體與 EGFP，轉染後放置 24-36 小時，同細胞繼代培養步驟，最後在 dish 裡放入 24x32mm 圓形蓋玻片，使細胞均勻散布於蓋玻片，放置 37 $^{\circ}$ C 培養箱 2 小時，即可操作全細胞電位鉗定技術，將蓋玻片以矽油黏貼在自製壓克力盤(chamber)上，加入 3ml 細胞外液(extracellular solution)：NaCl 140、CaCl₂ 2、KCl 4、HEPES 10、MgCl₂ 1(mM), pH=7.4，用拉針器將玻璃管以適當條件拉出 2-4M Ω 電阻的玻璃電極，並填充細胞內液(intracellular solution)：KCl 110、CaCl₂ 5.1、KOH 30、EGTA 10、MgCl₂ 2.8、HEPES 10(mM), pH=7.2，在顯微鏡(ZIESS AXIOSKOP2 FS plus)下以可見光與螢光模式進行電生理實驗，先將細胞鉗定在 -80mV，使離子通道處於較穩定的狀態，減少先前電位刺激的影響，接著會有 13 次的連續性刺激，每一次增加 10mV，變化區間為 -80mV 到 +40mV，時間為 1200ms，變化區間後，最後鉗定在 -30mV，時間為 200ms，此區間產生的電流稱為尾電流(tail current)。實驗記錄利用 AXON Instruments Digidata 1440A 數位類比轉接器連接 AXON Instruments Multi Clamp 700B 鉗定放大器與 pClamp 10.0(AXON Instruments)軟體，將實驗結果紀錄於電腦。

斑馬魚聽力

1. 斑馬魚(*Danio rerio*)之飼養

我們將綠螢光基因型斑馬魚 Tg(*pvalb3b* : *TagGFP*)及野生型斑馬魚 (AB strain) 一同飼養於 28 $^{\circ}$ C 恆溫系統中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食

2. 斑馬魚(*Danio rerio*)耳毒性保護實驗

本實驗利用 Tg(*pvalb3b* : *TagGFP*) 轉殖螢光魚品系進行藥物處理試驗)。首先利用 4dpf 的轉殖基因魚 Tg(*pvalb3b*:*TagGFP*) 胚胎進行藥物#5527086、#5540847、#5104864 及#5135540 對 neomycin 耳毒性之保護性試驗，每盤 20 隻，作用濃度分別為控制組(不加#5527086、#5540847、#5104864、#5135540 及 neomycin)、0 μ M、3 μ M、10 μ M 及 30 μ M 和 100 μ M，作用體積均為 5ml。藥物配好之後，用 vortex

機震盪混合均勻，將加藥盤中蛋水盡量吸乾，將不同濃度的藥物加進相對應的組別中並拿至培養箱中避光作用 1 小時，再將 50 μ M neomycin 加進各組中，再放到 28 $^{\circ}$ C 培養箱避光處理 30 分鐘，藥物處理作用後將加藥盤從培養箱拿出來，把盤內藥物混和液吸出，利用蛋水反覆清洗盤內殘留的藥物，此步驟重複四次。

3. 斑馬魚 (*Danio rerio*) 包埋

(1) 配 0.5% 的 agarose 膠:

先取 50ml 的燒杯加 20ml 的二次水，再取稱量紙稱量 agarose 粉末 0.1 克，小心將粉末倒入二次水，取適當大小的保鮮膜蓋住燒杯，在保鮮膜上戳幾個洞，再放進微波爐微波，直到杯內澄清沒有膠狀物即可，微波完，放入 65 $^{\circ}$ C 定溫箱持續保溫。同時取一個新的 eppendorf 插入定溫加熱器，其溫度維持在 55 度左右，並把 eppendorf 內填入剛剛微波好的膠。

(2) 包埋:

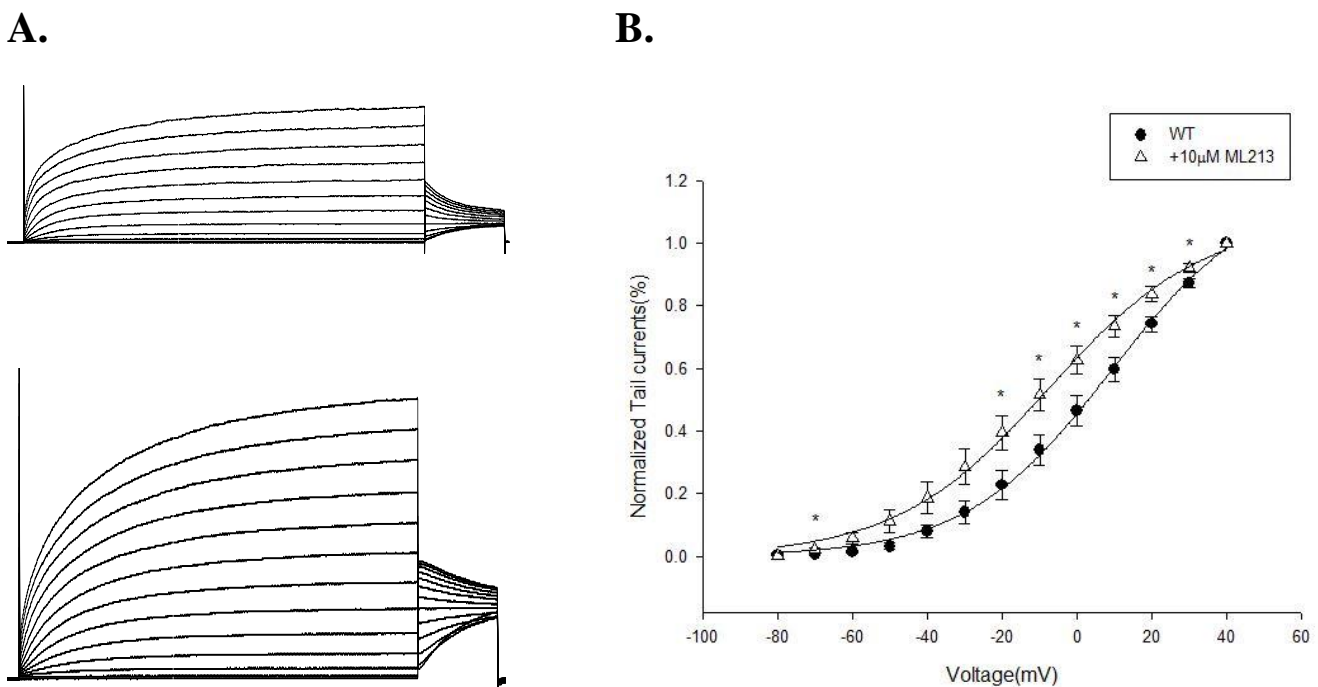
將魚吸到放有包埋盤的顯微鏡載物台上，吸取適量膠滴到要包埋的地方並利用針頭將魚調整至 45 度角，再利用倒立螢光顯微鏡下進行觀察。

