

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 操作基因變異探討 KCNQ4 蛋白其作用藥物可能的功能性結合位 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 100-2320-B-040-001-  
執行期間：100年08月01日至101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

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 101 年 10 月 31 日

中文摘要：我們已知 KCNQ 活化劑 retigabine 可以活化鉀離子通道，被認為可用來治療癲癇、偏頭痛和神經性疼痛的藥物。Retigabine 介由恆態活化曲線過極化的偏移而活化 KCNQ 鉀離子通道。為了探討 retigabine 在 KCNQ4 的分子決定位，建構了一系列的 KCNQ4 變異基因 242L, L247A, L305A, R161A, R166A, R488A, R490A, R492A, S494A and A651X, 並且分析這些變異對於處理 retigabine 的反應。我們將這些變異分別表達於人類 HEK293t 細胞株中。我們發現 R488A 和 R490A 變異蛋白對於 retigabine 所產生活化的反應消失了(10 貢 M)。R488A 和 R490A 是位於細胞質中靠近 KCNQ4 內面孔道的位置。有趣的是 R492A 變異蛋白只表達出較小的電流，這需要更進一步探討是否 retigabine 活化作用的消失與突變位點有關亦或是它本身的影響。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，它在 KCNQ2 中對於 retigabine 產生作用扮演關鍵的角色。然而本實驗中發現 W242L 變異蛋白對於 retigabine 仍具有反應性。這也顯示了不同 Kv7 蛋白亞型其對於 retigabine 個別的反應性並不相同。其它的變異蛋白 L247A, L305A, R161A, R166A, S494A and A651X 顯示出對於 retigabine 作用所產生的反應與野生型相同，這些位點對於 retigabine 產生活化的反應是非必要的。這些結果顯示 KCNQ4 的 Arg488 和 Arg490 位點參與了 retigabine 去活化 KCNQ4 鉀電流的兩個關鍵的位置。

中文關鍵詞：retigabine；KCNQ 活化劑；突變蛋白；HEK293t；分子決定位

英文摘要：The compound retigabine has been targeted for use against epilepsy, migraine and neuropathic pain due to its activation of the KCNQ-channel. It activates KCNQ K<sup>+</sup> channels by inducing a large hyperpolarizing shift of steady-state activation. To identify the structural determinants of KCNQ4 channel activation by retigabine, we constructed a set of KCNQ4 mutants, W242L, L247A, L305A, R161A, R166A, R488A, R490A, R492A, S494A and A651X and analyses their functional properties by treated with retigabine, a KCNQ channel activator. We expressed KCNQ wild-type and these mutants in the mammalian HEK293t cell line. Mutations of R488A and R490A led to a complete loss of activation by retigabine (10 貢 M). Arg488 and Arg490 in the cytoplasmic part are close to pore region.

Interesting, the R492A express the small current of KCNQ4 only. It needed for the further analysis whether R492A impairs the functional current that led to loss of activation by retigabine. 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 in this study. It indicates different subtype of Kv7 proteins may result in different response to retigabine. Other mutants L247A, L305A, R161A, R166A, S494A and A651X showed the similar results in response to retigabine with the wild-type, indicated that are not the necessary for the activation response by retigabine. These results demonstrated that Arg488 and Arg490 in KCNQ4 participate in the effect of KCNQ4 current activation by retigabine.

英文關鍵詞： retigabine； 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:操作基因變異探討 KCNQ4 蛋白其作用藥物可能的功能性結合位

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 100-2320-B-040 -001

執行期間：100 年 8 月 01 日至 101 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：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 101 年 10 月 29 日

## Abstract

The compound retigabine has been targeted for use against epilepsy, migraine and neuropathic pain due to its activation of the KCNQ-channel. It activates KCNQ K<sup>+</sup> channels by inducing a large hyperpolarizing shift of steady-state activation. To identify the structural determinants of KCNQ4 channel activation by retigabine, we constructed a set of KCNQ4 mutants, W242L, L247A, L305A, R161A, R166A, R488A, R490A, R492A, S494A and A651X and analysed their functional properties by treated with retigabine, a KCNQ channel activator. We expressed KCNQ wild-type and these mutants in the mammalian HEK293t cell line. Mutations of R488A and R490A led to a complete loss of activation by retigabine (10 μM). Arg488 and Arg490 in the cytoplasmic part are close to pore region. Interesting, the R492A express the small current of KCNQ4 only. It needed for the further analysis whether R492A impairs the functional current that led to loss of activation by retigabine. 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 in this study. It indicates different subtype of Kv7 proteins may result in different response to retigabine. Other mutants L247A, L305A, R161A, R166A, S494A and A651X showed the similar results in response to retigabine with the wild-type, indicated that are not the necessary for the activation response by retigabine. These results demonstrated that Arg488 and Arg490 in KCNQ4 participate in the effect of KCNQ4 current activation by retigabine.

