Aus dem Charité Centrum 11 für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie, Campus Mitte
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Baumann

HABILITATIONSSCHRIFT

Konsequenzen für Physiologie und Pathophysiologie nach Deletion der Kaliumkanal-Untereinheiten *KCNE2* und *KCNE3*

zur Erlangung der Venia legendi für das
Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin von

Dr. med. Torsten Kai Röpke
geboren am 31. Oktober 1976 in Osnabrück
Berlin, August 2011

Dekanin: Univ.-Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Florian Lang

2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Richard Warth

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 3

1. Einleitung 5

1.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle 5

1.2 MinK-Related Peptides (KCNEs) 6

1.3 Fragestellung 10

2. Eigene Arbeiten 12

2.1 *KCNE2* ist essentiell für die Salzsäuresekretion des Magens 12

2.2 *KCNE2* & *KCNE3* regulieren das KCNQ1-*trafficking* der Parietalzelle 14

2.3 Deletion von *KCNE2* verursacht Gastritis Cystica Profunda 16

2.4 Deletion von *KCNE2* führt zu einer verlängerten Myokardrepolarisation 18

2.5 *KCNE2* ist essentiell für die Biosynthese von Schilddrüsenhormonen 20

3. Diskussion 22

4. Zusammenfassung 39

5. Literaturverzeichnis 42

6. Danksagung 53

Abkürzungsverzeichnis

APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
BrS	Brugada Syndrom
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary cells (Zelllinie aus Ovarialepithel)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
FS	*Fractional Shortening* Formel: (LVEDD – LVESD)/LVEDD
FRTL-5	*Living, fast-growing thyroid cell strain* (Schilddrüsenzelllinie)
GCP	Gastritis Cystica Profunda
GERD	Gastro-Ösophageale Refluxerkrankung
HCN	Hyperpolarisationsaktivierte durch zykliche Nukleotide geschaltete Kaliumkanäle
hERG	Human ether-a-go-go related gene, Kv11.1
H^+-K^+-ATPase	Protonenpumpe
I_{Ks}	Langsame Komponente des kardialen I_K-Stroms
I_{Kr}	schnelle Komponente des kardialen I_K-Stroms
KChAPs	lntrazelluläre Chaperone für Kv-Kanäle
KChIPs	lntrazelluläre Chaperone für Kv-Kanäle
KCNE1	MinK- kodierendes Gen
KCNE2	MiRP1-kodierendes Gen
KCNE3	MiRP2-kodierendes Gen
KCNE4	MiRP3-kodierendes Gen
KCNE5	MiRP4-kodierendes Gen
KCNE1	Synonym: MinK oder Isk

KCNE2	Synonym: MiRP1 (mink related protein 1)
KCNE3	Synonym: MiRP2 (mink related protein 2)
KCNE4	Synonym: MiRP3 (mink related protein 3)
KCNE5	Synonym: MiRP4 (mink related peptide 4)
KCNQ1	Synonym: KvLQT1 oder Kv7.1
Kv-Kanal	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
LVEDD	Linksventrikulärer Diameter während der Diastole
LVESD	Linksventrikulärer Diameter während der Systole
LQTS	Long QT Syndrom
MDCK	Madin-Darby-Canine-Kidney
NIS	Thyreoidaler Natrium-Iod-Symporter
PC	Parietalzelle
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positron-Emmisions-Tomographie
RT-PCR	*Real-Time* PCR
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TSH	Schilddrüsenstimulierendes Hormon
TGF-α	*Transforming growth factor alpha*
Vm	Ruhemembranpotential

1. Einleitung

1.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) sind die häufigsten und mannigfaltigsten aller bekannten Ionenkanäle. Sie finden sich in nahezu allen erregbaren und nicht erregbaren Zellen und bilden somit eine ubiquitär vorkommende Familie von Membranproteinen. Kv-Kanäle sind an einer Vielzahl von unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehört die Kontrolle des Ruhemembranpotentials, die Steuerung der Sekretion von Hormonen und die Regulation der elektrischen Erregbarkeit von Muskelzellen und Neuronen (Rudy et al., 1999). Ihre Aktivität wird durch Änderung des Membranpotentials, durch den Zellmetabolismus oder durch Transmitter und Hormone reguliert (Hille, 2001).

Kv-Kanäle sind die wesentlichen Determinanten der zellulären Repolarisation (Wiederherstellung eines erregbaren Zustandes) in erregbaren Zellen (z.B. Herzmuskelzellen) (Hille, 2001). Sie öffnen sich als Antwort auf die zelluläre Depolarisation und ermöglichen den selektiven Ausstrom von Kaliumionen über die Zellmembran. Wegen der enormen Bedeutung des zeitlichen Ablaufs dieses Prozesses und der damit verbundenen Dauer und Morphologie der Aktionspotentiale sind Kv-Kanäle attraktive therapeutische Angriffspunkte für Medikamente, die störende elektrische Aktivität, wie sie bei Herzrhythmusstörungen oder Epilepsie auftreten, kontrollieren sollen (Roepke et al., 2006). Das Studium ihrer genauen Funktionsweise ist daher auch von besonderer klinischer Relevanz.

Kv-Kanäle bestehen aus sogenannten porenformenden Untereinheiten (α-Untereinheiten). Stöchiometrische Untersuchungen haben ergeben, dass zu einem funktionellen Kanalkomplex 4 dieser homomeren Kv-Kanal-α-Untereinheiten an der Zelloberfläche zusammenkommen und so den porenbildenden Komplex (Abbildung 1) darstellen (Chen et al., 2002).

Weitere Proteine können mit den α-Untereinheiten assoziiert sein, und werden dann akzessorische oder ß-Untereinheiten genannt. Zu den über 40 bekannten α-Untereinheiten gesellt sich eine Vielzahl von akzessorischen, oder ß-Untereinheiten, die

Kanalfunktion und die Kanalregulation *in vitro* und *in vivo* dramatisch beeinflussen können.

1.2 MinK-Related Peptides (KCNEs)

Im Gewebe assoziieren die Kv-α-Untereinheiten mit einer Reihe von akzessorischen oder Kv-Kanal-ß-Untereinheiten, um heteromultimere Kv-Kanäle zu bilden. Eine Familie solcher Kv-Kanal-ß-Untereinheiten stellen die MinK-related Peptides (MiRPs), kodiert von KCNE Genen, dar. Der Einfachheit halber und der internationalen Konvention folgend wird in dieser Arbeit die KCNE-Nomenklatur verwendet (KCNE1 = MinK, KCNE2 = MiRP1, KCNE3 = MiRP2 etc.). KCNEs sind Polypeptide und bestehen aus 103-170 Aminosäuren (McCrossan et al., 2004). Alle KCNE-Untereinheiten sind dementsprechend sehr klein und besitzen nur eine Transmembrandomäne, einen extrazellulären N- und einen zytosolischen C-Terminus. Alleine sind KCNEs nicht in der Lage Kaliumströme zu leiten, sie besitzen aber die Fähigkeit mit Kv-Kanal-α-Untereinheiten stabile heteromultimere Kv-Kanalkomplexe *in vitro* und *in vivo* zu bilden und somit deren Kanaleigenschaften zu modulieren (Pongs et al., 2010). Mittlerweile konnten fünf verschiedene KCNE-Gene im Humangenom identifiziert werden. Durch gewebespezifische Zusammenlagerung modulieren sie die biophysikalischen, regulatorischen und pharmakologischen Eigenschaften verschiedener Kv-Kanäle (Pongs et al., 2010).

KCNE1 ist das erste Gen der KCNE-Familie, welches bereits 1988 kloniert wurde (Takumi et al., 1988). Zunächst konnte man sich nicht erklären, wie ein derartig kleines Protein aus lediglich 129 Aminosäuren in *Xenopus laevis* Oozyten einen großen, spannungsabhängigen und langsam aktivierenden Kaliumstrom induzieren konnte, und warum dieser Strom in keinem anderen Expressionssystem beobachtet werden konnte. Erst einige Jahre später fiel auf, dass der KCNE1 assoziierte Kaliumstrom dem kardialen I_{Ks}-Strom in vielen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften ähnelt. Erst 1996 konnte nach der Klonierung von KCNQ1 gezeigt werden, dass KCNE1 nicht selbst einen Kaliumkanal bilden kann, sondern mit KCNQ1 assoziiert und einen heteromultimeren Kanal bildet (Sanguinetti et al., 1996 und

Barhanin et al., 1996). Heteromere KCNQ1-KCNE1-Kv-Kanal-Komplexe kommen zum Beispiel in Herzmuskel, Innenohr, in der Niere und im Pankreas vor (Warth et al., 2002).

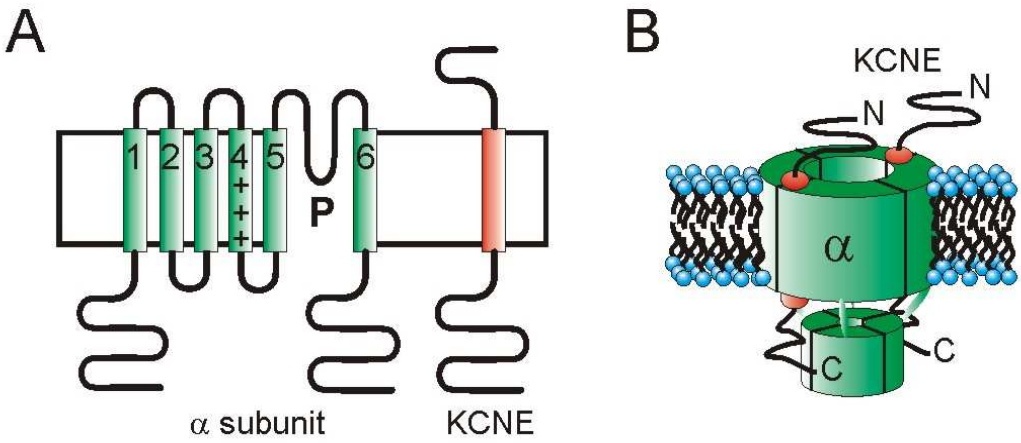

Abbildung 1. KCNE-Untereinheiten bilden heteromere Kaliumkanäle mit Kv-α-Untereinheiten. (A) Transmembranäre Topologie und (B) angenommene 4:2 Stöchiometrie (Chen et al., 2002) eines heteromeren Kv-Kanal-Komplexes mit KCNE-Untereinheit (rot) und Kv-α-Untereinheit (grün).

Mutationen in *KCNE1* sind assoziiert mit dem autosomal-dominant vererbten Romano-Ward-Syndrom und dem autosomal rezessiv vererbten Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom (JLNS). Beide Syndrome gehen mit einer Verlängerung des QT-Intervalls des Oberflächen-EKGs einher. JLNS-Betroffene leiden zusätzlich an angeborener bilateraler Taubheit, da heteromere KCNQ1-KCNE1-Kv-Kanäle im Innenohr für die Produktion von Endolymphe notwendig sind (Warth et al., 2002). Man nimmt an, dass beide Syndrome durch eine Beeinflussung des I_{Ks}-Stroms im Herzmuskel und im Innenohr hervorgerufen werden. Ein *KCNE1*$^{-/-}$-Maus-Modell konnte keinen signifikanten ventrikulären Phänotypen erbringen (Kuperschmidt et al., 1999). Es zeigte sich jedoch, dass die *KCNE1*$^{-/-}$-Mäuse an bilateraler Taubheit leiden (Vetter et al., 1996). Zudem konnte später nachgewiesen werden, dass es in *KCNE1*$^{-/-}$-Mäusen zu Episoden von paroxysmalem Vorhofflimmern kommt (Temple et al., 2005). Beim Menschen wurde ebenfalls der S38G Polymorphismus in *KCNE1* mit Vorhofflimmern in einer Studie assoziiert (Lai et al., 2002).

1999 konnte aufgrund 51%iger Homologie zu *KCNE1* aus der Retina der Ratte *KCNE2* geklont werden (Abbott et al., 1999). *KCNE2* kommt auch beim Menschen vor und liegt auf dem Chromosom 21q22.1. Es wurden zudem Mutationen in *KCNE2* entdeckt, welche mit dem angeborenen und erworbenen Long-QT-Syndrom assoziiert sind (Abbott et al., 1999 und Sesti et al., 2000). In Expressionsstudien an *Xenopus laevis* Oozyten konnte eine Assoziation von KCNE2 mit dem hERG-Kanal nachgewiesen werden. Ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass in den aus Säugetierzellen entwickelten Expressionssystemen wie COS-7-, CHO- und HEK-Zellen auch eine Assoziation zwischen KCNQ1 und KCNE2 erfolgt, die zu dramatischen Veränderungen der Stromeigenschaften führt (Tinel et al., 2000). KCNE2 transformiert den spannungsabhängigen, langsam aktivierenden KCNQ1-Strom zu einem völlig spannungsunabhängigen, kontinuierlichen Kaliumstrom. Es wurde angenommen, dass dieser spannungsunabhängige, kontinuierliche KCNE2-KCNQ1-Kaliumstrom einen Hintergrundstrom in der ventrikulären Repolarisation liefert und somit zu der Repolarisationsreserve des Ventrikels beiträgt (Tinel et al., 2000 und Roden et al., 2002). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Beeinflussung des I_{Kr}-Repolarisationsstromes durch KCNE2 ursächlich für die Entstehung der Herzrhythmusstörungen beim LQTS sei. Diese Theorie wurde in der wissenschaftlichen Literatur in der letzten Zeit jedoch kontrovers diskutiert, da sich KCNE2 durch eine ausgeprägte Promiskuität in seiner α-Partnerwahl auszeichnet (Roepke et al., 2006). Eine Vielzahl von Arbeiten wurden in der jüngsten Vergangenheit publiziert, die weitere Assoziationen von KCNE2 mit anderen Kv-Kanal-α-Untereinheiten beschreiben, unter ihnen KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, Kv3.1, Kv3.2, Kv4.2, Kv4.3 und HCN Kanäle (McCrossan et al., 2004). Bislang weiß man jedoch nicht, ob die Formation dieser heteromeren Kv-Kanäle auf unterschiedliche *in vitro* Expressionssysteme beschränkt ist oder ob diese Kanalkomplexe auch *in vivo* gebildet werden und nativen Ionenströmen unterliegen (Abbott et al., 2001).