4 斑馬魚 (*Danio rerio*) 側線毛細胞的分析方式

轉殖螢光魚經藥物 #5527086、#5540847、#5104864、#5135540 與 neomycin 作用後，以倒立顯微鏡觀察側線毛細胞的螢光表現情形，並固定計數 3 點前側線 (O、OC、MI) 和 3 點後側線 (P1、P2、P3) 的毛細胞數目，經個體平均化後即可得到各組毛細胞的總平均數，最後利用統計分析網頁 VassarStats，以 *t* 檢定計算各組之間的差異性而得到，*P* value 及統計圖。

(五) 結果

圖(一)、圖(二)顯示 ML213 與 retigabine 皆為 KCNQ4 鉀離子通道活化劑。

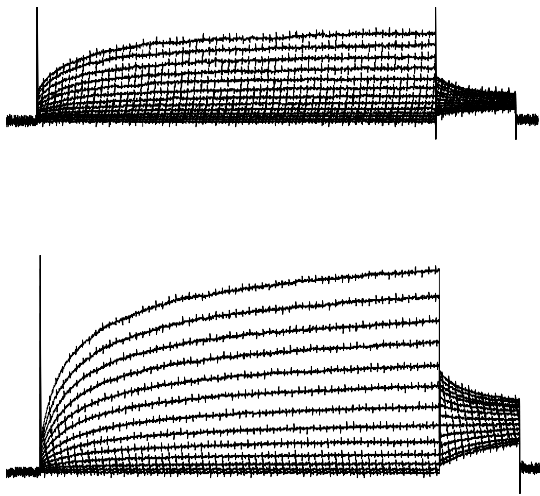


圖(一) ML213 對於 KCNQ4 鉀離子通道之影響

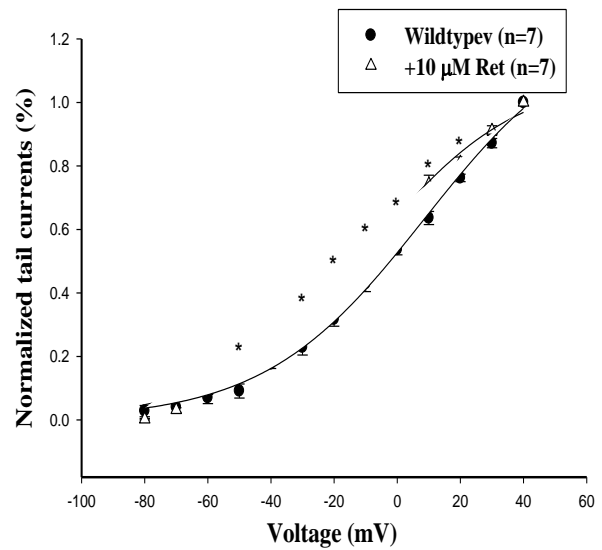
A. 投予 ML213 前之電流 (上)，投予 ML213 後之電流 (下)。

B. 以平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計，結果顯示投予 ML213 的活化曲線有負移的情況。

A.



B.



圖(二) Retigabine 對於 KCNQ4 鉀離子通道之影響

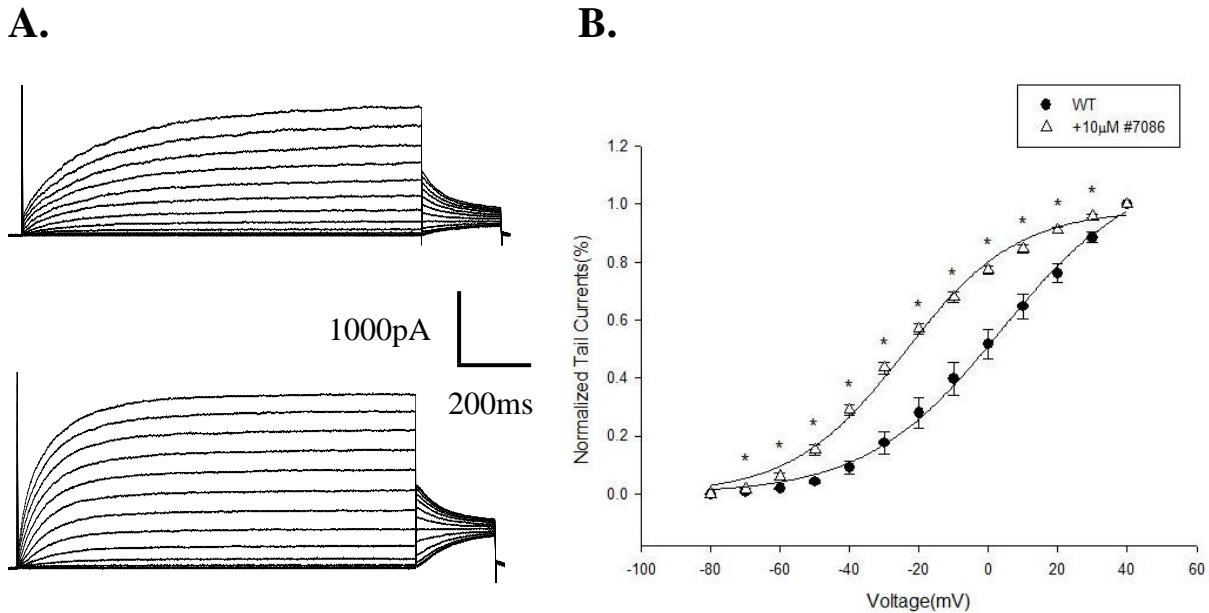
A. 投予 retigabine 前之電流 (上)，投予 retigabine 後之電流 (下)。

B. 以平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計，結果顯示投予 retigabine 有負移的情況。

#5520786、#5540847、#5104864、#5245287、#9044864 及 #5541532 皆為 ML213 之衍生物，其中 #5520786、#5540847 及 #5104864 對 KCNQ4 鉀離子通道有活化作用，而 #5245287、#9044864、#5541532 對 KCNQ4 鉀離子通道無作用，實驗結果如表(一)、圖(三)至圖(八)所示。