Key words: retigabine; KCNQ activator; mutations; HEK293t; molecular determinants.

## 中文摘要:

我們已知 KCNQ 活化劑 retigabine 可以活化鉀離子通道，被認為可用來治療癲癇、偏頭痛和神經性疼痛的藥物。Retigabine 介由恆態活化曲線過極化的偏移而活化 KCNQ 鉀離子通道。為了探討 retigabine 在 KCNQ4 的分子決定位，建構了一系列的 KCNQ4 變異基因 242L, L247A, L305A, R161A, R166A, R488A, R490A, R492A, S494A and A651X, 並且分析這些變異對於處理 retigabine 的反應。我們將這些變異分別表達於人類 HEK293t 細胞株中。我們發現 R488A 和 R490A 變異蛋白對於 retigabine 所產生活化的反應消失了(10  $\mu$ M)。R488A 和 R490A 是位於細胞質中靠近 KCNQ4 內面孔道的位置。有趣的是 R492A 變異蛋白只表達出較小的電流，這需要更進一步探討是否 retigabine 活化作用的消失與突變位點有關亦或是它本身的影響。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，它在 KCNQ2 中對於 retigabine 產生作用扮演關鍵的角色。然而本實驗中發現 W242L 變異蛋白對於 retigabine 仍具有反應性。這也顯示了不同 Kv7 蛋白亞型其對於 retigabine 個別的反應性並不相同。其它的變異蛋白 L247A, L305A, R161A, R166A, S494A and A651X 顯示出對於 retigabine 作用所產生的反應與野生型相同，這些位點對於 retigabine 產生活化的反應是非必要的。這些結果顯示 KCNQ4 的 Arg488 和 Arg490 位點參與了 retigabine 去活化 KCNQ4 鉀電流的兩個關鍵的位置。

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

## Introduction

Kv7 (KCNQ)蛋白家族廣泛的被表達於人體內不同的組織中(Brown, 2008), Kv7 基因家族的變異可能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(1999)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, 而探討藥物對於 Kv7 蛋白的作用的分子決定位有助於新藥的設計與開發。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)對管道蛋白的結合可能引發許多作用, 包括穩定管道打開的構形和促進一系列蛋白構形的改變以打開渠道。活化劑藥物效力會受到渠道蛋白胺基酸殘基的影響可經由結合親合力的改變或干擾活化劑引發的蛋白質構形變化。胺基酸殘基對於活化劑藥物的重要性可以介由操作基因變異的方式鑑別。這些小分子的活化劑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方式是採用操作基因點突變(site-directed mutagenesis)和基因組合鑲嵌(recombinant chimeric)。這個實驗方法對於鑑別藥物作用的分子決定位置是目前有效的方式(Seebohm et al., 2003; Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005; Xiong et al., 2007)。起初研究鑑別 Kv7 蛋白作用劑的作用關鍵胺基酸殘基是根據丙胺酸(alanine)突變掃描的研究方式。Seebohm

等人主要是探討 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。而作用藥物如 retigabine 對於 Kv7 蛋白家族激活作用自從 1990 年代中期開始被注意, 活化劑(activator)對於某些細胞過度興奮的疾病在臨床上具有治療價值。開發設計一些小分子的有機化合物去活化離子渠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 retigabine 的分子作用決定機制部分被釐清(Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005)。Retigabine 對於 Kv7.2 至 Kv7.5 具有顯著的增效效果, 但對於 Kv7.1 則不具有反應。研究發現蛋白質中的色胺酸(tryptophan)對於 retigabine 作用於 Kv7.2(W236)至 Kv7.5(W270)是重要的位置, 色胺酸突變為 leucine 結果使得 retigabine 對於 Kv7.2 至 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)。明顯地 retigabine 對於 Kv7.2 至 Kv7.5 媒介的增強作用色胺基酸殘基的保留性是必要的為。也發現另外的殘基對 retigabine 效力的作用有助益, 包括在形成管道口的 S6 序段的甘胺酸(glycine)殘基對渠道活化作用需要的(Wuttke et al., 2005)。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 retigabine 作用在 Kv7.4 的分子決定位的研究並比較 Kv7.4 與其它 Kv7 家族其分子作用位之異同。我們以操縱基因變異以分析活化藥物作用於 Kv7.4 蛋白的分子決定位置(Su et al., 2006; Su et al., 2009), 建構了約