KCNE2 ist allerdings nicht nur wegen seiner hohen α-Partner-Promiskuität von Bedeutung. Neben dem initial beschriebenen LQTS sind in den letzten Jahren eine Reihe von weiteren KCNE2 assoziierten Krankheitsbildern beschrieben worden, darunter das Adenokarzinom des Magens (Yanglin et al., 2007), neonatale Epilepsie in

Kombination mit LQTS (Heron et al., 2009), familiäres Vorhofflimmern (Yang et al., 2004), Schizophrenie (Tam et al., 2010) und frühzeitiger Myokardinfarkt (Kathiresan et al., 2009). Die genauen Mechanismen, die zur Entstehung dieser Krankheitsbilder führen, sind bislang jedoch nicht bekannt.

Mutationen in *KCNE3* wurden erstmalig mit der periodischen Paralyse, einer Skelettmuskelerkrankung, in Zusammenhang gebracht (Abbott et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass KCNE3 heteromere Kv-Kanäle mit der Kv-α-Untereinheit Kv3.4 in der Skelettmuskulatur bildet und dass KCNE3 die Spannungsabhängigkeit von Kv3.4-Kanälen um -45 mV verschiebt. Mutationen in *KCNE3* wurden vor kurzem ebenfalls mit LQTS in Zusammenhang gebracht (Ohno et al., 2009). Eine Screening Untersuchung in einer japanischen Population erbrachte *missense* Mutationen in *KCNE3*, welche auf dem N- und C-Termiuns von *KCNE3* lokalisiert sind. Das Verhalten dieser *KCNE3*-Mutanten in Expressionssystemen legt nahe, dass die ventrikuläre Repolarisation durch eine Beeinflussung des I_{Ks}-Stromes beeinträchtigt ist. Eine dänische Arbeitsgruppe konnte zudem kürzlich eine V17M *missense* Mutation in *KCNE3* nachweisen, welche mit frühzeitig auftretendem *lone Atrial Fibrillation* in einem Patienten assoziiert war (Lundby et al., 2008). Eine funktionelle Charakterisierung der Mutation in heterologen Expressionssystemen zeigte eine erhöhte Aktivität von Kv4.3-KCNE3 und Kv11.1-KCNE3, die über eine verkürzte Dauer der atrialen Aktionspotentiale eine erhöhte Vulnerabilität für *Re-Entry Wavelets* und damit ein vermehrt auftretendes Vorhofllimmern zur Folge haben könnte. Zudem wurde kürzlich eine Mutation in *KCNE3* beschrieben, die mit dem Auftreten des Brugada-Syndroms (BrS) assoziiert war (Delpon et al., 2008). Vor kurzem wurde zudem eine Studie publiziert, die eine Beteiligung von KCNE3 in einem signifikanten Schritt in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beschreibt, welche zu einem vermehrten neuronalen Zelltod führt (Pannaccione et al., 2007). Eine Assoziation von Mutationen in *KCNE3* und dem gehäuften Auftreten von Alzheimer wurden bislang nicht beschrieben.

KCNE4 wurde erstmalig 2003 beschrieben und das x-chromosomale *KCNE5* wurde 1999 kloniert (Piccini et al., 1999 und Teng et al., 2003). Beide ß-Untereinheiten sind in Herz- und Skelettmuskel, im Gehirn, im Innenohr und in der Plazenta exprimiert. KCNE4 wurde außerdem in der Niere, in der Leber und in der Lunge detektiert (Warth

et al., 2002). Trotz der relativ weiten Verbreitung im Körper ist ihre Bedeutung noch weitgehend ungeklärt. Beide ß-Untereinheiten können zudem heteromere Kv-Kanalkomplexe mit KCNQ1 bilden. Es wird darüber spekuliert, dass sie hierdurch zusammen mit anderen KCNE-Untereinheiten den kardialen I_{Ks}-Strom im Herzen modulieren (Lundquist et al., 2005 und Bendahhou et al., 2005).

KCNE4 und Kv1.3 sind in Leukozyten exprimiert und in der letzten Zeit verdichten sich Hinweise, dass sie hier einen heteromeren Kv-Kanal bilden. Man nimmt an, dass dieser Kanalkomplex bei dem *fine-tuning* der Immunantwort eine Rolle zu spielen scheint (Sole et al., 2010).

Mutationen in *KCNE5* wurden kürzlich mit nicht-familiärem Vorhofflimmern in Zusammenhang gebracht (Ravn et al., 2008). Zudem wurde eine Assoziation zum LQTS postuliert (Hofman-Bang et al., 2004). Auch hier sind die molekularen Mechanismen, welche zum Auftreten dieser Krankheiten führen, nicht bekannt.

1.3 Fragestellung

KCNE2 und *KCNE3* wurden erstmalig in den späten 1990er Jahren entdeckt und ursprünglich als Arrhythmie-Gene bei Patienten mit LQTS (Abbott et al., 1999) und periodischer Paralyse (Abbott et al., 2001) beschrieben. Abgesehen von ihrer Expression in Herzmuskelgewebe wurde ihr Vorkommen auch in anderen Geweben in Säugetierorganismen beschrieben (Warth et al., 2002). Sie erhielten in den letzten Jahren ein gesteigertes Interesse von Wissenschaftlern und Klinikern, da eine steigende Anzahl von Publikationen veröffentlicht wurde, die eine Assoziation von Mutationen in *KCNE2* und *KCNE3* mit weiteren Krankheitsbilder wie z.B. Epilepsie, Brugada Syndrom, Vorhofflimmern, frühzeitiger Myokardinfarkt, Schizophrenie und Adenokarzinom des Magens beschreiben (Yang et al., 2004, Yanglin et al., 2007, Kathiresan et al., 2009, Heron et al., 2009 Pannaccione et al., 2007 und Tam et al., 2010). Auf die molekularen Mechanismen, wie *KCNE2*- oder *KCNE3*-Mutationen zu diesen Krankheiten führen, wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht eingegangen. Um die molekulare Pathophysiologie von KCNE assoziierten Krankheiten daher besser verstehen zu können, haben wir *KCNE2*$^{-/-}$ und *KCNE3*$^{-/-}$ Mäuse generiert und die unterschiedlichen Phänotypen dieser Knockoutmäuse in verschiedenen

Organsystemen näher untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten zusammenfassend aufgeführt.

2. Eigene Arbeiten

2.1 *KCNE2* ist essentiell für die Salzsäuresekretion des Magens

Die Salzsäuresekretion des Magens erfolgt in einem spezialisierten Zelltyp der Magenschleimhaut – der Parietalzelle (PC). Sie beruht im Wesentlichen auf einem Zusammenwirken von Ionentransportmechanismen. Eine Schlüsselrolle bei der Säuresekretion nimmt die Protonenpumpe (H^+-K^+ - ATPase) in der luminalen Membran der PC ein. Die H^+-K^+-ATPase bewirkt den elektroneutralen Austausch von intrazellulären Protonen gegen extrazelluläre K^+-Ionen und erzeugt so den transepithelialen Protonengradienten. Um die Aktivität der Protonenpumpe aufrechterhalten zu können, findet an der apikalen PC Membran eine Rezirkulation von K^+-Ionen statt. Diesem K^+- Rezirkulationssprozess kommt somit eine essentielle Rolle bei der Magensäuresekretion zu, da diese bei fehlender apikaler K^+-Rezirkulation zum Erliegen kommt. Sie erfolgt durch apikale Kaliumkanäle. Wegen der enormen klinischen und therapeutischen Relevanz der molekularen Identifizierung dieses apikalen K^+-Rezirkulationsweges wurden in der jüngsten Vergangenheit eine Vielzahl von Studien publiziert, die verschiedene Kandidatengene für einen solchen apikalen K^+-Kanal beschreiben (Malinowska et al., 2004, Lee et al., 2000, Zaritzky et al., 2001 und Fujita et al., 2002). Für einen dieser Kaliumkanäle, dem KCNQ1-Kanal, existiert auch eine genetische Evidenz, da gezeigt werden konnte, dass *KCNQ1*$^{-/-}$-Mäuse unter einem kompletten Verlust der Magensäuresekretion leiden (Lee et al., 2000 und Vallon et al., 2005). Aus heterologen Expressionsstudien ist bekannt, dass KCNQ1-Kanäle funktionelle Kv-Kanäle mit der Kaliumkanal-ß-Untereinheit KCNE2 bilden können. KCNE2 ist ebenfalls in der PC der Magenschleimhaut exprimiert und co-lokalisiert hier mit KCNQ1 (Grahammer et al., 2001). Unklarheit herrscht jedoch bislang darüber, ob heteromere KCNQ1-KCNE2-Kanalkomplexe auch *in vivo* existieren, ob sie eine physiologische Relevanz bei der Magensäuresekretion besitzen und ob auch KCNE2 für die Aufrechterhaltung dieses Prozesses essentiell ist. Um diese Fragen zu klären, entwickelten wir *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse und untersuchten deren Magenphänotyp (Roepke et al., 2006).

KCNE2$^{-/-}$-Mäuse wurden nach Standardmethoden (Nagy et al., 2003) durch homologe Rekombination in RF8 129/svJae embryonalen Mäusestammzellen generiert. Die

korrekte Ausschaltung von *KCNE2* in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen und die Expression von KCNE2 in der Magenschleimhaut der Wildtyp-Mäuse wurden anschließend durch *Southern Blotting*, PCR und *Western Blotting* nachgewiesen. Die für die Versuche verwendeten Mäuse sind Nachkommen von *KCNE2*$^{+/-}$-Mäusen. Neugeborene *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse von *KCNE2*$^{+/-}$-Zuchteltern ließen sich in ihrem äußeren Erscheinungsbild und ihrer Entwicklung nicht von gleichaltrigen *KCNE2*$^{+/+}$-Geschwistern unterscheiden. *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse zeigten jedoch einen ähnlichen Phänotyp wie der im Jahre 2000 beschriebene Phänotyp der *KCNQ1*$^{-/-}$-Maus mit einer glandulären Hyperplasie der Magenschleimhaut. Elektronenmikroskopisch zeigte sich eine Aufhebung der typischen PC-Architektur in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen charakterisiert durch eine Erweiterung der intrazellulären Invagination der Zelloberfläche (Canaliculi), während die Hauptzellen in der *KCNE2*$^{-/-}$-Magenschleimhaut elektronenmikroskopisch nicht von den Wildtyp-Zellen zu unterscheiden waren. Durch *in vitro* pH-Messungen des Mageninhaltes konnten wir zeigen, dass die *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse an einer ausgeprägten Achlorhydrie leiden (intraluminalen pH-Wert von 6,5 gegenüber pH 3,9 in den Wildtyp-Mäusen). Der intraluminale pH des Magens ließ sich auch durch Stimulation der Magensäureproduktion mit Histamin nicht weiter anheben. Die Fähigkeit der PCs Protonen zu sezernieren war in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen ebenfalls komplett aufgehoben. *KCNE2*$^{+/-}$-Mäuse zeigten einen intermediären Phänotyp mit einer Hypochlorhydrie. Die *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse waren zusätzlich durch eine Hypergastrinämie charakterisiert, so dass wir ausschließen konnten, dass es bei der Achlorhydrie nicht um einen sekundären Prozess infolge einer gestörten Gastrin-Produktion und Sekretion handelt. Die Anzahl der PC in den Drüsen der Magenschleimhaut war nicht verändert und es war eine vermehrte Expression von KCNQ1 in den PC der *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse nachzuweisen.

2.2 *KCNE2* & *KCNE3* regulieren das KCNQ1-*trafficking* der Parietalzelle

Der drastische Phänotyp der *KCNE2*$^{-/-}$-Maus war überraschend, da die porenbildende Untereinheit (KCNQ1) eines vermeintlichen apikalen KCNQ1-KCNE2-Kanalkomplexes weiterhin in der Magenschleimhaut der *KCNE2*$^{-/-}$-Tiere exprimiert und zudem in seiner Expression gesteigert war (Roepke et al., 2006). Darüber hinaus zeigen Strom-Spannungs-Analysen aus *patch-clamp*-Experimenten, dass heteromere KCNE2-KCNQ1-Kanäle bei einem Membranpotential von -20 bis -40 mV (dies ist das Membranpotential von PC, Okada et al., 1984) signifikant mehr Kalium-Auswärtsstrom leiten als homomere KCNQ1-Kanäle (Tinel et al., 2000). Diese Diskrepanz veranlasste uns, die Pathophysiologie der Achlorhydrie in unseren *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen in einer weiteren Studie genauer zu untersuchen (Roepke et al., 2011).

KCNE-Untereinheiten waren zuletzt mit Kv-Kanal-*trafficking* in Zusammenhang gebracht worden (Jespersen et al., 2004). Wir konzentrierten uns daher zunächst darauf, die subzelluläre Distribution des KCNQ1-Kanals in unseren *KCNE2*$^{-/-}$- und *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen genauer zu untersuchen. Mittels immunhistochemischer Experimente konnten wir nachweisen, dass in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen ein Defekt im KCNQ1-*trafficking* vorliegt. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen ist die KCNQ1-α-Untereinheit an der basolateralen Membran der PC exprimiert – einem subzellulären Kompartiment, von dem aus der Kanal eine adäquate Versorgung der apikalen H^+-K^+-ATPase zur Aufrechterhaltung der Magensäuresekretion nicht mehr gewährleisten kann. Interessanterweise ist neben KCNE2 auch KCNE3 in Parietalzellen des Magens exprimiert (Heitzmann et al., 2004). Wie KCNE2 bildet auch KCNE3 heteromere Kanalkomplexe mit KCNQ1. Heteromere KCNE3-KCNQ1-Kanalkomplexe konnten zum Beispiel in den Kryptzellen des Colon gefunden werden – allerdings sind sie dort an der basolateralen Membran zu finden (Schroeder et al., 2000).