ML213 衍生物	對 KCNQ4 鉀離子通道之影響
#5527086	↑
#5540847	↑
#5104864	↑
#5245287	-
#9044864	-
#5541532	-

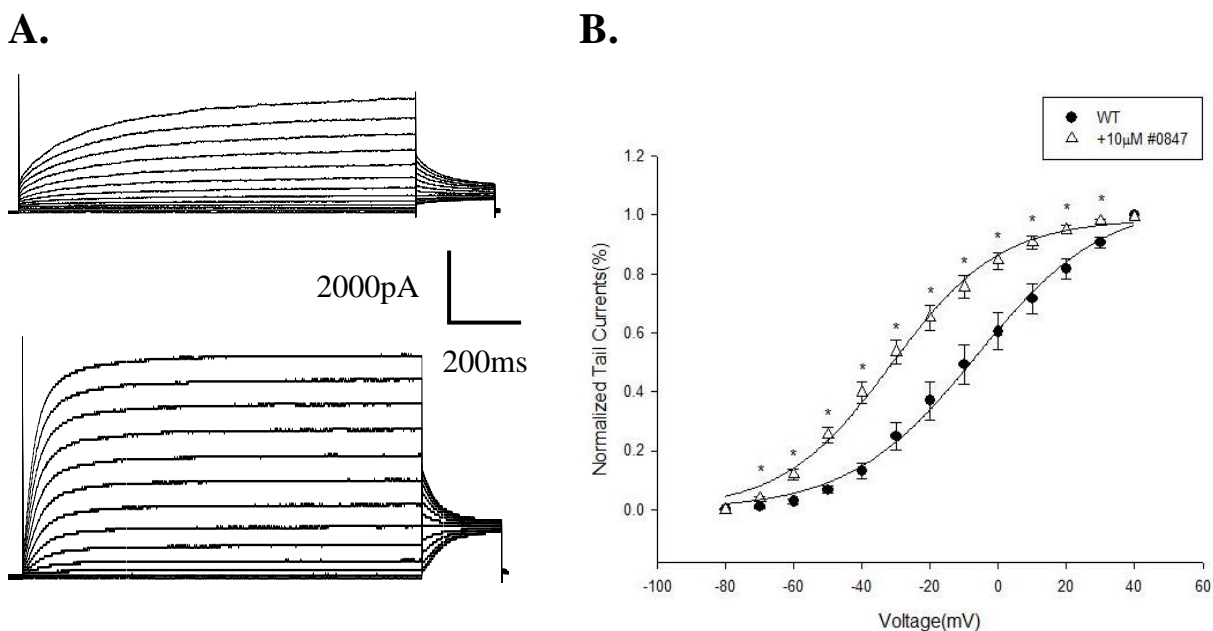
表(一)



圖(三) #5527086 對於 KCNQ4 離子通道之影響(n=7)

A. 投予 #5527086 前之電流(上), 投予 #5527086 後之電流(下)。

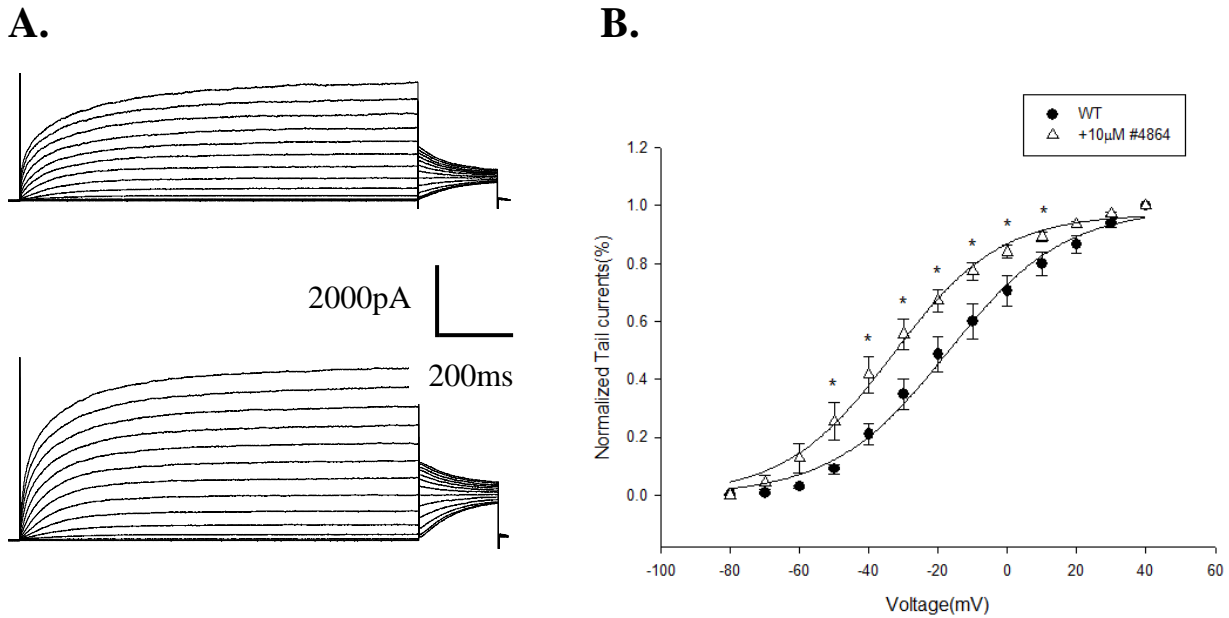
B. 平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計, 結果顯示投予 #5527086 的活化曲線有負移的情況。



圖(四) #5540847 對於 KCNQ4 離子通道之影響(n=6)