## Materials and Methods

### 質體在建構與純化

使用human KCNQ4/pcDNA3.1 用來表達於哺乳類的細胞株(例如HEK293t)中並來進行基因變異質體在建構基礎。

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*) DH5a -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 ddH<sub>2</sub>O, 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, 再依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 (見附件)。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 µl Template DNA (100ng)、1.25 µl reverse primer (15 µl)、5 µl dNTP (2mM)、5 µl 10X pfu reaction buffer、1 µl PfuTurobo DNA polymerase (2.5 U/µl)、2 µl DMSO (100%)、33.5 µl sterile D<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 共50 µl。PCR擴增18個

10 個 Kv7.4 基因變異質體, 發現其中幾個蛋白變異對於 retigabine 的作用產生阻抗性, 因此 retigabine 作用於 Kv7.4 蛋白上至少包括了以上的重要位置。

循環。PCR結束後, 加入 1 µl 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 細胞株冷凍保存所使用之培養液為含有7% DMSO 之 DMEM 培養液, 且單一細胞冷凍管中之細胞數目需大於10<sup>6</sup> 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10<sup>6</sup>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 2000 (或Fugene)轉染KCNQ4-pcDNA3.1與EGFP質體(10:1)之HEK293t細胞株進行全細胞電位箝定。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  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 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1.6至3 M $\Omega$ 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  $CaCl_2$ , 2.8 mM  $MgCl_2$ , 1.6 mM ATP, 10 mM HEPES, pH 7.2 ) (Søgaard et al. 2001),於 ZIESS AXIOSKOP FS 2 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 9.2 (Axon Instruments)軟體,並將所記錄電流訊號以數位形式儲存於

## 結果與討論

### KCNQ4經轉染於HEK293t cell上西方墨點法之驗證

人類KCNQ4基因經由Lipofectamin 2000(或Fugene)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。Fig.1A顯示小鼠橫膈膜肌有KCNQ4蛋白質的表達, Fig. 1B顯示轉染有KCNQ4質體的HEK293t細胞可見到KCNQ4蛋白的表達但是對照組單獨未處理的HEK293t細胞則無KCNQ4蛋白的表達 (Fig. 1B)。

免疫細胞化學方法證實 KCNQ4 表達於

電腦中。

本實驗使用的流程為,先將電位鉗定在-80mV,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 9.2 紀錄的電流資料,以Clampfit 9.2 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 $\pm$ SEM)格式來呈現。

### 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 (Fig.2)。

### KCNQ4經轉染於HEK293t cell上表達之鉀離子通道電流特徵

我們使用KCNQ4-pcDNA3.1與EGFP質體以10:1的比例經由Lipofectamin 2000(或Fugene)試劑轉染於HEK293t cell上,並利用轉染成功之細胞發出EGFP螢光訊號於螢光顯微鏡下進行篩選,挑選適當並轉染成功之細胞於光學顯微鏡下進行全細胞電位箝定技術的記錄。人類Kcnq4基因經由Lipofectamin2000(或

Fugene)轉染於HEK293t cell上表達之鉀離子通道電流同樣具有KCNQ家族離子通道的特性。利用全細胞電位箝定技術(whole cell voltage patch-clamp)，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箝定流程，一開始將HEK293t細胞的膜電位箝定在-80 mV，一次記錄總共會有13次的連續刺激，每次刺激依序增加10 mV，變動區間由-80 mV至40 mV間變動，若KCNQ4鉀離子通道成功表達於HEK293t細胞，便會隨箝定電位的去極化產生緩慢活性化的鉀離子電流，最後將HEK293t細胞的膜電位箝定在-30 mV，並分析尾電流以Clampfit 9.2軟體歸納出其二分之一活化膜電位(half-activation voltage,  $V_{1/2}$ )，並將多次實驗結果作平均，得到平均二分之一活化膜電位我們也以全細胞電位箝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細胞上表達的鉀離子通道電流。