Um nun zu klären, ob es sich bei dem KCNQ1-*trafficking*-Defekt in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen um einen passiven Effekt (in Abwesenheit der akzessorischen Kv-Kanal-Untereinheit KCNE2) oder um einen aktiven Prozess („Entführung“ der KCNQ1-α-Untereinheit durch eine andere KCNE-Untereinheit) handelt, wurden weitere

Experimente durchgeführt. Durch RT-PCR und *Western Blotting* konnten wir zeigen, dass die Deletion von *KCNE2* zu einer selektiven, statistisch signifikanten Hochregulierung von *KCNE3* führt. Zusätzlich konnten wir mittels Co-Immunolokalisations- und Co-Immunopräzipitations-Analysen nachweisen, dass sich in Abwesenheit von *KCNE2* vermehrt KCNQ1-KCNE3-Kanalkomplexe an der basolateralen Membran der Parietalzellen bilden – ähnlich wie in der basolateralen Membran der Kryptzellen des Colons von *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen. Diese Experimente deuteten eher auf eine aktive Rolle des KCNE3 beim *trafficking* von KCNQ1 zur basolateralen Membran der Parietalzelle hin, obwohl es weiterhin möglich erscheint, dass KCNQ1 auch ohne KCNE3 in Abwesenheit von KCNE2 zur basolateralen Membran gelangt. Um diese Möglichkeit auszuräumen, generierten wir *KCNE3*$^{-/-}$-Mäuse (bzw. *KCNE3*$^{+/-}$) und kreuzten diese mit *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen (bzw. *KCNE2*$^{+/-}$), um *KCNE3*$^{-/-}$-*KCNE2*$^{-/-}$-Doppel-Knockoutmäuse zu züchten. Immunolokalisationstudien in diesen *KCNE3*$^{-/-}$-*KCNE2*$^{-/-}$-Doppel-Knockoutmäusen zeigten eine erneute apikale Expression von KCNQ1 wie in den *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen. Eine apikale Lokalisation von KCNQ1 fand sich ebenfalls in *KCNE2*$^{+/+}$-*KCNE3*$^{-/-}$-Mäusen. Es stellt sich daher die Frage, ob eine erneute apikale Lokalisation von KCNQ1 auch mit einer Restitutio der Magensäureproduktion der PC verbunden ist und/oder die zusätzliche Elimination von *KCNE3* einen Effekt auf die Proliferation der Magenschleimhaut hat. Wir untersuchten daher im Folgenden die unterschiedlichen Genotypen auf ihre Funktionalität (pH des Magenlumens und Magenschleimhauthypertrophie). Hier zeigte sich eine 2-fach größere, massive Hypertrophie der Magenschleimhaut in 3 Monate alten *KCNE3*$^{-/-}$-*KCNE2*$^{-/-}$-Doppel-Knockoutmäusen im Vergleich zu gleichaltrigen *KCNE2*$^{-/-}$-*KCNE3*$^{+/+}$-Mäusen. In quantitativen pH-Messungen des Mageninhaltes der Mäuse zeigte sich, dass *KCNE2*$^{+/-}$-*KCNE3*$^{-/-}$-Mäuse einen signifikant niedrigerer pH im Magenlumen nach Stimulation mit Histamin aufwiesen, als *KCNE2*$^{+/-}$-*KCNE3*$^{+/+}$-Mäuse - dies obwohl *KCNE3* keinen Effekt auf den intraluminalen Magen pH in *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen hatte.

2.3 Deletion von *KCNE2* verursacht Gastritis Cystica Profunda

Das Adenokarzinom des Magens ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert und ist die zweithäufigste Krebstodesursache weltweit (Goldenring et al., 2006). Die Kanzerogenese des Magens durchläuft mehrere Phasen, die von oxyntischer Atrophie über Ulkus-Formation und Hypo- bis Achlorhydrie zur foveolären Hyperplasie und Mukuszellmetaplasie führt (Goldenring et al., 2006). In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte bei der Diagnostik und der Therapie des Magenkarzinoms erzielt. Weniger gut erforscht sind jedoch die molekularen Mechanismen der Kanzerogenese des Magenkarzinoms. Unbekannt sind auch die molekularen Umbauvorgänge, welche prämaligne Neoplasien des Magens in aggressive, invasiv-wachsende Tumore transformieren lässt. Insbesondere ist die Rolle von Kv-Kanälen bei diesen Prozessen nahezu vollends unverstanden.

Wie in Kapitel 2.1 bereits ausgeführt, wird die Azidifizierung des Magenlumens durch die Aktivität der apikalen H^+-K^+-ATPase der PC erreicht. Um eine fortlaufende Sekretion der Salzsäure durch die H^+-K^+-ATPase zu gewährleisten, müssen die in die PC aufgenommenen K^+-Ionen durch einen apikalen K^+-Kanal wieder nach extrazellulär transportiert werden. Hierfür ist der heteromere KCNQ1-KCNE2-Kanal-Komplex verantwortlich (siehe Kapitel 2.1). In einer kürzlich publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass die KCNE2-Expression in humanem Magenkarzinomgewebe und in Magenkarzinom-Zelllinien signifikant herunterreguliert ist (Yanglin et al., 2007). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass eine forcierte Überexpression von KCNE2 das Wachstum von humanen Magenkarzinomzellkulturen und Magenkarzinomgewebe in Nacktmäusen unterdrückt. Diese kürzlich erhobenen Ergebnisse suggerieren, dass KCNE2 eine Rolle bei der Entstehung von Magenkrebs spielen könnte. In einer weiteren Studie untersuchten wir daher die Magenpathologie der *KCNE2*$^{-/-}$-Maus erneut, diesmal jedoch in älteren Mäusen (1 Jahr und älter) mit der Fragestellung, ob die *KCNE2*-Deletion zu Neoplasien des Magens führt (Roepke et al., 2010).

Ältere *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse (12-15 Monate alt) entwickeln im Gegensatz zu 3-6 Monate alten *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen eine vollkommen neue Pathologie: Gastritis Cystica Profunda

(GCP). Diese ist charakterisiert durch eine Herniation von neoplastischer, hypertrophierter Magenmukosa in die Submukosa und Muskularis des Magens. Eine GCP zeigte sich in 11 von 11 untersuchten älteren *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen. Zudem waren vereinzelt Polypen im Pylorus der *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse zu sehen, die sich bis ins Duodenum erstreckten, und in einigen Tieren ließ sich eine neoplastische Invasion ektoper Magenmukosa in dünnwandige Gefäße der Submukosa feststellen. Ferner konnten wir ein 6-fach erhöhtes Magengewicht der älteren *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern messen. Immunohistochemisch ließen sich vermehrt Proliferations- und Dedifferenzierungsmarker wie Ki-67, Cyclin D1, TFF-2 und Cytokeratin-7 in den hypertrophierten, neoplastischen Mägen der älteren *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse nachweisen. Zudem zeigte die Analyse von humanem Magenadenokarzinom-gewebe eine deutlich reduzierte Expression von KCNE2, so dass zusammenfassend eine KCNE2-Herabregulierung oder die genetische Ausschaltung von *KCNE2* als Risikofaktor für das Entstehen einer neoplastischen Magenschleimhaut angesehen werden muss.

2.4 Deletion von *KCNE2* führt zu einer verlängerten Myokardrepolarisation

Mutationen in *KCNE2* sind assoziiert mit dem angeborenen und dem erworbenen Long QT Syndrom (Abbott et al., 1999 und Sesti et al., 2000). KCNE2 zeichnet sich durch eine hohe Kv-α-Untereinheiten-Promiskuität aus. Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die eine funktionelle Interaktion von KCNE2 mit verschiedenen Kv-α-Untereinheiten *in vitro* beschrieben haben (McCrossan et al., 2003). Darunter finden sich die Kv-α-Untereinheiten hERG, KCNQ1-3, Kv3.1, Kv3.2, Kv4.2, Kv4.3 und HCN. Ein Problem dieser Arbeiten ist jedoch der fehlende Nachweis eines nativen KCNE2-spezifischen Kaliumstromes in ventrikulärem Herzmuskelgewebe. In den letzten Jahren wurde daher eine intensive Debatte über die Rolle von KCNE2 in der myokardialen Repolarisation geführt. Anhand unseres *KCNE2*$^{-/-}$-Modells untersuchten wir daher die Funktion von KCNE2 bei der ventrikulären Repolarisation (ROEPKE et al., 2008).

Zuerst stellten wir mittels Echokardiographie, Licht- und Elektronenmikroskopie die Intaktheit der Myokardmorphologie und -funktion sicher, da in der Vergangenheit mehrfach Veränderungen in der Morphologie von Herzmuskelgewebe nach genetischer Manipulation von Kv-Kanälen beschrieben wurden (Nerbonne et al., 2001). In den von uns untersuchten 3-6 Monaten alten *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse zeigten sich echokardiographisch, licht- und elektronenmikrokopisch keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Myokard von gleichaltrigen *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen. Mittels *Western Blotting* etablierten wir im nächsten Schritt die Expression von KCNE2 in ventrikulärem Herzmuskelgewebe der Maus. *Elektromapping*-Studien in isolierten Herzen zeigten eine verlängerte Aktionspotentialdauer (APD) in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen im Vergleich zu *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen. Diese Verlängerung der APD scheint durch einen verminderten Kv-Auswärtsstrom hervorgerufen zu sein. Mittels zellulärer Elektrophysiologie (*patch-clamp*) in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten konnten wir zeigen, dass die Verlängerung der APD durch eine signifikante Reduzierung des Repolarisationsstromes $I_{K,slow1}$ (durch Kv1.5-Kanäle generiert) und $I_{to,f}$ (durch Kv4.2-Kanäle generiert) hervorgerufen wird. Co-Immunpräzipitationsstudien zeigten, dass KCNE2 sowohl mit Kv1.5- als auch Kv4.2-Kanälen eine physikalische Verbindung eingeht, wohingegen

sich KCNE2 nicht mit Kv4.3 und Kv1.4 co-immunopräzipitieren ließ. Immunohistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Kv1.5 konnten zeigten, dass die *KCNE2*-Deletion das physiologische *trafficking* der Kv1.5-Untereinheit an den *Discus Intercalaris* der ventrikulären Herzmuskelzelle verhindert. Das *baseline*-EKG der *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse war zunächst unter einer Narkose mit Isofluran nicht von dem der *KCNE2*$^{+/+}$-Mäuse zu unterscheiden. Als die Mäuse jedoch eine Anästhesie mit dem Volatil-Anasthetikum Sevofluran erhielten, welches einen repolarisations-verlängernden Effekt besitzt (durch Hemmung von Kv4.2-Kanälen), demaskierte sich eine signifikante Verlängerung des QT_c-Intervalls in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen gegenüber *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen.

2.5 *KCNE2* ist essentiell für die Biosynthese von Schilddrüsenhormonen

Vor über einer Dekade wurde die Expression der Kv-α-Untereinheit KCNQ1 in humanem Schilddrüsengewebe nachgewiesen – eine weitere funktionelle Analyse dieses Kv-Kanals in der Schilddrüse erfolgte jedoch nicht (Yang et al., 1997). Basierend auf unseren Ergebnissen aus den Studien zu KCNE2-KCNQ1-Kanälen in den polarisierten Epithelien der Magenschleimhaut untersuchten wir im Folgenden die Rolle von KCNE2-KCNQ1-Kanälen im polarisierten Epithel der Schilddrüse anhand des *KCNE2*$^{-/-}$-Maus-Modells (Roepke et al., 2009).

Im Gegensatz zur Magenschleimhaut, in der der KCNE2-KCNQ1-Kanalkomplex an der apikalen Membran der PC lokalisiert ist, finden sich KCNE2-KCNQ1-Kanäle in der Schilddrüse an der basolateralen Membran der Thyreozyten. Wir konnten zeigen, dass die beiden Kaliumkanal-Untereinheiten sowohl in der Schilddrüse der Maus als auch in humanem Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus-Basedow im basolateralen Kompartiment der follikulären Schilddrüsenepithelzellen exprimiert sind und dort co-lokalisieren. Zusätzlich gelang es uns einen TSH-stimulierten, konstitutiv aktiven Kalium-*leak*-Kanal bestehend aus KCNQ1 und KCNE2 in der Schilddrüsen-Zelllinie FRTL-5 nachzuweisen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine Abflachung des Schilddrüsenepithels in *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen und die Verminderung der Anzahl der Mikrovilli an der Oberfläche der Thyreozyten in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen.

Wie in Kapitel 2.1 erwähnt, sind neugeborene *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse von *KCNE2*$^{+/-}$-Zuchteltern in ihrem äußeren Erscheinungsbild und ihrer Entwicklung von *KCNE2*$^{+/+}$-Geschwistern nicht zu unterscheiden. Wenn man jedoch *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse miteinander verpaart, um reine homozygote Würfe von *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen zu generieren, ändert sich der Phänotyp dieser Neugeborenen drastisch. *KCNE2*$^{-/-}$-Nachkommen von *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern zeichnen sich durch einen manifesten klinischen Hypothyreoidismus mit Hyposomie, Alopezie, Struma, 50%ige embryonale Letalität und kardiale Pathologien in Form von ventrikulärer Hypertrophie mit myokardialer Fibrose und Herzinsuffizienz aus. Entsprechend dem klinischen Bild des Hypothyreoidismus waren die Serum-konzentrationen des freien Thyroxin signifikant erniedrigt in den neugeborenen *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen von *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern, korrespondierend zeigte sich ebenfalls eine signifikant

höhere Serumkonzentration von TSH in diesen Tieren. Mittels nuklearmedizinischer Untersuchungen (microPET) mit radioaktiv markiertem Jod konnten wir eine signifikant verminderte Akkumulation von ^{124}I in Schilddrüsengewebe von *KCNE2*$^{-/-}$-Neugeborenen und *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern nachweisen. In den microPET-Untersuchungen zeigte sich ebenfalls, dass sowohl der Genotyp der Mutter als auch der Genotyp der Neugeborenen Determinanten für das Entstehen eines Schilddrüsenhormon-synthesedefektes mit konsekutiver Hypothyreose sind.

Um zu überprüfen ob die oben genannten Symptome tatsächlich durch eine Schilddrüsenunterfunktion hervorgerufen wurden, substituierten wir sowohl die Neugeborenen *KCNE2*$^{-/-}$.Mäuse von homozygoten *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern als auch die älteren *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse von *KCNE2*$^{+/-}$-Müttern mit Schilddrüsenhormonen (T3 und T4). Hierdurch normalisierte sich das Körpergewicht der Neugeborenen und der Haarwuchs kehrte bei den Neugeborenen und bei den älteren *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen zurück. Ähnliche Ergebnisse ließen sich mit Leihmutter-Experimenten erzielen, wenn Neugeborene *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse durch *KCNE2*$^{+/+}$-Mütter großgezogen wurden. Zudem zeigten sich in diesen Experimenten echokardiographisch ein Rückgang der Herzhypertrophie und eine Erholung der Pumpfunktion des Myokards gemessen an einer Zunahme des *Fractional Shortening*. Umgekehrt ließen sich Herzhypertrophie mit Herzinsuffizienz, Alopezie und Hyposomie in *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen induzieren, wenn diese durch *KCNE2*$^{-/-}$-Mütter großgezogen wurden.