A. 投予 #5540847 前之電流(上), 投予 #5540847 後之電流(下)。

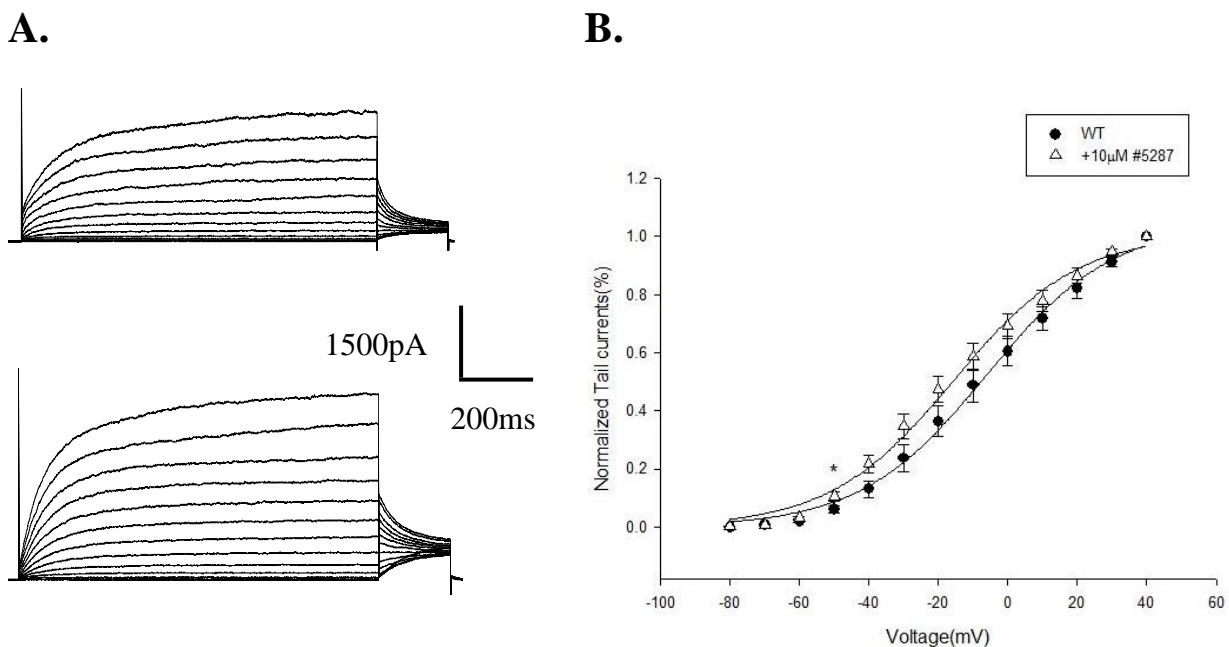
B. 平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計, 結果顯示投予 #5540847 的活化曲線有負移的情況。



圖(五) #5104864 對於 KCNQ4 離子通道之影響(n=7)

A. 投予 #5104864 前之電流(上)，投予 #5104864 後之電流(下)。

B. 平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計，結果顯示投予 #5104864 的活化曲線有負移的情況。

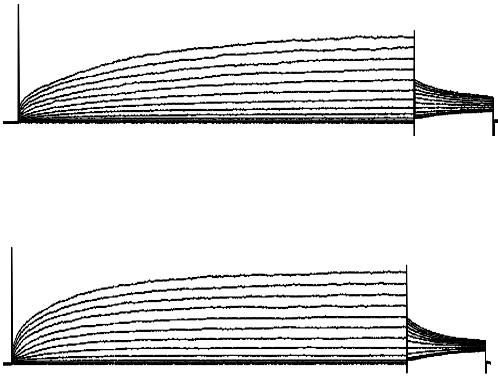


圖(六) #5245287 對於 KCNQ4 離子通道之影響(n=7)

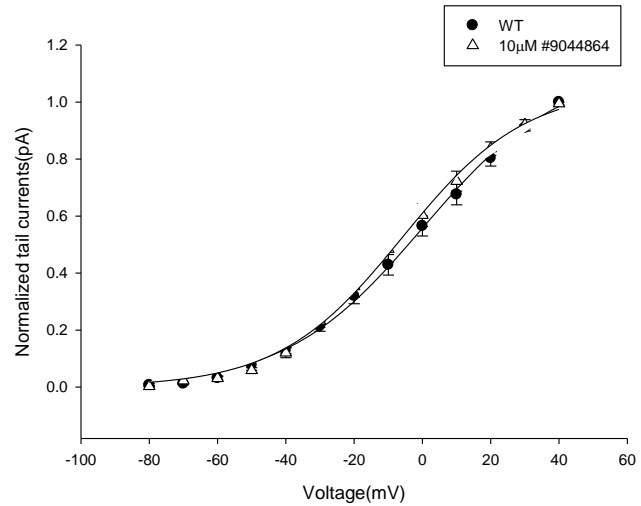
A. 投予 #5245287 前之電流(上)，投予 #5245287 後之電流(下)。

B. 平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計，結果顯示投予 #5245287 的活化曲線無顯著差異。

A.



B.

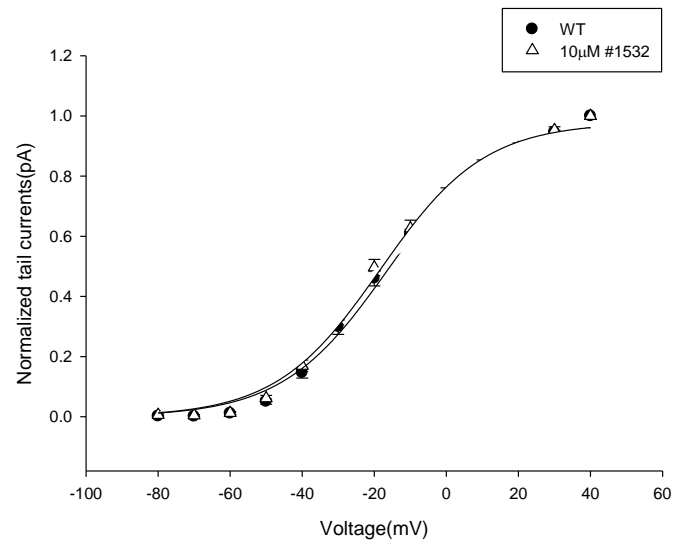
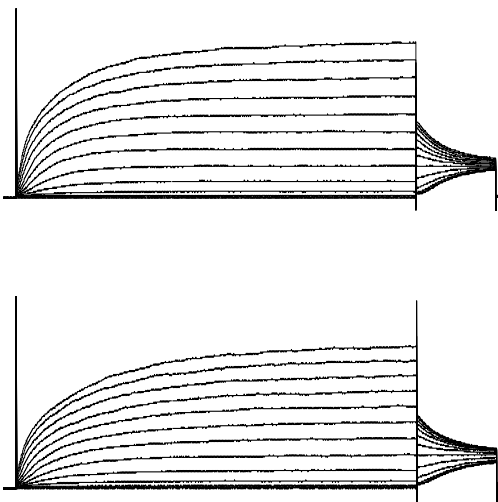


圖(七) #9044864 對於 KCNQ4 鉀離子通道之影響(n=7)

A. 投予 #9044864 前之電流 (上)，投予#9044864 後之電流 (下)。

B. 以平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計，結果顯示投予 #9044864 沒有負移的情況。

A.