#### Retigabine 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家族離子通道電流低閾值(low threshold)、非不活化(non-inactivating)、延遲性(delayed)與電位依賴性(voltage-dependent)特性(Fig. 3A. KCNQ4)。我們分析尾電流並以Clampfit 9.2軟體歸納出其二分之一活化膜電位(half-activation voltage,  $V_{1/2}$ )，並將多次實驗結果作平均，得到平均二分之一活化膜電位為-13.4±1.2 mV (n=6)，給予KCNQ開啓劑retigabine 10 μM，電流於5分鐘(Fig. 3B)與10

分鐘(Fig. 3C)，有明顯增加的現象。得到平均二分之一活化膜電位為-19.4±1.6 mV (n=6)。

#### Retigabine 對於W242L鉀離子通道表達於HEK293t之影響

KCNQ4-W242L 是與KCNQ2-W236L之同源位點，在KCNQ2的實驗中W236L對於retigabine (10-100 μM)之作用具有阻抗性(Schenzer et al., 2005)，然而在本實驗中卻發現KCNQ4-W242L對於retigabine (10 μM)仍具有反應性(Fig.4A-4B)，二分之一活化膜電位從-21.2±1.5 mV至29.3±2.1 mV (n=3)，由此得知不同的KCNQ蛋白亞型對於藥物的反應仍具差異性。

#### Retigabine 對於R488A鉀離子通道表達於HEK293t之影響

本實驗中發現KCNQ4-R488A對於retigabine (10 μM)具有明顯的阻抗性(Fig.5)，給予retigabine 5分鐘(Fig. 5B)與10分鐘(Fig.5C)發現二分之一活化膜電位從-15.2±1.1 mV至16.1±1.2 mV (n=4)，並無明顯的變化。因此R488A可能是retigabine作用於KCNQ4產生增加反應的一個重要位點。

#### Retigabine 對於R490A鉀離子通道表達於HEK293t之影響

KCNQ4-R490A變異蛋白對於retigabine (10 μM)具有明顯的阻抗性(Fig.6)，給予retigabine 5分鐘(Fig. 6B)與10分鐘(Fig.6C)其電流大小並無顯著的變化，二分之一活化膜電位從-12.1±1.1 mV至13.1±1.4 mV (n=3)，並無意義的差異。因此R490A也可能是retigabine作用於KCNQ4產生增加反應的一個重要位點。

#### Retigabine 對於R492A鉀離子通道表達於HEK293t之影響

R492A表達於HEK293t的電流明顯變小，是否R492A本身對於KCNQ4功能的控制具有關鍵性的作用不得而知，在加了retigabine (10 μM)

之後的5-10分鐘反應並無顯著的增加 (Fig.7A-7C)，由於R492A本身可能就會干擾電流的表達，因此縱使它對retigabine反應性變差，是否是此位點變異干擾retigabine作用還是影響電流本身的表達仍有待釐清。

#### Retigabine 對於S494A鉀離子通道表達於HEK293t之影響

S494A變異蛋白表達電流與野生型 (wild-type) 並無差異。給予retigabine (10  $\mu$ M) 5-10分鐘逐漸的增加電流的振幅大小 (Fig.8A, before; and Fig.8B-8C after 5-10 min)，二分之一活化膜電位從-11.6 $\pm$ 0.9 mV至16.1 $\pm$ 1.2 mV (n=3)，顯示S494A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retigabine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retigabine產生的反應，發現電流大小與二分之一活化膜電位曲線均無明顯的差異 (Fig.5 和 Fig.6)，證實Arg488與Arg490對於retigabine要產生活化作用為重要的分子決定位。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的反應無明顯差異。由此可知KCNQ4第651位置之後對於retigabine之作用無必要性。

R492A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產生的鉀離子電流很小，所測得KCNQ4鉀離子通道電流大小約1000 pA左右，因此初步推論R492A單一胺基酸突變所導致的KCNQ4鉀離子通道失去功能可能是影響了KCNQ4電流本身的功能，這需要更進一步探討是否retigabine活化作用的消失與突變位點有關亦或是它本身的影響。

KCNQ4可能的retigabine分子作用點:

本實驗已完成W242L, L247A, L305A, R161A, R166A, R488A, R490A, R492A, S494A and A651X等變異位點對於KCNQ開啓劑retigabine的反應性，分析結果顯示Arg488和Arg490對於retigabine產生其活化的作用具有有關鍵性，另外Arg492則可能會影響KCNQ4本身的功能，A651del的變異蛋白得知Ala651之後的位置對於retigabine發揮作用並無影響性。

## 參考文獻(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<sup>+</sup> 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.
- Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.