3. Diskussion

Die Rolle von Kaliumkanälen bei der Produktion der Magensäure ist bislang unzureichend verstanden. Das zentrale Element der Salzsäureproduktion des Magens ist die Protonenpumpe (H^+-K^+-ATPase), die im Austausch gegen ein H^+-Ion ein K^+-Ion in die Parietalzelle aufnimmt. Die H^+-K^+-ATPase funktioniert jedoch nur dann, wenn von der luminalen Magenseite genügend Kalium über die apikale Membran wieder in die Zelle aufgenommen werden kann. Dieser Prozess wird durch Kaliumkanäle in der apikalen Membran der Parietalzelle gesteuert. Eine Reihe von Kaliumkanälen wurde für die Rezirkulation von Kaliumionen über die apikale Parietalzellenmembran verantwortlich gemacht (Geibel et al., 2005). Frühere Arbeiten konnten die genetische Evidenz erbringen, dass der spannungsabhängige Kaliumkanal KCNQ1 für den Kalium-*recycling*-Mechanismus an der apikalen PC-Membran von besonderer Wichtigkeit ist, weil *KCNQ1*$^{-/-}$-Mäuse an einem kompletten Verlust der Magensäureproduktion leiden (Lee et al., 2000 und Vallon et al., 2005). In einer Serie von weiteren Studien konnten jedoch auch verschiedene andere Kaliumkanäle identifiziert werden, die ebenfalls für diesen *pathway* verantwortlich schienen (Waldegger et al., 2003). Insbesondere wurde die Expression von *Inward rectifier*-Kaliumkanälen in der Magenmukosa beschrieben. Kir2.1 zum Beispiel co-lokalisiert mit der H^+-K^+-ATPase in der PC der Magenschleimhaut und Kir2.1-Kanäle reagieren mit einer Zunahme der Kaliumstromamplitude, wenn diese mit niedrigem pH und Protein Kinase A stimuliert werden (Malinowska et al., 2004). Ebenso sind Kir4.1, Kir4.2 und Kir7.1 an der apikalen Membran von Parietalzellen der Magenschleimhaut zu finden (Fujita et al., 2002). Zudem blockiert der Einsatz von Ba^{2+}-Ionen die Protonsekretion der PC in *in vitro*-Experimenten. Ba^{2+}-Ionen sind potente Inhibitoren vor allem für *inward rectifier*-Kanäle (Fujita et al., 2002). Eine genetische Evidenz an Hand von Knockoutmäusen dieser verschiedenen Kaliumkanäle gibt es bislang jedoch nicht. Obwohl die genetische Elimination von *KCNQ1* und *KCNE2* nahezu zu einem kompletten Ausfall der Magensäuresekretion führt, kann nicht vollständig ausschlossen werden, dass auch die *Inward rectifier* oder andere Kaliumkanäle eine Rolle bei der Säuresekretion spielen.

Ein Säuredefekt für *Kir2.1*$^{-/-}$-Mäuse ist bislang nicht beschrieben; *Kir2.1*$^{-/-}$-Mäuse entwickeln jedoch kurz nach der Geburt eine Palatoschisis (Zaritzky et al., 2001).

Die essentielle Rolle von KCNE2 bei Säuresekretion des Magens der Maus legt nahe, dass auch Genvarianten von *KCNE2* mit einer Hypochlorhydrie oder Achlorhydrie assoziiert sein könnten. Insbesondere da unsere Daten einen Gen-Dosis Effekt bei der Magensäuresekretion zeigen und *KCNE2*$^{+/-}$-Mäuse einen intermediären Phänotyp aufweisen. So könnten zum Beispiel Patienten mit heterozygoten *KCNE2*-Genvarianten, die an LQTS leiden, ebenfalls auch einen Defekt der Säureproduktion des Magens erleiden. Berichte über Dysfunktion der Magensäureproduktion sind bislang jedoch bei Patienten mit *KCNE2* oder *KCNQ1* assoziiertem LQTS nicht beschrieben worden. Diesbezüglich wurden allerdings auch noch keine konkreten Studien durchgeführt. Des Weiteren könnte ein Speziesunterschied zwischen Maus und Mensch vorliegen und der KCNQ1-KCNE2-Kv-Kanal im humanen System eine untergeordnete Rolle spielen.

Da die Pharmakologie von heteromeren KCNQ1-KCNE2-Kaliumkanälen grundsätzlich anders ist als die Pharmakologie von homomeren KCNQ1 oder heteromeren KCNQ1-KCNE1- oder KCNQ1-KCNE3-Kanälen, wären spezifische Inhibitoren für KCNQ1-KCNE2-Kaliumkanalkomplexe für hypersekretorische Syndrome wie GERD oder Magenulcera eine weitere Therapieoption. Unerwünschte Nebenwirkungen, wie zum Beispiel die Suppression des myokardialen Repolarisationsstromes I_{Ks}, könnten so vermieden werden.

Unerwarteterweise resultierte die Deletion von *KCNE2* in der Form eines kompensatorischen *Remodelling*, in der KCNQ1, der Kv-α-Partner, signifikant hochreguliert war. Dieses *Remodelling* ist jedoch nicht suffizient genug um eine ausreichende Säureproduktion der Parietalzelle aufrecht zu erhalten. Dies untermauert die Notwendigkeit der Anwesenheit von KCNE2 bei der Magensäureproduktion weiter. Vermutlich ist die Konversion von KCNQ1 durch KCNE2 in einen spannungsunabhängigen Kalium-*leak*-Kanal, der auf diese Weise einen kontinuierlichen Nachschub an Kaliumionen über die apikale PC Membran liefert, notwendig (siehe auch Abbildung 2). Der komplette Verlust der Magensäureproduktion der *KCNE2*$^{-/-}$-Maus scheint jedoch weiterhin überraschend und wirft bei genauerer Betrachtung auch vor

dem Hintergrund der Formation eines spannungsunabhängigen, heteromeren KCNE2-KCNQ1-Kv-Kanalkomplexes an der apikalen PC Membran weitere Fragen bezüglich des genauen Mechanismus des Verlustes der Magensäureproduktion auf. Wie Abbildung 2 verdeutlicht, haben homomere KCNQ1-Kanäle eine wesentlich höhere Kaliumstromamplitude bei einer Membranspannung im Bereich von -40 bis -20 mV als heteromere KCNE2-KCNQ1-Kv-Kanäle, wenn diese in heterologen Expressionssystemen studiert werden (Tinel et al., 2000). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass homomere KCNQ1-Kanalkomplexe an der apikalen Membran der Parietalzelle in *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen nicht in der Lage wären, einen ausreichenden Kaliumstrom zu generieren, um die Funktion der H^+-K^+-ATPase aufrecht zu erhalten – zumal KCNQ1-Kanäle in ihrer Expression in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mägen deutlich vermehrt sind. Es sei denn, KCNQ1 benötige tatsächlich KCNE2 im sauren Magenmilieu, da homomere KCNQ1-Kanäle durch niedrigen pH partiell inhibiert werden und heteromere KCNQ1-KCNE2-Kaliumkanäle bei pH 3 der extrazellulären Flüssigkeit immer noch Strom leiten können (Heitzmann et al., 2004).

Wie kann es also nun zur Ausbildung eines solch drastischen Phänotyps kommen? Eine Antwort auf diese Frage lieferte unsere Folgestudie (Roepke et al., 2011). In den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen zeigte sich überraschenderweise eine streng basolaterale Lokalisation der KCNQ1-Kanäle in den Parietalzellen. Zusätzlich zeigte sich eine vermehrte Formation von heteromeren KCNE3-KCNQ1-Kaliumkanälen an der basolateralen Membran der PC in *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen. Die Studie beschreibt daher insgesamt 2 neue Aspekte in der KCNE assoziierten Kv-Kanal-Physiologie: Zum einen wird mit dieser Arbeit erstmalig die Entdeckung der Eigenschaft einer KCNE-Untereinheit beschrieben, als eine *trafficking*-Hilfsuntereinheit für Kv-Kanäle *in vivo* zu dienen. Zum anderen beschreiben wir hier erstmalig das Auftreten eines KCNE-*Remodelling* in einem *KCNE*-Knockoutmausmodell und seine funktionellen Konsequenzen *in vivo*. Wir konnten somit erstmalig zeigen, dass die Deletion von *KCNE2* in einer pathologischen basolateralen Lokalisation der KCNQ1-α-Untereinheit resultiert und dass *KCNE3* für eine Umleitung des KCNQ1-α-Komplexes an die basolaterale Membran notwendig ist. Unsere Daten stehen in Kontrast zu einer kürzlich publizierten Studie über KCNQ1-*trafficking* in MDCK (Madin-Darby-Canine-Kidney)

Zellen (Jespersen et al., 2004). In dieser Studie konnte eine ausschließlich basolaterale Lokalisation von KCNQ1 nachgewiesen werden, unabhängig davon, mit welcher KCNE-Untereinheit (KCNE1-5) der KCNQ1-Kv-Kanal dort co-exprimiert wurde.

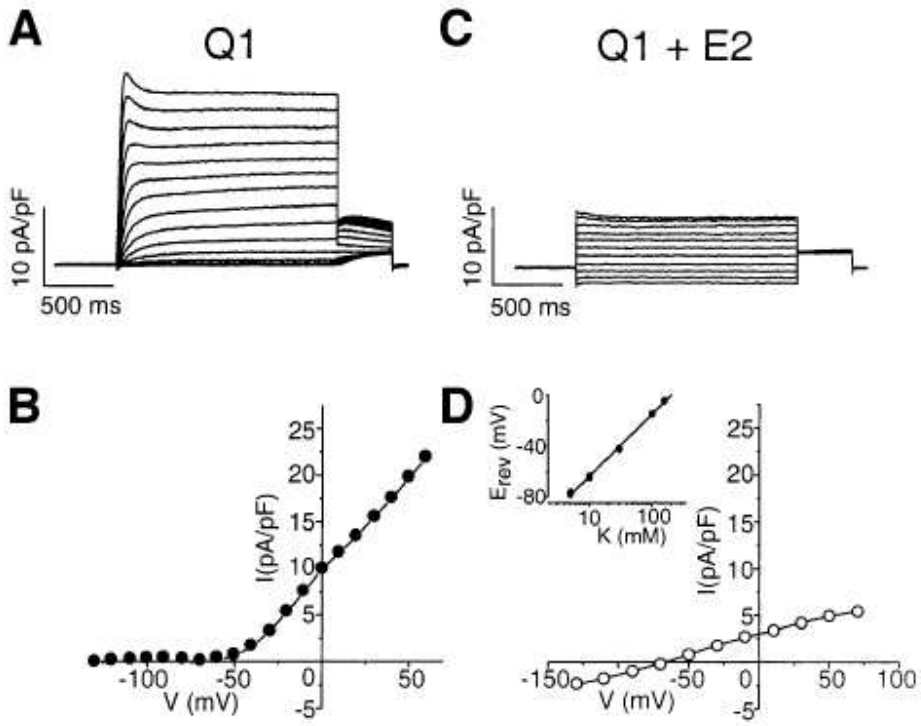

Abbildung 2. Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften von homomeren KCNQ1 versus heteromere KCNQ1-KCNE2-Kv-Kanäle in COS-7 Zellen. Es zeigt sich eine signifikant höhere Stromdichte von homomeren KCNQ1 Kanälen im Vergleich zu heteromeren KCNE2-KCNQ1-Kanälen u.a. im Spannungsbereich der Zellmembran von -40 bis -20 mV, welches ungefähr dem Membranpotential der Parietalzelle entspricht (Tinel et al., 2000).

Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe vor kurzem nachweisen, dass KCNE2-KCNQ1 heteromere Kv-Kanal-Komplexe an der basolateralen Schilddrüsenmembran bilden (Roepke et al., 2009). Noch mehr Verwirrung bzgl. KCNE-abhängigem KCNQ1-*trafficking* liefert eine jüngere Studie, in der *KCNE3* nicht notwendig für die basolaterale Lokalisation von KCNQ1 in den Kryptzellen des Colons zu sein scheint (Preston et al., 2010). Die oben genannten Studien illustrieren, dass das KCNQ1-*trafficking* in polarisierten Epithelien eindeutig zelltypspezifisch ist. Dieser Zusammenhang ist

wahrscheinlich damit begründet, dass unterschiedliche Epithelien eine unterschiedliche Expression von Proteinen wie zum Beispiel dem µ1B, einem AP-1-Clathrin-Adaptor-Komplex besitzen, die das *trafficking* von bestimmten Proteinen in diesen polarisierten Zellen dirigieren (Matter et al., 1992, Odorizzi et al., 1996 und Duffield et al., 2004).

Die hier erhobenen Daten betonen nicht nur die Notwendigkeit einer apikalen Lokalisation des KCNQ1-Kanalkomplexes an der PC Membran, sondern auch die notwendige Assoziation mit KCNE2, um eine vollständige Funktionalität zu erreichen. KCNQ1-KCNE3-Kanäle sind zum Beispiel Säure-insensitiv und wie KCNQ1-KCNE2-Kanalkomplexe konstitutiv aktiv. Man würde also vermuten, dass heteromere KCNQ1-KCNE3-Kanäle ebenfalls einen Kalium-*recycling-pathway* bilden könnten und so die Säuresekretion des Magens in *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen aufrechterhalten könnten. Dies gelingt jedoch nicht, da sie vom basolateralen Kompartiment diese Eigenschaften nicht erfüllen können, obwohl sie in *KCNE2*$^{+/-}$-Mäusen die Magensäuresekretion partiell wiederherstellen konnten. In gleicher Weise konnte allerdings auch die apikale Re-Lokalisation von homomeren KCNQ1-Kanälen in *KCNE2*$^{-/-}$-*KCNE3*$^{-/-}$-Mäusen keine Wiederherstellung der Magensäuresekretion erbringen. Wir vermuten, dass dies in erster Linie daran liegt, dass homomere KCNQ1-Kanäle spannungsabhängig sind und zudem bei niedrigem pH inhibiert werden. Weitere Studien sind notwendig (Proteomics/*KCNE2*$^{-/-}$-*KCNE3*$^{-/-}$-Doppel-Knockoutmäuse) um zu klären, ob zusätzliche Untereinheiten apikales und/oder basolaterales *trafficking* des KCNQ1-Komplexes determinieren.