圖(八) #5541532 對於 KCNQ4 鉀離子通道之影響(n=6)

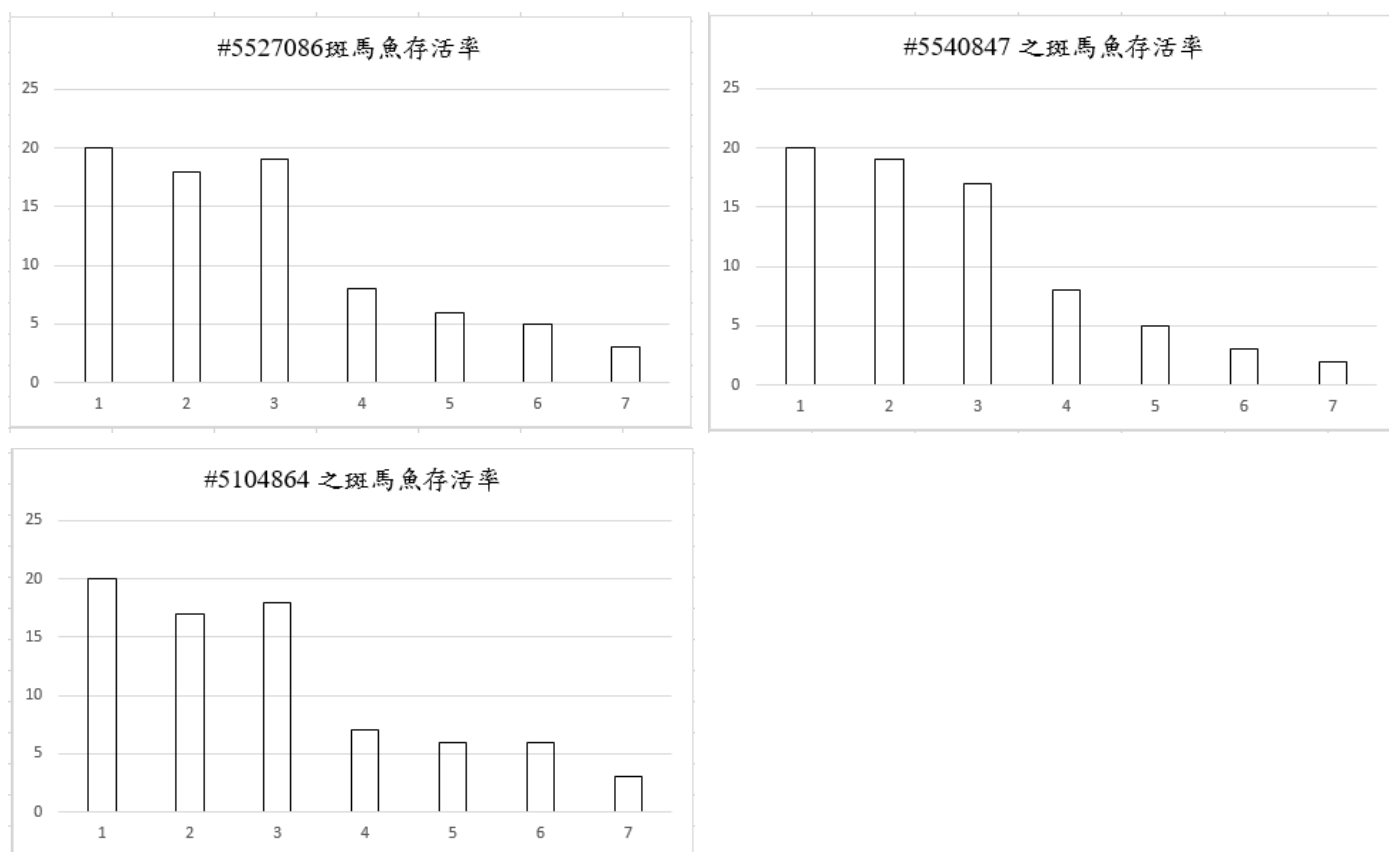
A. 投予 #5541532 前之電流 (上)，投予 #5541532 後之電流 (下)。

B. 以平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計，結果顯示投予 #5541532 沒有負移的情況。

將對 KCNQ4 有活化作用的三種 ML213 之衍生物進行斑馬魚毛細胞保護實驗，以每組 20 隻 4 dpf 斑馬魚進行實驗，結果發現斑馬魚存活率低，表示此三種衍生物毒性過強，無發展成為臨床藥物的潛力。