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.

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)-acrylamide 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:**

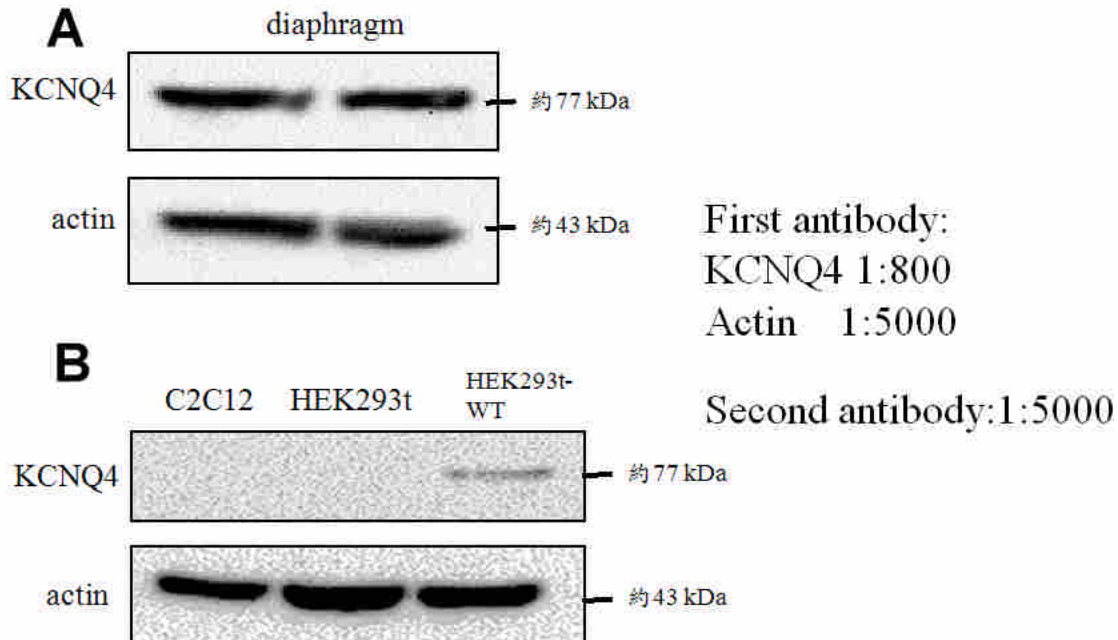


Fig.1 Western blot showing the reactivity of mouse diaphragm (A) and HEK293t (B) with KCNQ4 antibody. HEK293t cell transfected with KCNQ4/pcDNA showed the expression of 77Kda protein (KCNQ4) but not the HEK293t alone.

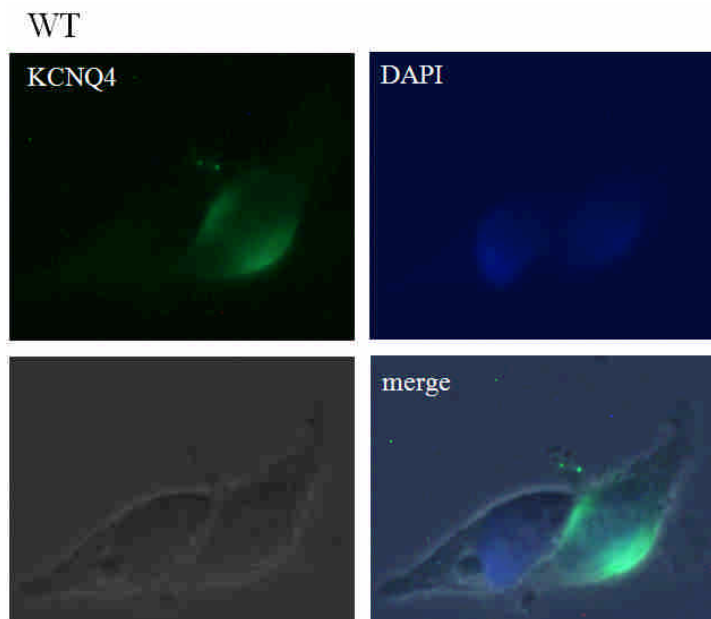


Fig.2 HEK293t transfected with KCNQ4/pcDNA3.1 showed the reactivity of KCNQ4 fluorescence in cell membrane (green) using an immunocytochemical approach.