Der zugrunde liegende Mechanismus der basolateralen Expression heteromerer KCNQ1-KCNE3-Kaliumkanäle ist wahrscheinlich KCNE3- und PC-abhängig. Unsere Co-IP Daten suggerieren, dass sich zu einem kleinen Teil bereits KCNQ1-KCNE3-Komplexe in den *KCNE2*$^{+/+}$-Mäusen bilden, welche außerhalb der PC in 2 weiteren Zelltypen der Magenmukosa vorkommen (Belegzellen und Hauptzellen). Diese Zellen sind nicht in der Mitte der Magendrüsen lokalisiert und besitzen keine Expression der H^+-K^+-ATPase und KCNE2. Alternativ könnten KCNQ1-KCNE3-Komplexe auch in relativ geringer Konzentration in Wildtyp-PC vorhanden sein. Weitere Studien sind zwingend notwendig, um zu klären welche Funktion ein mutmaßlicher KCNQ1-KCNE3-Komplex in PC besitzt oder ob es sich um gemischte KCNQ1-KCNE2-KCNE3-

Komplexe handelt. Diese Art von dreiteiligem Kaliumkanal wurde zuvor bereits im Gehirn der Maus beschrieben, hier allerdings zusammengesetzt aus KCNE1, KCNE3 und KCNH3 (Clancy et al., 2009).

Eine vermehrte Formation von heteromeren KCNQ1-KCNE3-Kaliumkanal-Komplexen an der basolateralen Membran der Parietalzellen des Magens eröffnet zusätzlich neue Aspekte für die Pathophysiologie KCNE2-assoziierter Herzrhythmusstörungen. So könnte zum Beispiel eine gewisse Kompensation des Kalium-*recycling* über vermehrt gebildete basolaterale KCNQ1-KCNE3-Kaliumkanäle die Säuresekretion zu einem gewissen Prozentsatz aufrecht erhalten werden. Eine gesteigerte Sekretion von Kalium in die Blutbahn über die basolaterale Membran würde zudem zu einer latenten bis manifesten Hyperkaliämie führen. Über diesen Mechanismus könnte auch die Funktion der myokardialen Kaliumkanäle beeinflusst und damit die Arrhythmogenese gefördert werden. Experimente, die diese Hypothese prüfen sollen, werden zurzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die morphologischen Veränderungen der Magenschleimhaut der *KCNE2*$^{-/-}$-Maus sind auf die schleimsezernierenden Zellen verteilt. Eine ähnliche Hyperplasie war zuvor in *KCNQ1*$^{-/-}$-Mäusen und einem Knockoutmaus-Modell für die H^+/K^+-ATPase-β^- Untereinheit beschrieben worden (Lee et al., 2000 und Franic et al., 2001). In Letzterem war die Hyperplasie der Magenschleimhaut bedingt durch eine sekundäre Hypergastrinämie, da *H^+/K^+-ATPase-$\beta^{-/-}$-Gastrin*$^{-/-}$-Doppel-Knockoutmäuse eine solche Hyperplasie nicht entwickelten. Dementsprechend könnte die Hyperplasie in unseren Mäusen auch durch eine sekundäre Hypergastrinämie verursacht sein. Allerdings wurde in diesem Zusammenhang vor kurzem eine Studie publiziert, die eine Assoziation von KCNE2 und Hypertrophie, Metaplasie und malignem Wachstum auch ohne einen Einfluss durch Gastrin beschreibt (Yanglin et al., 2007).

Eine Gastritis Cystica Profunda präsentiert sich beim Menschen typischerweise mit intermittierenden Magenkrämpfen, Blähungen, gastro-intestinaler Obstruktion und/oder oberer gastro-intestinaler Blutung. Oft ist bei den Patienten ein Zustand nach partieller Gastrektomie oder Gastrostomie anamnestisch zu erheben (Bechade et al., 2007), obwohl in einigen Fälle keine Assoziation zu einer vorausgegangenen Operation herzustellen ist (Bechade et al., 2007 und Kurland et al., 2006). Man nimmt an, dass die

Pathogenese der GCP von einer Verletzung der Muskularis Mukosae des Magens ausgeht und sich im weiteren Verlauf ektope Magendrüsen in der Submukosa, Muskularis Mukosae und Serosa absiedeln und dort eine chronische Entzündungsreaktion auslösen. Obwohl die GCP als benigne klinische Entität beschrieben wird, wurden einige Fälle mit Adenokarzinomen des Magens in Verbindung gebracht (Mitomi et al., 1998, Park et al., 2001 und Yamashita et al., 2002). GCP kann auch experimentell in Labortieren hervorgerufen werden. Hier findet sich die GCP meist nach Infektion mit *Helicobacter* Sp. und wurde als Vorläufer von intramukosalen Dysplasien und Neoplasien beschrieben. Es zeigt sich hier auch eine Assoziation mit der Entwicklung von Magenkarzinomen (Wang et al., 2000). GCP konnte bislang häufig in der Mongolischen Wüstenmaus nachgewiesen werden, wenn diese mit *H. pylori* infiziert wurden. In diesem Modell entwickelten die Wüstenmäuse ebenfalls ein Adenokarzinom des Magens und eine lymphoide Hyperplasie (Zheng et al., 2004). In Mäusen konnte bislang eine GCP in einem genetischen Modell der *TGF beta*$^{+/-}$-Maus nachgewiesen werden (Boivin et al., 1996). Hier zeigten sich morphologische Veränderungen wie bei der humanen GCP zusammen mit inflammatorischen Infiltrationen in der umgebenden Mukosa und einer chronischen Vasculitis in der Nähe des betroffenen Gewebes. In *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen zeigt sich nun erstmalig eine GCP unabhängig von primären inflammatorischen Infiltraten. Wir vermuten daher, dass in unserem Modell der ursächliche Mechanismus über die Ausschaltung von *KCNE2* vermittelt ist, da dies zu einem Verlust der Säureproduktion des Magens führt (siehe oben) und somit eine „funktionelle Atrophie“ der PC-Population darstellt. In früher durchgeführten Studien, die sich mit intestinaler Metaplasie beschäftigen, wurde ein Verlust der PC, eine oxyntische Atrophie, für die Ätiologie der intestinalen Metaplasie verantwortlich gemacht. Dies wurde als ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der GCP angesehen (Giraud et al., 2007).

Eine oxyntische Atrophie kann experimentell auch ohne das Vorhandensein einer signifikanten Inflammation durch die Applikation des Neutrophilen Elastase Inhibitors DMP-777 induziert werden (Ogawa et al., 2006). Dies geschieht durch die Wirkung von DMP-777 als Protonophor an der Parietalzelle. In *Gastrin*$^{-/-}$-Mäusen führt eine Behandlung mit DMP-777 schnell zur Ausbildung einer TFF-2 positiven Metaplasie des

Magens, die auch als SPEM (Spasmolytic Polypeptide Expressing Metaplasia) bezeichnet wird (Nozaki et al., 2008). SPEM ist insofern auch von klinischer Relevanz, da eine enge Assoziation von SPEM und humanem Adenokarzinom des Magens bekannt ist und SPEM in der Mehrzahl der Fälle in Biopsien von *H. pylori*-assoziierten Gastritisfällen beim Menschen gefunden wird (Schmidt et al., 1999). Das Auftreten von SPEM in unserem experimentellen *KCNE2*$^{-/-}$-Modell suggeriert jedoch, dass die „funktionelle Atrophie“ durch die Deletion von *KCNE2* bereits der Trigger für das Auftreten der SPEM zu sein scheint - auch ohne das Vorhandensein der klassischen oxyntischen Atrophie oder einer Infektion mit *H. pylori*. Ein großer Unterschied zwischen unserer Studie und der von Nozaki et al. ist jedoch, dass die *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse hypergastrinämisch sind und nicht *Gastrin*-depletiert. Ein anderer Unterscheid besteht darin, dass DMP-777 den tubulovesikulären Protonengradienten zerstört, ohne die Funktion der H^+-K^+-ATPase zu beeinflussen, wohingegen die genetische Ausschaltung von *KCNE2* eine Funktionsstörung der apikalen H^+-K^+-ATPase durch den Ausfall des luminalen Kaliumsubstrates bewirkt (Roepke et al., 2006 und Nozaki et al., 2008). In zukünftigen Experimenten wird sich zeigen, ob dieser Mechanismus zu den kritischen Ereignissen der Induktion einer oxyntischen Atrophie führt, welche in einer SPEM mündet. Zur Zeit nimmt man an, dass eine SPEM-Induktion aus einem Mangel einer Sekretion von Regulatoren, die eine normale Regeneration der Magenmukosa bewirken, resultiert, vor allem durch den Untergang von Parietalzellen. Zu diesen Faktoren zählen zum Beispiel TGF-α und *sonic hedgehog* (Stepan et al. 2005 und Beauchamp et al., 1989). Zukünftig werden Experimente an Parietalzellen der *KCNE2*$^{-/-}$-Maus durchgeführt, die sich auf die Fragestellung fokussieren, welche Regulatoren die *KCNE2*$^{-/-}$-PC noch sezernieren können und welche nicht.

Kaliumkanäle sind der letzten Zeit als interessante Ziele für eine anti-proliferative pharmakologische Krebstherapie beschrieben worden (Conti et al., 2004). Zu diesen zählen auch KCNQ1, hERG und Kv2.1, die allesamt als Partner-Untereinheiten von KCNE2 gelten. Mutationen in *KCNQ1* können durch gestörtes *Imprinting* beim Menschen zum Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) führen, welches mit der Ausprägung einer Reihe von benignen und malignen Tumoren assoziiert ist (Wiedemann et al., 1983, Diaz-Meyer et al., 2003, Fitzpatrick et al., 2002 und Weksberg

et al., 2001). In Mäusen prädisponiert die Deletion von *KCNQ1* zu der Entwicklung einer intestinalen Metaplasie (Lee et al., 2001). Die hERG-Kv-Kanal-α-Untereinheit, welche zum Beispiel Kv-Kanal-Komplexe mit KCNE2 im menschlichen Ventrikel bildet, ist in einigen Tumoren überexprimiert und wurde, wie auch Kv2.1, als ein Tumor-*survival*-Faktor beschrieben (Suzuki et al., 2004, Cherubini et al., 2000, Bianchi et al., 1998 und Arcangeli et al., 1999).

In einer kürzlich erschienen Studie wurde *KCNE2* als ein herunterreguliertes Gen in humanem Magenkrebsgewebe identifiziert (Yanglin et al., 2007). Zusätzlich zeigte sich, dass eine experimentelle Hochregulierung von *KCNE2* anti-proliferative Effekte auf eine Magenkrebszelllinie *in vitro* besitzt. Der hierfür verantwortlich gemachte Mechanismus für diesen antiproliferativen Effekt war eine Herunterregulierung des Cyclin D1, welches eine Verzögerung der Progression des Zellzyklus hervorruft. Einen ähnlichen Effekt auf den Zellzyklus hat auch der hERG-Inhibitor Cisapride (Shao et al., 2005). Eine erhöhte Expression von Cyclin D1 in menschlichem Krebsgewebe des Magens im Gegensatz korreliert mit einer besonders schlechten Prognose (Gao et al., 2004). Ein genaueres Verständnis der unterschiedlichen Faktoren, welche eine Elevation der Cyclin D1-Expression bewirkt könnte daher zu neuen Therapieoptionen bei Magenkrebs führen. Eine Überexpression von Cyclin D1 in diesem Zusammenhang scheint auch in anderen Krebsarten eine Rolle bei der Oncogenese zu spielen, zum Beispiel bei Ösophaguskarzinom (Jiang et al., 1992), beim ovarialen, endometrischen Adeno-karzinom (Zhai et al., 2002) und beim Gallenblasenkarzinom (Itoi et al., 2000). In unserer Studie beschreiben wir ausgedehnte metaplastische Veränderung der Magenmukosa, welche durch die genetische Ausschaltung von *KCNE2* hervorgerufen werden. Diese Veränderungen sind assoziiert mit einer erhöhten nukleären Cyclin D1 Expression und erinnern an die *in vitro* Daten der Yanglin-Studie. Jedoch erklärt keine dieser beiden Studien den genauen Mechanismus für die Cyclin D1 Hochregulierung in der Magenmukosa hinreichend. Ist dies Folge der metaplastischen Veränderungen der Mukosa oder gibt es eine direkte Assoziation zwischen KCNE2 und Cyclin D1? Die Studie von Yanglin liefert eher Argumente für eine direkte Assoziation zwischen KCNE2 und Cyclin D1, da hier die Veränderungen in isolierten Zellen unabhängig von einer Achlorhydrie entstehen. Wir denken jedoch, dass die metaplastischen Veränderungen

eher sekundär zu der ausgeprägten Achlorhydrie entstehen und somit dies den dominanten Effekt in der Entstehung der Metaplasie darstellt, obwohl ein direkter Zusammenhang in unserer Studie nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Interessanterweise ist der Kv-Kanal hERG ebenfalls in Magenkrebsgewebe exprimiert, in normaler Magenmukosa ist dieser jedoch nicht zu finden (Shao et al., 2005). Zusätzlich wurde beschrieben, dass der hERG-Kanal-Blocker Cisapride das Krebswachstum in Magenkrebsgewebe inhibiert, da dieser den Eintritt von Zellen in die S Phase von der G1 Phase des Zellzyklus verhindert und somit das Auftreten von Apoptose erhöht (Shao et al., 2005). Da KCNE2 die Stromamplitude des hERG-Kanals durch eine Reduktion der Leitfähigkeit für Kaliumionen und eine beschleunigte Deaktivierung supprimiert, kann man darüber spekulieren, ob der antiproliferative Effekt der KCNE2-Überexpression in dem *in vitro*-Modell durch eine Suppression der hERG-Stromaplitude und nachgeschalteter vermehrter Apoptose hervorgerufen wurde. Umgekehrt würde eine Herunterregulierung von *KCNE2* über eine gesteigerte hERG Stromaplitude eine Proliferation der Mucosazellen fördern. Weitere Untersuchungen, um den Einfluss von Kv-Kanälen auf Proliferation zu klären, sind hier jedoch zwingend notwendig.