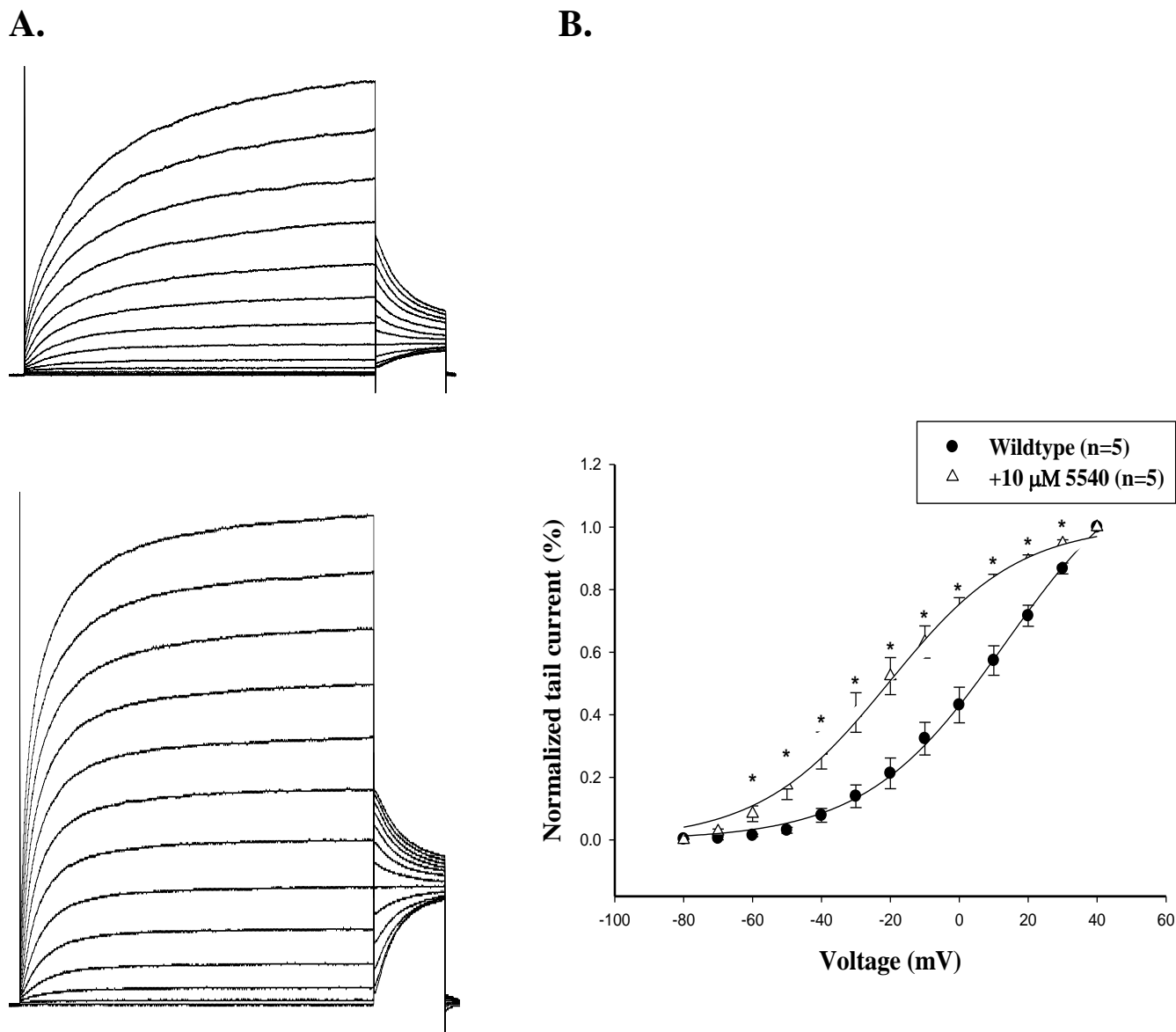
	1	2	3	4	5	6	7
Neomycin(μM)	-	50	50	50	50	50	50
DMSO	-	-	+	+	+	+	+
#5527086(μM)	-	-	-	3	10	30	100
#5540847(μM)	-	-	-	3	10	30	100
#5104864(μM)	-	-	-	3	10	30	100

圖(九)中 x 軸 1-7 所表示的含意



圖(九) ML213 之衍生物之斑馬魚存活率(x 軸為各濃度 #5527086 、 #5540847 及 #5104864 對斑馬魚之影響)

#5135540 為 retigabine 之衍生物，對 KCNQ4 鉀離子通道亦有活化作用，實驗結果如圖(十)所示。



圖(十) #5135540 對於 KCNQ4 鉀離子通道之影響

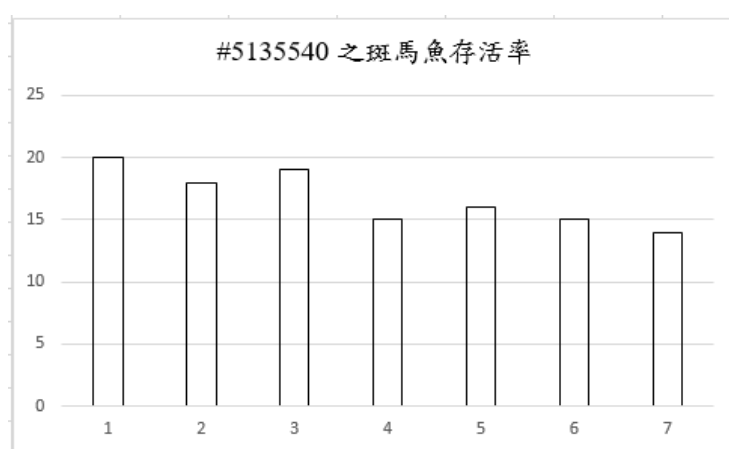
A. 投予 #5135540 前之電流 (上)，投予 #5135540 後之電流 (下)。

B. 以平均離子通道 $V_{1/2}$ 統計，結果顯示投予 #5135540 的活化曲線有負移的情況。

將對 KCNQ4 有活化作用的之 retigabine 衍生物進行斑馬魚毛細胞保護實驗，以每組 20 隻 4 dpf 斑馬魚進行實驗，結果發現斑馬魚存活率高，表示此衍生物毒性低，有發展成為臨床藥物的潛力，故繼續進行後續毛細胞的實驗。

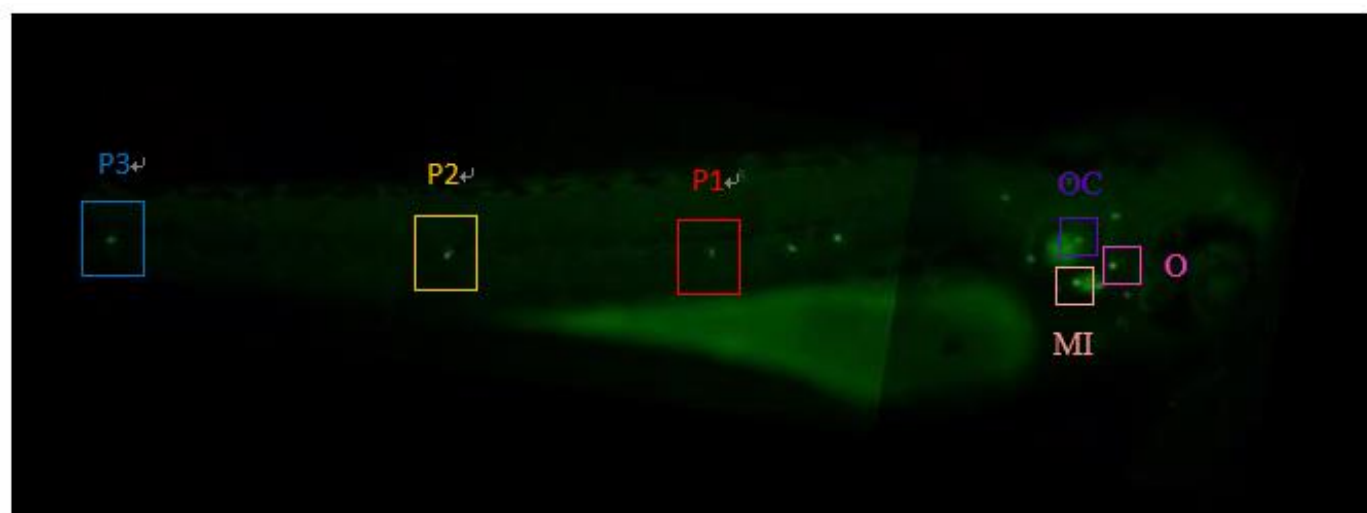
	1	2	3	4	5	6	7
Neomycin(μM)	-	50	50	50	50	50	50
DMSO	-	-	+	+	+	+	+
#5135540(μM)	-	-	-	3	10	30	100