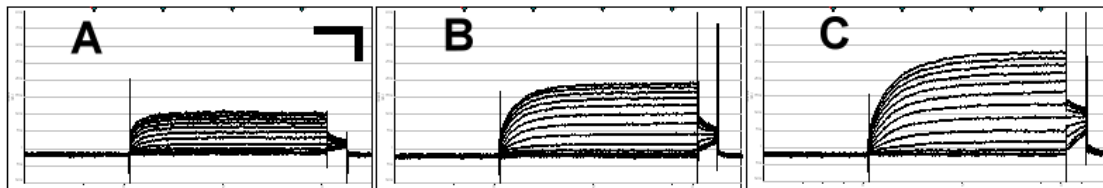


Fig.3 Retigabine sensitivity of KCNQ4 wild-type channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4 (A) is shown before (A) and during perfusion with 10  $\mu$ M retigabine (B, 5 min; C, 10 min). The voltage protocol is shown as in Materials and Methods. Scale: 1 nA; 0.15 sec.

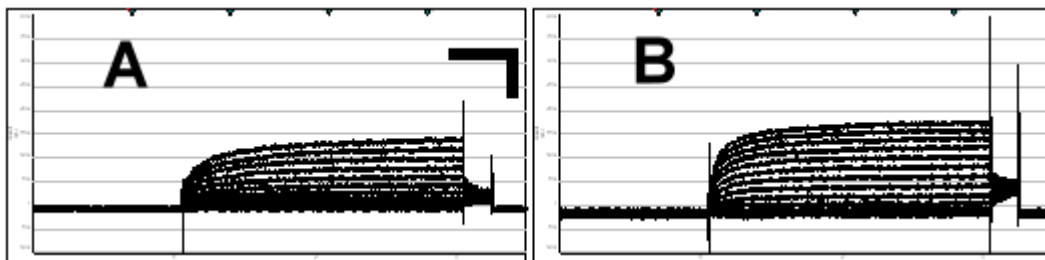


Fig.4 Retigabine sensitivity of KCNQ4-W242L channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-W242L (A) is shown before (A) and during perfusion with 10  $\mu$ M retigabine (B, 10 min). Scale: 1 nA; 0.15 sec.

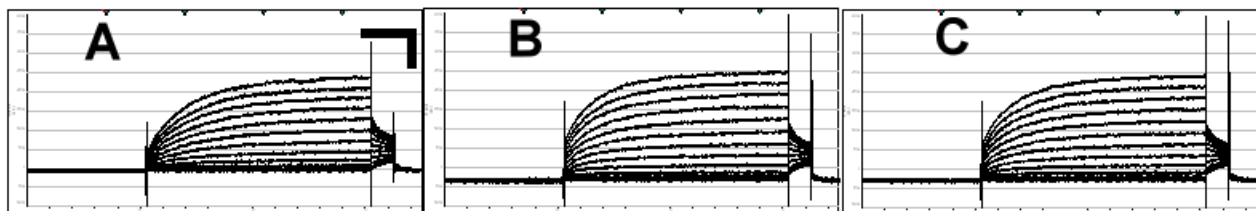


Fig.

5 Retigabine sensitivity of KCNQ4-R488A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-R488A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10  $\mu$ M retigabine (B, 5 min; C, 10 min). Scale: 1 nA; 0.15 sec.

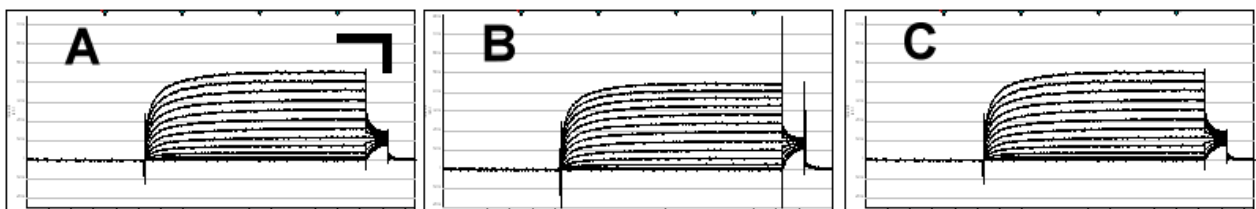


Fig.6 Retigabine sensitivity of KCNQ4-R490A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-R490A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10  $\mu$ M retigabine (B, 5 min; C, 10 min). Scale: 1 nA; 0.15 sec.