Auch wenn in den letzten Jahren große Fortschritte bezüglich der Identifizierung der molekularen Identität der unterschiedlichen Kv-Kanal-α-Untereinheiten bei der ventrikulären Repolarisation gemacht wurden, bleibt unser Verständnis über Kv-Kanal-β-Untereinheiten und deren Rolle bei der myokardialen Repolarisation und wie diese Kv-Kanal-α-Untereinheiten beeinflussen, unzureichend. Mutationen und Polymorphismen in *KCNE2* wurden initial bei Patienten mit angeborenem und erworbenem LQTS identifiziert (Abbott et al., 1999 und Sesti et al., 2000). Auf Grund heterologer Expressionsstudien nahmen die Autoren dieser Studien an, dass KCNE2 über eine Regulation von hERG-Kaliumströmen eine Verlängerung der ventrikulären Aktionspotentiale verursacht, da die Kinetik von heteromeren hERG-KCNE2-Strömen der Kinetik von homomeren hERG-Kaliumströmen *in vivo* sehr ähnelt (Abbott et al., 1999). hERG ist die Kv-α-Untereinheit, die für I_{Kr} kodiert. I_{Kr} ist neben dem I_{Ks} Komplex (KCNQ1) eine der beiden wichtigsten Repolarisations-determinanten in humanem Herzmuskelgewebe. Weitere Evidenz dafür, dass KCNE2 hERG-Kanäle beeinflusst und

eine KCNE2-hERG-Dysfunktion zu LQTS führt, stammt von der Beobachtung, dass einige Gensequenzvarianten des *KCNE2* die Sensitivität von heteromeren KCNE2-hERG-Kaliumkanälen gegenüber einer Blockade durch QT-verlängernde Medikamente (z.B. Trimethoprim-Sulfamethoxazol) erhöhen (Sesti et al., 2000). Andere Genvarianten in *KCNE2* beeinträchtigen die Funktion von KCNE2-hERG-Kanälen bereits auf *baseline*-Ebene. Diese wird unter physiologischen Konditionen zwar noch toleriert, führt aber bei Hinzukommen einer weiteren I_{Kr}-Blockade zu einer relevanten Verlängerung des Aktionspotentials (Sesti et al., 2000 und Park et al., 2003). Das größte Problem der o.g. Studien ist jedoch, dass diese ausschließlich in heterologen Expressionssystemen wie z.B. in COS-7-, CHO- oder HEK-Zellen durchgeführt wurden und wir daher nicht genau wissen, ob die genannten Effekte ebenfalls *in vivo* auftreten. Ein gutes Modell zum Studium der Interaktion von Kv-Kanal-α und β-Untereinheiten *in vivo* sind daher genetische Maus-Modelle, da hier durch die Deletion einer bestimmten Untereinheit gezielte Rückschlüsse auf deren Funktion *in vivo* zulässig sind. Limitierend muss man jedoch erwähnen, dass sich die ventrikuläre Repolarisation der Maus jedoch in bestimmten Punkten von der des Menschen unterscheidet: So scheinen hERG-Kanäle zum Beispiel bei der ventrikulären Repolarisation von Herzmuskelgewebe in der adulten Maus keine besondere Rolle zu spielen (Nerbonne, 2004). I_{Kr} (hERG) und I_{Ks} (KCNQ1), die beiden Hauptdeterminanaten der humanen ventrkulären Repolarisation (Sanguinetti et al., 1996), können jedoch in embryonalen und fetalen Kardiomyozyten studiert werden und sind gegenwärtig Gegenstand laufender Studien, die sich auf die Analyse von KCNE2 in embryonalem Herzmuskelgewebe der Maus konzentrieren.

KCNEs zeichnen sich zudem durch eine hohe Promiskuität in ihrer Kv-α-Untereinheit-Partnerwahl aus, so dass auch andere KCNE2-Kv-α-Untereinheiten-Komplexe im Maus-Modell möglich scheinen. Bei der Repolarisation von Mäusemyokard spielt vor allem der I_{to}-Kanalkomplex eine herausragende Rolle. Dieser wird durch Kv4.2- und Kv4.3-Kanäle gebildet und kommt auch während der Repolarisationsphase 1 im menschlichen Myokard vor. In heterologen Expressionmodellen konnten bereits Zusammenhänge zwischen KCNE2 und Kv4.2 *in vitro* hergestellt werden (Zhang et al., 2001). In dieser Arbeit konnten wir nun auch erstmalig zeigen, dass KCNE2 auch *in vivo* stabile Kanalkomplexe mit Kv4.2 eingeht und dass die genetische Ausschaltung

von *KCNE2* mit einer signifikanten Herunterregulierung von Heteropodatoxin-sensitiven Kv-Strömen (generiert durch Kv4.2) assoziiert ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Kv4.2 in Herzmuskelzellen der Maus durch KCNE2 reguliert wird. Im menschlichen Myokard ist der I_{to}-Kv-Strom in der Repolarisationsphase 1 aktiv (Nerbonne, 2004). Krankheits-assoziierte Mutationen konnten im Kv4.2-Gen bislang allerdings noch nicht identifiziert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass KCNE2 seine QT-verlängernden Effekte zum Teil auch über eine Dysfunktion der I_{to}-Repolarisations-ströme entfaltet und dies Teil der Pathogenese des angeborenen und erworbenen LQTS ist. Weiterführende klinische und funktionelle Studien werden diesen hypothetischen Zusammenhang prüfen.

Interessanterweise zeigt die Auswertung unserer funktionellen Daten, dass neben I_{to} auch ein weiterer ventrikulärer Repolarisationsstrom durch die genetische Ausschaltung von *KCNE2* in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Mittels *patch-clamp* Technik von isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen konnten wir zeigen, dass der $I_{K,slow,1}$-Kaliumstrom um signifikante 50% in den *KCNE2*$^{-/-}$-Zellen reduziert ist. $I_{K,slow,1}$ ist im Mäusemyokard vor allem im Septum zu finden und wird durch den Kv1.5-Kaliumkanal generiert. In einem weiteren genetischen Maus-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass Kv1.5 für die murine ventrikuläre Repolarisation von Bedeutung ist (London et al., 2001). Co-Immunopräzipitationsstudien von KCNE2 und Kv1.5 zeigen zudem, dass ähnlich wie bei Kv4.2 eine physikalische Interaktion zwischen KCNE2 und Kv1.5 *in vivo* besteht. Eine funktionelle Assoziation von Kv1.5 und KCNE2 *in vitro* mittels heterologer Expression der Kaliumkanaluntereinheiten konnte bislang nicht nachgewiesen werden. In unserer Studie konnten wir mittels *Western Blotting* weiterhin zeigen, dass die Membranfraktion der Kv1.5-Kanäle in den Ventrikeln der *KCNE2*$^{-/-}$-Maus signifikant reduziert war. KCNEs waren zuletzt mit *trafficking* von Kv-α-Untereinheiten an die Zelloberfläche in *Caenorhabditis elegans in vivo* in Zusammenhang gebracht wurden (Bianchi et al., 2003 und Park et al., 2007). Immunohistochemische Analysen der Kv1.5-Expression konnten anschließend zeigen, dass der Kv1.5-Kanal in den *KCNE2*$^{-/-}$-Kardiomyozyten nicht an seiner üblichen Lokalisation – dem *discus intercalaris* zweier benachbarter Kardiomyozyten exprimiert war, sondern in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen an dieser Lokalisation fehlt. Unsere Daten zeigen dementsprechend nicht nur einen neuen

Kv-Kanal-α-Partner für KCNE2, sondern auch einen bis dahin unbekannten Mechanismus, über den eine Verlängerung der myokardialen Repolarisation im Mäusemyokard hervorgerufen werden kann. Diese überraschenden Ergebnisse suggerieren, dass KCNE-Untereinheiten als *Chaperones* für Kv-Kanal- α-Untereinheiten wirken können, um diese zu spezifischen subzellulären Kompartimenten zu dirigieren. Andere Studien belegen, dass weitere Kv-Kanal-β-Untereinheiten, wie zum Beispiel die im Zytosol lokalisierten KChAPs und die KChIPs, ähnliche Aufgaben als Kv-Kanal-α-Untereinheit *Chaperon* spielen (Shi et al., 1996 und Wible et al., 1998), so dass dies ein gemeinschaftliches Merkmal unterschiedlicher Kv-Kanal-β-Untereinheiten zu sein scheint.

Die Regulation von Kv1.5 durch KCNE2 in Herzmuskelgewebe ist auch insofern interessant, als dass Kv1.5-Kanäle auch in der menschlichen Physiologie eine Rolle bei der kardialen Repolarisation spielen. In humanem Myokard findet sich zwar keine Kv1.5-Expression im Ventrikel, Kv1.5 ist beim Menschen dafür in hoher Konzentration und ausschließlich in den Vorhöfen zu finden und scheint eine Rolle bei der Entstehung und der Unterhaltung von Vorhofflimmern zu spielen (Olson et al., 2006 und Wang et al., 1993). Vor kurzem wurden Mutationen in *KCNE2* beschrieben, die ebenfalls mit Vorhofflimmern in Zusammenhang gebracht wurden, obgleich diese mit einer KCNE2-KCNQ1-Dysfunktion im menschlichen Atrium erklärt wurden (Yang et al., 2004). Die Klärung der Frage, ob KCNE2 auch im Vorhof die Funktion von Kv1.5 beeinflusst und ob dies ein Mechanismus zur Entstehung von Vorhofflimmern darstellt bedarf weiterer Studien. Diese werden aktuell in unserem Labor durchgeführt. Dies ist von großer klinischer Relevanz, da relativ sensitive Kv1.5-Inhibitoren zur Behandlung von Vorhofflimmern zur Verfügung stehen, die gezielt Kv1.5-Kanäle auf Vorhofebene beeinflussen könnten, ohne Nebenwirkungen auf das ventrikuläre Myokard zu haben (Matsuda et al., 2001 Kobyashi et al., 2001).

Die Synthese von Schilddrüsenhormonen erfordert den aktiven Transportprozess von I^- aus dem Plasma in das Schilddrüsengewebe, wo die Konzentration von I^- 20 bis 40-mal höher ist. Hierfür ist der Iodid-Natrium-Symporter (NIS) an der basolateralen Membran der epithelialen Schilddrüsenzellen verantwortlich (Dai et al., 1996 und Levy et al., 1997). Intrazellulär wird I^- dann oxidiert und kovalent in Thyreoglobolin gebunden

(Dohan et al., 2003). Es ist bekannt, dass für den aktiven NIS Transportprozess ein Na^+-Efflux durch die basolaterale Na^+-K^+-ATPase erfolgen muss. Weitere Transporter oder Kanäle bei der Schildrüsenhormonsynthese sind bislang jedoch nicht bekannt. Mit der hier vorgelegten Arbeit konnten wir nun erstmalig zeigen, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle für die Funktion der Schilddrüse von substantieller Bedeutung sind. Wir konnten zeigen, dass heteromere KCNQ1-KCNE2-Kanalkomplexe an der basolateralen Membran von Thyreozyten essentiell für eine normale Akkumulation von I^- in der Schilddrüse sind. Vermutlich findet durch den KCNQ1-KCNE2-Kanalkomplex ein ähnlicher Rezirkulierungsprozess von Kalium-Ionen statt, wie dies bei dem Mechanismus der Salzsäuresekretion in der Parietalzelle des Magens der Fall ist. Dieser vollzieht sich in den Epithelzellen der Schilddrüse jedoch an der basolateralen Membran.

Der Zusammenhang zwischen kardialer und thyreoidaler Dysfunktion beim Menschen ist seit ca. 200 Jahren bekannt (Parry et al., 1825, Graves et al., 1835 und Basedow et al., 1840). Eine Schilddrüsendysfunktion beeinflusst die Entwicklung und Funktion von nahezu allen Organen und kann u.a. lebensbedrohliche Situationen wie bei der thyreotoxischen Krise und dem Myxödem-Koma hervorrufen (Gavin et al., 1991). Subklinischer Hypothyreoidismus ist zudem mit einem prolongierten QT-Intervall im Oberflächen-EKG assoziiert. Dies kommt zum Beispiel auch bei *loss of function* Mutationen in *KCNQ1* und *KCNE2* vor*,* die mit einem Long QT Syndrom assoziiert sind. Andererseits sind *gain-of-function* Mutationen in *KCNE2* und *KCNQ1* mit Vorhofflimmern assoziiert, einer Erkrankung, die sich unter andrem auch bei latenter und/oder manifester Hyperthyreose ausbilden kann. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten belegen, dass KCNE2 und KCNQ1 signifikant zur Funktion von Schilddrüsen-gewebe beitragen und lassen daher die Hypothese zu, dass es eine Schilddrüsen-komponente bei einigen *KCNE2*- und *KCNQ1*-assoziierten Herzrhythmus-störungen geben könnte. In vorangegangenen Studien zum plötzlichen Herztod und LQTS war man bislang immer davon ausgegangen, dass die beschriebenen Ionenkanaldefekte nicht kausal für strukturelle Herzerkrankungen verantwortlich gemacht werden konnten, die vereinzelt in Autopsiebefunden erhoben wurden (Tester et al., 2007). Vielmehr hat man sich, historisch bedingt, in der Vergangenheit generell daran gehalten, „elektrische“

Herzerkrankungen, die durch Ionenkanal-Mutationen bedingt waren, genetisch von „strukturellen“ Herzerkrankungen zu trennen. Dieses Konzept sollte unserer Meinung nach in Zukunft überdacht werden. Vor kurzem wurden ebenfalls Mutationen in *SCN5A* entdeckt (kodiert für den spannungsabhängigen Natriumkanal Nav1.5), die mit milder bis moderater kardialer Hypertrophie assoziiert waren (Burke et al., 2005). In einer weiteren Studie wurden zudem Mutationen in *SCN5A* gefunden, welche mit dem frühzeitigen Auftreten einer Dilatativer Kardiomyopathie (DCM), Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern assoziiert waren (Ge et al., 2008). Unsere Ergebnisse suggerieren in diesem Zusammenhang die Möglichkeit des Vorhandenseins einer gemeinsamen genetischen Basis für das Auftreten einer strukturellen Herzerkrankung und einer kardialen Arrhythmie in betroffenen Individuen. Unsere Studien eröffnen ferner die Möglichkeit, dass Mutationen in *KCNE2* und *KCNQ1* ihr arrhythmogenes Potential aus einem primär elektrischen Defekt durch Dysfunktion von Kaliumkanälen im Kardiomyozyten erhalten und/oder sekundär durch eine Schilddrüsendysfunktion hervorgerufen werden.

Weitere Evidenz für die Bedeutung von heteromeren KCNE2-KCNQ1-Kanälen bei der Biosynthese von Schilddrüsenhormonen liefert eine vor kurzer Zeit publizierte Studie aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. F. Lang in Tübingen. Hier konnte nachgewiesen werden, dass auch *KCNQ1*$^{-/-}$-Mäuse an einer Schilddrüsenunterfunktion leiden (Fröhlich et al., 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neben KCNE2 auch andere Mitglieder der KCNE Familie (KCNE1, KCNE3, KCNE4 und KCNE5) in menschlichem Schilddrüsengewebe vorkommen. In heterologen Expressionsstudien sind diese KCNE-Untereinheiten alle in der Lage, mit KCNQ1 Kaliumkanäle zu bilden (McCrossan et al., 2004), so dass weitere Studien an KCNE-Knockoutmäusen notwendig sind, um zu überprüfen, ob weitere KCNEs bei der Biosynthese von Schilddrüsenhormonen beteiligt sind.