圖(十一)中 x 軸 1-7 所表示的含意



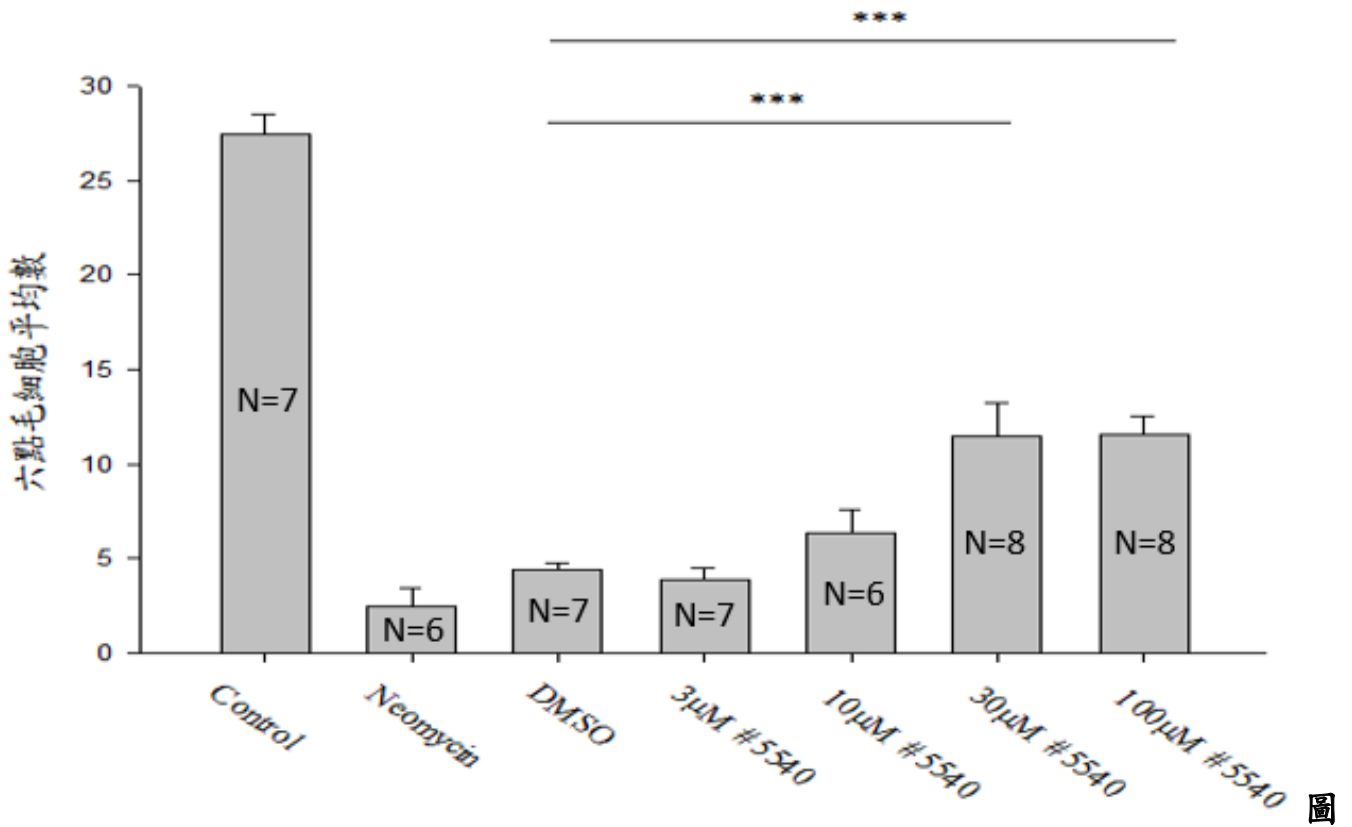
圖(十一) Retigabine 之衍生物之存活率 (x 軸為各濃度 #5135540 對斑馬魚之影響)

利用斑馬魚作為模式生物，測試 #5135540 對於斑馬魚 3 點前側線(MI、O、OC)及 3 點後側線(P1、P2、P3)毛細胞的保護作用。



圖(十二) 斑馬魚毛細胞位置示意圖

Neomycin(μM)	-	50	50	50	50	50	50
DMSO	-	-	+	+	+	+	+
5540(μM)	-	-	-	3	10	30	100
MI							
O							
OC							
P1							
P2							
P3							



(十三) #5135540 對斑馬魚之影響

實驗結果顯示 30 μM 及 100 μM 的 #5135540 對於毛細胞有保護作用，並在統計上達顯著差異 ($p < 0.005$)。

(六)討論:

ML213 為已知 KCNQ2 及 KCNQ4 鉀離子通道活化劑，會放鬆大鼠的胸主動脈、腎動脈及腸系膜動脈。Retigabine 為已知 KCNQ2-KCNQ5 鉀離子通道活化劑，在臨床上已用來治療癲癇，但有對眼睛色素細胞傷害的副作用。本研究亦再次證明 ML213 與 retigabine 為 KCNQ4 鉀離子通道活化劑，並以 ML213 及 retigabine 作為結構藍圖，合成數種結構衍生物。#5520786、#5540847、#5104864、#5245287、#9044864 及 #5541532 皆為 ML213 之衍生物，其中 #5520786、#5540847 及 #5104864 對 KCNQ4 鉀離子通道有活化作用，而 #5245287、#9044864、#5541532 對 KCNQ4 鉀離子通道無作用。先前研究指出耳朵內耳外毛細胞有許多 KCNQ4 鉀離子通道分布，故想探討 ML213 及 retigabine 之衍生物對於聽力是否有改善作用。接著將三種對 KCNQ4 鉀離子通道之衍生物#5520786、#5540847、#5104864 進行斑馬魚毛細胞聽力保護實驗，但此三種衍生物對 4dpf 斑馬魚之存活率低，死亡率過高，表示此三種衍生物毒性過高，沒有發展成臨床藥物之潛力。#5135540 為 retigabine 之衍生物，亦對 KCNQ4 鉀離子通道有活化作用，接著進行斑馬魚毛細胞聽力保護實驗，實驗發現#5135540 對 4dpf 斑馬魚之存活率高，有發展成臨床藥物之潛力，故繼續進行後續斑馬魚毛細胞聽力保護實驗，測試 #5135540 對於斑馬魚 3 點前側線(MI、0、OC)及 3 點後側線(P1、P2、P3)毛細胞的保護作用，實驗結果顯示 30 μ M 及 100 μ M 的#5135540 對毛細胞有保護作用，並在統計上達顯著差異，表示#5135540 對於聽力之改善有發展潛力。