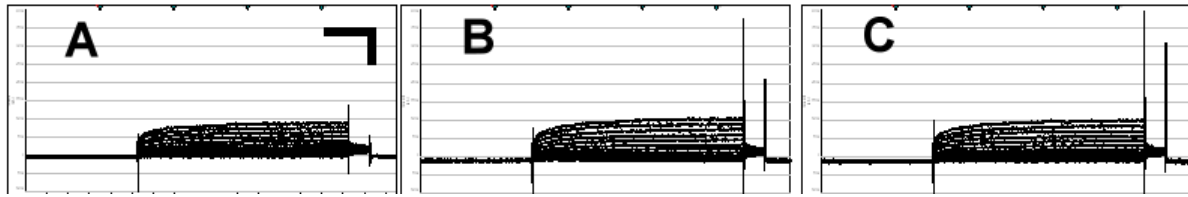


Fig.7 Retigabine sensitivity of KCNQ4-R492A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-R492A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10  $\mu$ M retigabine (B, 5 min; C, 10 min). Scale: 1 nA; 0.15 sec.

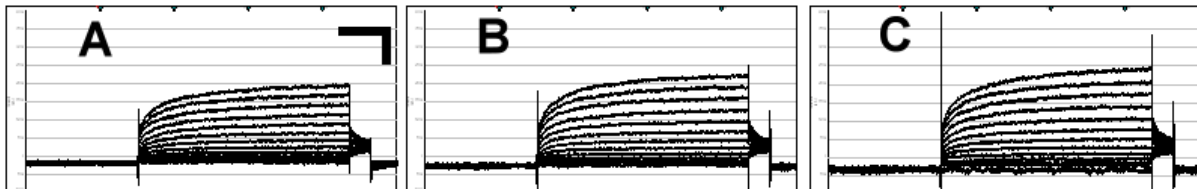


Fig.8 Retigabine sensitivity of KCNQ4-S494A channel. Typical current traces recorded from HEK293t expressing KCNQ4-S494A (A) is shown before (A) and during perfusion with 10  $\mu$ M retigabine (B, 5 min; C, 10 min). Scale: 1 nA; 0.15 sec.



# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/31

國科會補助計畫	計畫名稱: 操作基因變異探討KCNQ4蛋白其作用藥物可能的功能性結合位
	計畫主持人: 林明忠
	計畫編號: 100-2320-B-040-001- 學門領域: 藥學
無研發成果推廣資料	

100 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：100-2320-B-040-001-					
計畫名稱：操作基因變異探討 KCNQ4 蛋白其作用藥物可能的功能性結合位							
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	0	0	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	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（本國籍）	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%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	通訊作者；期刊 impact factor:4.7
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	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	1	1	100%	人次	與主持人共同完成此計畫工作（各 50%）=100%
		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>	此藥物之藥理用途可提供業界發展商業用途之參考
--	------------------------

	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：

1. 此計畫探討操作基因變異探討 KCNQ4 蛋白其作用藥物可能的功能性結合位與藥理的角色已達成目標：已找到 KCNQ4 開啟藥物 RETIGABINE 在 KCNQ4 的重要分子決定位：Arg 488 與 Arg490.

2. KCNQ4 開啟藥物藥理學作用上新的應用角色，既治療肌強直症上的應用發現或具臨床應用價值（已發表）。

發表期刊：通訊作者 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2012, Article ID 803082, 1-9 page

## 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）

部份成果(應用方面)已發表於：Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2012, Article ID 803082, 1-9 page. The Effects of the KCNQ Openers Retigabine and Flupirtine on Myotonia in Mammalian Skeletal Muscle Induced by a Chloride Channel Blocker (通訊作者：IF= 4.7). 而另外一篇(基礎方面)：已投稿中 (submitted).

## 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）

KCNQ4 的 Arg488 和 Arg490 位點參與了 retigabine 去活化 KCNQ4 鉀電流的兩個關鍵的位置。而 Retigabine 藥物未來可能可應用於肌強直症，進一步可以以此基礎開發更有效的肌強直症治療劑。