Ein subklinischer Hypothyreoidismus kann zu Fettstoffwechselstörungen, endothelialer Dysfunktion, Herzrhythmusstörungen und neuropsychiatrischen Erkrankungen führen. Hypothyreoidismus wird darüber hinaus als ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer Herzinsuffizienz und einer KHK angesehen (Tang et al., 2005). Interessanterweise ist vor kurzem eine Publikation erschienen, die SNPs in der Nähe

von *KCNE2* mit dem frühzeitigen Auftreten eines Myokardinfarkt assoziieren (Kathiresan et al., 2009). Ob es sich hierbei tatsächlich um eine kausale genetische Verbindung zwischen subklinischer Hypothyreose-assoziierter, akzellerierter KHK (Hak et al., 2000) und frühzeitigem Myokardinfarkt handelt, werden zukünftige Untersuchungen zeigen, die gegenwärtig in unserem Labor durchgeführt werden.

Einen weiteren wichtigen Beitrag leistet unsere Studie zur Rolle von KCNE2 bei der Synthese von Schilddrüsenhormonen auch zu der Debatte, ob die Konzentration der Schilddrüsenhormone der Mutter in der Muttermilch hoch genug sind, um Neugeborene mit Hypothyreose therapeutisch zu versorgen (van Wassenaer et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist ebenfalls interessant, dass bereits ein subklinischer Hypothyreodismus der werdenden Mutter während der Schwangerschaft zu schweren neuronalen Fehlbildungen des Embryos führen kann (Opazo et al., 2008). Unsere Daten zeigen, dass zumindest in Mäusen die Konzentration von Thyroxin in der Muttermilch hoch genug ist, um hypothyreote Neugeborene zu versorgen. Der Verlust von *KCNE2* bei der Mutter hatte in unserem Modell eine Reduktion der T4 Konzentration in der Muttermilch und einen Rückgang der Milch-Ejektion zur Folge. Beide Defekte sind wahrscheinlich maßgeblich an dem schlechten Wachstum der Neugeborenen, die von *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern ernährt werden, beteiligt.

Der Mechanismus, der dem Ganzkörper-Phänotyp der *KCNE2*$^{-/-}$-Maus zugrundeliegt, und die molekularen Effekte der Leihmutterschaft scheinen komplex. *KCNE2*$^{-/-}$-Neugeborene können weniger effizient I^- in ihrer Schilddrüse akkumulieren als *KCNE2*$^{+/+}$-Neugeborene, wenn beide Genotypen durch *KCNE2*$^{+/+}$-Mütter gesäugt werden. Allerdings haben beide Genotypen die gleiche Fähigkeit, I^- zu akkumulieren, wenn sie von *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern gesäugt werden. Wir denken, dass der Defekt der I^--Akkumulation in der Schilddrüse der neugeborenen *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse teilweise durch andere Faktoren ausgeglichen werden kann, wie zum Beispiel Adaptation zu ihrer Entwicklung im Mutterleib in einer Umgebung einer niedrigen T4 Konzentration und eine Adaptation an die initial schlechte Milch-Ejektion mit niedrigem T4 der Muttermilch. Teil dieser Adaptation scheint eine verminderte I^--Exkretion der *KCNE2*$^{-/-}$-Neugeborenen zu sein. Ähnliche Befunde einer verminderten I^--Exkretion konnten zuvor in Zusammenhang mit manifestem Hypothyreoidismus berichtet werden (Oddie et al.,

1966). Die Phänotypen der *KCNE2*$^{-/-}$-Neugeborenen von *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern zeigen Charakteristika wie Alopezie und kardiale Hypertrophie, die nicht immer in hypothyreoten Maus-Modellen beschrieben wurden (Grüters et al., 2004). Diese Diskrepanz mag in Teilen damit erklärt sein, dass wir in unserer Studie Neugeborene von homozygoten *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen benutzt haben, wohingegen in anderen Studien meist die Nachkommen von heterozygoten Mäusen verwendet werden. Der Unterschied kann weiterhin durch die anderen extra-thyreoidalen Pathologien der *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse, wie etwa des Magenphänotyps, bedingt sein.

Ähnlich wie NIS ist auch KCNQ1 sowohl im Epithel der Schilddrüse als auch im Epithel der Brustdrüse vorhanden (Dai et al., 1996 und Tazebay et al., 2000). In der Mammadrüse assoziiert KCNQ1 mit KCNE3 und ist u.a. für die Kalium-Homöostase verantwortlich (vanTol et al., 2007). Obwohl eine Rolle von KCNE2 im Brustdrüsenepithel nicht ausgeschlossen werden kann, zeigen unsere PET-Daten, dass die Aufnahme von radioaktiv markiertem I^- in die Brustdrüse der *KCNE2*$^{-/-}$-Mütter durch die Deletion von *KCNE2* nicht signifikant verändert ist. Zusätzlich kann eine Schilddrüsendysfunktion während der Schwangerschaft das Risiko für die Entwicklung schwerer Schwangerschaftskomplikationen für Mutter und Fetus deutlich erhöhen. Das frühe Erkennen dieser Risikofaktoren, eine Therapie in Form von Supplementierung von Schilddrüsenhormonen oder eine thyreostatische Therapie bei Hyperthyreose sowie eine genetische Beratung sind daher zwingend indiziert.

4. Zusammenfassung

KCNEs sind einfach membrandurchspannende Kv-Kanal-β-Untereinheiten, die heteromere Membrankomplexe mit Kv-Kanal-α-Untereinheiten bilden und deren Funktion maßgeblich verändern. Sporadische Mutationen und häufige Polymorphismen in *KCNE*-Genen sind assoziiert mit dem Auftreten von angeborenen und erworbenen Long QT Syndrom (LQTS). Unser Wissen über die genauen Mechanismen, die zur Entstehung dieser KCNE-assoziierten Herzrhythmusstörungen führen ist jedoch limitiert. Zudem mehren sich in der letzten Zeit Berichte über weitere Erkrankungen (Adenokarzinom des Magens, Epilepsie, Vorhofflimmern, Schizophrenie etc.), welche mit Mutationen in KCNE-Genen assoziiert sind.

Um die Entstehung von KCNE-bedingten Herzrhythmusstörungen und anderer KCNE assoziierter Erkrankungen daher besser verstehen zu können, generierten wir *KCNE2*$^{-/-}$- und *KCNE3*$^{-/-}$-Mäuse und untersuchten diese mit Hilfe anatomischer, biochemischer, echokardiographischer, elektrophysiologischer und nuklearmedizinischer Methoden.

Auf diese Weise konnten wir erstmalig zeigen, dass KCNE2 eine essentielle Rolle bei der Magensäureproduktion spielt. Wir konnten nachweisen, dass KCNE2 in den Parietalzellen der Magenschleimhaut einen funktionsfähigen, konstitutiv aktiven K^+-‚leak'-Kanal mit der Kv-α-Untereinheit KCNQ1 bildet. Dieser Kv-Kanalkomplex ist notwendig, um K^+-Ionen über die apikale PC-Membran zu rezirkulieren, um so den notwendigen Kalium-Gradienten für die Funktion der apikalen H^+-K^+-ATPase, dem Schlüsselenzym der Magensäuresekretion, aufrecht zu erhalten. Wir konnten weiter zeigen, dass die Deletion von *KCNE2* zu einer Änderung der Polarität von KCNQ1 in PC führt. In *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen findet sich eine Expression des KCNQ1-Kanals an der basolateralen Membran der Parietalzelle - ein subzelluläres Kompartiment von dem aus die apikale K^+-Rezirkulation nicht aufrechterhalten werden kann. Zudem zeigte sich ein KCNE-*Remodelling* in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mägen mit 5-facher Hochregulierung von *KCNE3* sowie eine vermehrte Formation von heteromeren KCNE3-KCNQ1-Kv-Kanälen an der basolateralen PC-Membran der *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse. Durch die anschließende Generation von *KCNE2*$^{-/-}$-*KCNE3*$^{-/-}$-Doppel-Knockoutmäusen ließ sich die apikale Expression von KCNQ1 wieder herstellen, so dass eine aktive Re-Routierung des KCNQ1-Kanals durch

KCNE3 in den *KCNE2*$^{-/-}$-PC wahrscheinlich scheint. Eine Wiederaufnahme der Säuresekretion des Magens ist mit der erneute apikalen Lokalisation des KCNQ1-Kv-Kanals in den *KCNE2*$^{-/-}$*-KCNE3*$^{-/-}$-PC jedoch nicht zu erreichen. Wir schlussfolgern daraus, dass homomere KCNQ1-Kv-Kanäle insuffizient zur Aufrechterhaltung der Magensäure sind und die Assoziation mit KCNE2 in heteromere KCNE2-KCNQ1-Kv-Kanäle für diesen Prozess zwingend notwendig ist.

Weitere Untersuchungen des Magenphänotyps an unseren *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen zeigten, dass die Deletion von *KCNE2* bei älteren Tieren (12-15 Monate) zu einer prä-neoplastischen Pathologie führt, der *Gastritis Cystica Profunda*. Diese ist charakterisiert durch eine Herniation von neoplastischer, hypertrophierter Magenmucosa in die submucosa und muscularis. In einigen *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen ließ sich eine neoplastische Invasion ektoper Magenmucosa in dünnwandige Gefäße der submucosa feststellen. Immunohistochemisch konnten wir vermehrt Proliferations- und De-Differenzierungs-marker in den hypertrophierten und neoplastischen Mägen nachweisen. Eine Analyse von humanem Magenadenokarzinomgewebe zeigte darüber hinaus eine deutlich reduzierte Expression von KCNE2, so dass zusammenfassend eine *KCNE2*-Herabregulierung oder die genetische Ausschaltung von *KCNE2* als Risikofaktor für das Entstehen einer neoplastischen Magenschleimhaut angesehen werden muss.

Wir konnten ferner zeigen, dass *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse an einem ventrikulären Repolarisationsdefekt des Myokards leiden. Dieser manifestiert sich in Form einer verlängerten ventrikulären Aktionspotentialdauer. Zudem kommt es unter Anästhesie mit dem QT-Zeit verlängernden Anästhetikum Sevofluran zu einer signifikanten Verlängerung der QT_C des Oberflächen EKGs in den *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen. Molekulares Korrelat dieser Repolarisationsstörung ist eine signifikante Verminderung der Repolarisationsströme $I_{to,f}$ (generiert von Kv4.2), welcher durch die *KCNE2* Deletion um 25% verringert wird und $I_{K,slow1}$ (generiert von Kv1.5), welcher um 50% verringert ist. Wir konnten in dieser Arbeit weiter zeigen, dass die Deletion von *KCNE2* das korrekte *trafficking* des Kv1.5-Kanalproteins zum *discus intercalaris*, einer spezialisierten subzellulären Struktur des Kardiomyozyten, verhindert.

Mit einer weiteren Arbeit konnten wir erstmalig eine genetische Verbindung zwischen einer gestörten K^+-Kanal-Funktion des KCNQ1-KCNE2-Kanalkomplexes in

Schilddrüsengewebe und verschiedenen strukturellen Veränderungen des Herzens sowie anderer Organsysteme nachweisen. Neugeborene *KCNE2*$^{-/-}$-Mäuse von *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern weisen im Gegensatz zu *KCNE2*$^{-/-}$-Mäusen von *KCNE2*$^{+/-}$-Müttern einen ausgeprägten Hypothyreose-Phänotypen auf, bestehend aus Hyposomie, Alopezie, 50%-iger embryonaler Letalität, Struma und kardialen Veränderungen. Wir konnten zudem supprimierte periphere Schilddrüsenhormone und ein kompensatorisch erhöhtes TSH in den *KCNE2*$^{-/-}$-Tieren nachweisen. Schilddrüsenszintigraphisch ließ sich mittels radiaktiv-markierten Jods eine signifikant verminderte Akkumulation von ^{124}I in Schilddrüsengewebe von *KCNE2*$^{-/-}$-Neugeborenen und von *KCNE2*$^{-/-}$-Müttern nachweisen, welches für die Entstehung der Hypothyreose verantwortlich erscheint. Eine Substitution der betroffenen Mäuse mit Schilddrüsenhormonen (T3 und T4) führte zu einer Restitutio der genannten Pathologien der hypothyreoten Mäuse. Eine thyreoidale Genese der KCNE2 – und KCNQ1 - assoziierten Herzrhythmusstörungen ist somit bei betroffenen Patienten zu berücksichtigen.

5. Literaturverzeichnis

Abbott, GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. (1999). MiRP1 Forms IKr Potassium Channels with HERG and Is Associated with Cardiac Arrhythmia. Cell 97, 175-187

Abbott GW, Butler MH, Bendahhou S, Dalakas MC, Ptacek LJ, Goldstein SA. (2001). MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. Cell. Jan 26;104 (2):217-31.

Abbott GW, Goldstein SA, Sesti F. (2001). Do all voltage-gated potassium channels use MiRPs? Circ Res. May 25;88(10):981-3

Arcangeli A, Rosati B, Crociani O, Cherubini A, Fontana L, et al. (1999) Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: potentiating effects of BDNF. J Neurobiol 40: 214–225.

Angelo K, Jespersen T, Grunnet M, Nielsen MS, Klaerke DA, Olesen SP (2002) KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. Biophys J 83(4):1997-2006.

Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996). KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the IKs cardiac potassium current. Nature 384:78-80

Barry, D. M., Xu, H., Schuessler, R. B., and Nerbonne, J. M. (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac reModelling in mice expressin a dominant-negative Kv4 alpha subunit. Circ. Res. 83, 560–567

Bechade D, Desrame J, Algayres JP (2007). Gastritis cystica profunda in a patient with no history of gastric surgery. Endoscopy. Feb;39 Suppl 1:E80-1.

Beauchamp RD, Barnard JA, McCutchen CM, Cherner JA, Coffey RJ Jr (1989). Localization of transforming growth factor alpha and its receptor in gastric mucosal cells. Implications for a regulatory role in acid secretion and mucosal renewal. J Clin Invest 84: 1017–1023.

Bianchi, L., Kwok, S. M., Driscoll, M., and Sesti, F. (2003). A potassium channel-MiRP complex controls neurosensory function in Caenorhabditis elegans. J. Biol. Chem. 278, 12415–12424

Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, Taglialatela M, Morra F, et al. (1998). herg encodes a K+ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? Cancer Res 58: 815–822.