(七)參考文獻

1. Richard E. Klabunde.(2016) Cardiac electrophysiology: normal and ischemic ionic currents and the ECG. *Adv Physiol Educ* 41: 29–37.
2. Christophe J. Moreau, Jean Revilloud, Lydia N. Caro, Julien P. Dupuis, Amandine Trouchet, Argel Estrada-Mondragón, Katarzyna Nieścierowicz, Nicolas Sapay, Serge Crouzy & Michel Vivaudou.(2016) Tuning the allosteric regulation of artificial muscarinic and dopaminergic ligand-gated potassium channels by protein engineering of G protein-coupled receptors. *Scientific Reports* 7, Article number: 41154
3. Ernesto Vargas, Vladimir Yarov-Yarovoy, Fatemeh Khalili-Araghi, William A. Catterall, Michael L. Klein, Mounir Tarek, Erik Lindahl, Klaus Schulten, Eduardo Perozo, Francisco Bezanilla, and Benoît Roux.(2012) An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J Gen Physiol.* 140(6): 587–594.
4. Yanhong Gao, Sergey Yechikov, Ana E. Vazquez, Dongyang Chen, Liping Nie.(2013) Distinct Roles of Molecular Chaperones HSP90a and HSP90b in the Biogenesis of KCNQ4 Channels. *PLoS ONE* 8(2): e57282.
5. Choong-Ryoul Sihn, Hyo Jeong Kim, Ryan L. Woltz, Vladimir Yarov-Yarovoy, Pei-Chi Yang, Jun Xu, Colleen E. Clancy, Xiao-Dong Zhang, Nipavan Chiamvimonvat, and Ebenezer N. Yamoah.(2016) Mechanisms of Calmodulin Regulation of Different Isoforms of Kv7.4 K⁺ Channels. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 291, NO. 5, pp. 2499–2509
6. Yanhong Gao, Sergey Yechikov, Ana E. Vazquez, Dongyang Chen, Liping Nie.(2013) Impaired surface expression and conductance of the KCNQ4 channel lead to sensorineural hearing loss. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 17, No 7, pp. 889-900
7. Nelly Abdelfatah, David A McComiskey, Lance Doucette, Anne Griffin, Susan J Moore, Carol Negrin, Kathy A Hodgkinson, Justin J King, Mani Larijani, Jim Houston, Susan G Stanton and Terry-Lynn Young.(2013) Identification of a novel in-frame deletion in KCNQ4 (DFNA2A) and evidence of multiple

phenocopies of unknown origin in a family with ADSNHL. *European Journal of Human Genetics* 21, 1112–1119

8. Haibo Yu, Meng Wu, Steven D. Townsend, Beiyan Zou, Shunyou Long, J. Scott Daniels, Owen B. McManus, Min Li, Craig W. Lindsley, and Corey R. Hopkins.(2011) Discovery, Synthesis, and Structure Activity Relationship of a Series of N-Aryl-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamides: Characterization of ML213 as a Novel KCNQ2 and KCNQ4 Potassium Channel Opener. *ACS Chem. Neurosci.* 2011, 2, 572–577

9. T A Jepps, B H Bentzen, J B Stott, O V Povstyan, K Sivaloganathan, W Dalby-Brown, I A Greenwood. (2014) Vasorelaxant effects of novel Kv7.4 channel enhancers ML213 and NS15370. *Br J Pharmacol.* 171(19): 4413–4424.

10. Christian Kubisch, Björn C Schroeder, Thomas Friedrich, Björn Lütjohann, Aziz El-Amraoui, Sandrine Marlin, Christine Petit, Thomas J Jentsch.(1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell.* 96: 437–46.

11. Tatjana Kharkovets , Karin Dedek, Hannes Maier , Michaela Schweizer , Darina Khimich , Re'gis Nouvian , Vitya Vardanyan , Rudolf Leuwer , Tobias Moser and Thomas J Jentsch.(2006) Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *The EMBO Journal* 25, 642–652

12. Smith RJH, Hildebrand M.(1993) DFNA2 Nonsyndromic Hearing Loss. *GeneReviews.*

13. 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(7):1321-8.

14. Stern RE, Lalwani AK.(2002) Audiologic evidence for further genetic heterogeneity at DFNA2. *Acta Otolaryngol.* 122: 730–5.

15. Dominik Oliver, Marlies Knipper, Christian Derst and Bernd Fakler.(2003) Resting Potential and Submembrane Calcium Concentration of Inner Hair Cells in the Isolated Mouse Cochlea Are Set by KCNQ-Type Potassium Channels. *Journal of Neuroscience* 23 (6) 2141-2149

16. Wangemann P.(2006) Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol.* 576: 11–21.

17. Calvin Wu, Kanishk Sharma, Kyle Laster, Mohamed Hersi, Christina Torres, Thomas J Lukas and Ernest J Moore.(2014) Kcnq1-5 (Kv7.1-5) potassium channel expression in the adult zebrafish. *BMC Physiology.* 14:1

18. Long Y, Song G, Yan J, He X, Li Q, Cui Z.(2013) Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish. *BMC Genomics.* 14(1):1–16

19. Abdolrahman Khezri , Thomas W. K. Fraser , Rasoul Nourizadeh-Lillabadi , Jorke H. Kamstra , Vidar Berg , Karin E. Zimmer and Erik Ropstad.(2017) A Mixture of Persistent Organic Pollutants and Perfluorooctanesulfonic Acid Induces Similar Behavioural Responses, but Different Gene Expression Profiles in Zebrafish Larvae. *Int. J. Mol. Sci.* 18(2), 291

20. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL.(2000) The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research.* 10(9): 1351–1358.