Boivin GP, Molina JR, Ormsby I, Stemmermann G, Doetschman T (1996). Gastric lesions in transforming growth factor beta-1 heterozygous mice. Lab Invest 74: 513–518.

Burke A, Creighton W, Mont E, Li L, Hogan S, Kutys R, Fowler D, Virmani R. (2005). Role of SCN5A Y1102 polymorphism in sudden cardiac death in blacks. Circulation. Aug 9;112(6):798-802.

Chen SZ, Jiang M, Zhen YS (2005). HERG K+ channel expression-related chemosensitivity in cancer cells and its modulation by erythromycin. Cancer Chemother Pharmacol 56: 212–220.

Chen, Y.H., Xu, S.J., Bendahhou, S., Wang, X.L., Wang, Y., Xu, W.Y., Jin, H.W., Sun, H., Su, X.Y., Zhuang, Q.N., Yang, Y.Q., Li, Y.B., Liu, Y., Xu, H.J., Li, X.F., Ma, N., Mou, C.P., Chen, Z., Barhanin, J., Huang, W. (2003). KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. Science. Jan 10; 299(5604):251-4

Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, et al. (2000). HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. Br J Cancer 83: 1722–1729.

Clancy, S. M., Chen, B., Bertaso, F., Mamet, J., and Jegla, T. (2009). KCNE1 and KCNE3 beta-subunits regulate membrane surface expression of Kv12.2 K+ channels in vitro and form a tripartite complex in vivo. PLoS One 4, e6330

Conti M (2004). Targeting K+ channels for cancer therapy. J Exp Ther Oncol 4: 161–166.

Dai, G., Levy, O. & Carrasco, N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature 379, 458–460

Dedek, K., and Waldegger, S. (2001) Pflugers Arch. 442, 896–902

Lambrecht, N. W., Yakubov, I., Scott, D., and Sachs, G. (2005) Physiol. Genomics 21, 81–91

Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. (2008). Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. Circ Arrhythm Electrophysiol. Aug;1(3):209-18.

Deutsch, C. (2002). Potassium channel ontogeny. Annu Rev Physiol 64, 19-46

Diaz-Meyer N, Day CD, Khatod K, Maher ER, Cooper W, et al. (2003). Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. J Med Genet 40: 797–801.

Duffield, A., Folsch, H., Mellman, I., and Caplan, M. J. (2004). Sorting of H,K-ATPase beta-subunit in MDCK and LLC-PK cells is independent of mu 1B adaptin expression. Traffic 5, 449–461

Fitzpatrick GV, Soloway PD, Higgins MJ (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. Nat Genet. Nov; 32(3):426-31.

Franic, T. V., Judd, L. M., Robinson, D., Barrett, S. P., Scarff, K. L., Gleeson, P. A., Samuelson, L. C., and Van Driel, I. R. (2001) Regulation of gastric epithelial cell development revealed in H(+)/K(+)-ATPase beta-subunit- and gastrin-deficient mice. Am. J. Physiol. 281, G1502–G1511

Fröhlich H, Boini KM, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Ureche ON, Föller M, Eichenmüller M, Shumilina E, Pathare G, Singh AK, Seidler U, Pfeifer KE, Lang F. (2011). Hypothyroidism of gene-targeted mice lacking Kcnq1. Pflugers Arch. Jan;461(1):45-52

Fujita, A., Horio, Y., Higashi, K., Mouri, T., Hata, F., Takeguchi, N., and Kurachi, Y. (2002) J. Physiol. 540, 85–92

Gao P, Zhou GY, Liu Y, Li JS, Zhen JH, et al. (2004) Alteration of cyclin D1 in gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. World J Gastroenterol 10: 2936–2939.

Gavin, L.A. (1991). Thyroid crises. Med. Clin. North Am. 75, 179–193

Geibel JP. (2005). The Role of Potassium in Acid Secretion. World J Gastroenterol. Sep 14;11(34):5259-65

Ge J, Sun A, Paajanen V, Wang S, Su C, Yang Z, Li Y, Wang S, Jia J, Wang K, Zou Y, Gao L, Wang K, Fan Z. (2008). Molecular and clinical characterization of a novel SCN5A mutation associated with atrioventricular block and dilated cardiomyopathy. Circ Arrhythm Electrophysiol. Jun 1;1(2):83-92.

Giraud AS (2007) Metaplasia as a premalignant pathology in the stomach. Gastroenterology 132: 2053–2056.

Grahammer, F., Warth, R., Barhanin, J., Bleich, M. & Hug, M.J. (2001). The small conductance K+ channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea. J Biol Chem 276, 42268-75

Graves RJ (1835). Newly observed affections of the thyroid gland in females. London Med Surg J 7:516–517

Grüters, A., Krude, H. & Biebermann, H. (2004). Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. Eur. J. Endocrinol. 151 Suppl 3, U39–U44

Hak, A.E. et al. (2000). Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam study. Ann. Intern. Med. 132, 270–278

Heron, S.E. et al. (2009). Neonatal seizures and Long QT Syndrome: A cardiocerebral channelopathy? Epilepsia

Heitzmann, D. et al. (2004). Heteromeric KCNE2/KCNQ1 potassium channels in the luminal membrane of gastric parietal cells. J Physiol 561, 547-57

Itoi T, Shinohara Y, Takeda K, Nakamura K, Takei K, et al. (2000). Nuclear cyclin D1 overexpression is a critical event associated with cell proliferation and invasive growth in gallbladder carcinogenesis. J Gastroenterol 35: 142–149.

Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Grunnet, M., Jensen, H. S., Angelo, K., Dupuis, D. S., Vogel, L. K., Jorgensen, N. K., Klaerke, D. A., and Olesen, S. P. (2004). Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. J. Cell Sci. 117, 4517–4526

Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, et al. (1992). Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. Cancer Res 52: 2980–2983.

Kasatkina, E.P. et al. (2006). Gestational hypothyroxinemia and cognitive function in offspring. Neurosci. Behav. Physiol. 36, 619–624

Kathiresan, S. et al. (2009). Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. Nat. Genet. 41, 334–341

Kaufhold, M.-A., Krabbenhoft, A., Song, P., Engelhardt, R., Riederer, B., Fahrmann, M., Klocker, N., Biel, W., Manns, M., Hagen, S. J., and Seidler, U. (2008). Localization, trafficking, and significance for acid secretion of parietal cell Kir4.1 and KCNQ1 K+ channels. Gastroenterology 134, 1058–1069

Kobayashi, S., Reien, Y., Ogura, T., Saito, T., Masuda, Y., and Nakaya, H. (2001) Inhibitory effect of bepridil on hKv1.5 channel current: comparison with amiodarone and E-4031. Eur. J. Pharmacol. 430, 149–157

Kupershmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. (1999). Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. Circ Res 84:146–152

Kurland J, DuBois S, Behling C, Savides T (2006). Severe upper-GI bleed caused by gastritis cystica profunda. Gastrointest Endosc 63: 716–717.

Lai LP, Su MJ, Yeh HM, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ, Hsu KL, Tseng CD, Lien WP, Tseng YZ, Huang SK. (2002). Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. Am Heart J. Sep; 144(3):485-90.

Lee, M.P. et al. (2000). Targeted disruption of the Kvlqt1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. J Clin Invest 106, 1447-55

Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N. (1997) Characterization of the thyroid Na+/I- symporter with an anti-COOH terminus antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. May 27; 94(11):5568-73.

Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL, Jr. (2005). Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I(Ks). J Mol Cell Cardiol 38(2):277-287

Malinowska, D. H., Sherry, A. M., Tewari, K. P., and Cuppoletti, J. (2004) Am. J. Physiol. 286, C495–C506

Matsuda, T., Masumiya, H., Tanaka, N., Yamashita, T., Tsuruzoe, N., Tanaka, Y., Tanaka, H., and Shigenoba, K. (2001) Inhibition by a novel anti-arrhythmic agent, NIP-142, of cloned human cardiac K_ channel Kv1.5 current. Life Sci. 68, 2017– 2024

Matter, K., Hunziker, W., and Mellman, I. (1992) Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. Cell 71, 741–753

McCrossan, Z.A., and G.W. Abbott. (2004). The MinK-Related Peptides. Neuropharmacology. 47:787-821.

Mitomi H, Iwabuchi K, Amemiya A, Kaneda G, Adachi K, et al. (1998). Immunohisto-chemical analysis of a case of gastritis cystica profunda associated with carcinoma development. Scand J Gastroenterol 33: 1226–1229.

Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D. (2001). Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? Circ Res. Nov 23;89(11):944-56.

Nerbonne JM. (2004) Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? Trends Cardiovasc Med. Apr; 14(3):83-93

Nozaki K, Ogawa M, Williams JA, Lafleur BJ, Ng V, et al. (2008). A molecular signature of gastric metaplasia arising in response to acute parietal cell loss. Gastroenterology 134: 511–522.

Oddie, T.H., Meade, J.H. Jr., Myhill, J. & Fisher, D.A. (1966). Dependence of renal clearance of radioiodide on sex, age and thyroidal status. J. Clin. Endocrinol. Metab. 26, 1293–1296

Odorizzi, G., Pearse, A., Domingo, D., Trowbridge, I. S., and Hopkins, C. R. (1996) Apical and basolateral endosomes of MDCK cells are interconnected and contain a polarized sorting mechanism. J. Cell Biol. 135, 139–152

Ogawa M, Nomura S, Varro A, Wang TC, Goldenring JR (2006) Altered metaplastic response of waved-2 EGF receptor mutant mice to acute oxyntic atrophy. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G793–804.

Ohno S, Toyoda F, Zankov DP, Yoshida H, Makiyama T, Tsuji K, Honda T, Obayashi K, Ueyama H, Shimizu W, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Kita T, Horie M. (2009). Novel KCNE3 mutation reduces repolarizing potassium current and associated with long QT syndrome. Hum Mutat. Apr; 30(4):557-63.

Okada, Y., and Ueda, S. (1984). Electrical membrane responses to secretagogues in parietal cells of the rat gastric mucosa in culture. J. Physiol. 354, 109–119

Olson, T.M. et al. (2005). Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. J. Am. Med. Assoc. 293, 447–454 14;11(34):5259-65.

Opazo, M.C. et al. (2008). Maternal hypothyroxinemia impairs spatial learning and synaptic nature and function in the offspring. Endocrinology 149, 5097–5106

Palagiano, A. (2006). Immunological abortion: the thyroid factor. Minerva Ginecol. 58, 471–477

Pannaccione A, Boscia F, Scorziello A, Adornetto A, Castaldo P, Sirabella R, Taglialatela M, Di Renzo GF, Annunziato L. (2007). Up-regulation and increased activity of KV3.4 channels and their accessory subunit MinK-related peptide 2 induced by amyloid peptide are involved in apoptotic neuronal death. Mol Pharmacol. ep;72(3):665-73

Park KH, Chung YH, Shin C, Kim MJ, Lee BK, et al. (2001). Immunohistochemical study on the distribution of the voltage-gated potassium channels in the gerbil hippocampus. Neurosci Lett 298: 29–32

Park, K. H., Kwok, S. M., Sharon, C., Berga, R., and Sesti, F. (2003). N-glycosylation-dependent block is a novel mechanism for drug-induced cardiac arrhythmia. FASEB J. 17, 2308–2309

Park, K. H., and Sesti, F. (2007) An arrhythmia susceptibility gene in Caenorhabditis elegans. J. Biol. Chem. 282, 19799–19807

Parry CH (1825) Enlargement of the thyroid gland in connection with enlargement or palpitation of the heart. Collections from the unpublished papers of the late Caleb Hillier Parry; 111–125

Piccini, M., F. Vitelli, M. Seri, L. J. Galietta, O. Moran, A. Bulfone, S. Banfi, B. Pober, and A. Renieri. (1999). KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs. Genomics. 60:251–257.

Pongs O, Schwarz JR. (2010). Ancillary subunits associated with voltage-dependent K+ channels. Physiol Rev. Apr; 90 (2):755-96.

Porcello, D. M., Ho, C. S., Joho, R. H., and Huguenard, J. R. (2002). Resilient RTN fast spiking in Kv3.1 null mice suggests redundancy in the action potential repolarization mechanism. J. Neurophysiol. 87, 1303–1310

Preston, P., Wartosch, L., Gunzel, D., Fromm, M., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., Barhanin, J., Warth, R., and Jentsch, T. J. (2010) Disruption of the K+ channel beta-subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cltransport.J. Biol. Chem. 285, 7165–7175

Ravn LS, Aizawa Y, Pollevick GD, Hofman-Bang J, Cordeiro JM, Dixen U, Jensen G, Wu Y, Burashnikov E, Haunso S, Guerchicoff A, Hu D, Svendsen JH, Christiansen M, Antzelevitch C. (2008). Gain of function in IKs secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation. Heart Rhythm. Mar; 5 (3):427-35.

Ray, J. E., Marriott, D., Bloch, M. T., and McLachlan, A. J. (2005). Br. J. Clin. Pharmacol. 60, 291–29 Roepke, T. K. & Abbott, G. W. Pharmacogenetics and cardiac ion channels. Vascul Pharmacol 44, 90-106

Roepke, T. K. Anantharam, A.; Kirchhoff, P.; Busque, S.; Young, J.B.; Geibel, J.P.; Lerner, J.P.; Abbott, G.W. (2006). The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. J Biol Chem Aug 18;281(33):23740-7.

Roepke, T.K. King, E.C.; Reyna-Neyra, A.; Paroder, M.; Purtell, K.; Koba, W.; Fine, E.; Lerner, D.J.; Carrasco, N. and Abbott, G.W. (2009). Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. Nat Med 15, 1186-94

Roepke, T.K. Kontogeorgis, A.; Ovanez, C.; Xu, X.; Young, J.B.; Purtell, K.; Goldstein, P.A.; Christini, D.J.; Peters, N.S.; Akar, F.G.; Gutstein, D.E.; Lerner, D.J.; Abbott, G.W (2008). Targeted deletion of kcne2 impairs ventricular repolarization via disruption of I(K,slow1) and I(to,f). Faseb J 22, 3648-60

Roepke TK, King EC, Purtell K, Kanda VA, Lerner DJ, Abbott GW. Genetic dissection reveals unexpected influence of beta subunits on KCNQ1 K+ channel polarized trafficking in vivo. FASEB J. 2011 Feb; 25(2):727-36.

Roepke TK, Purtell K, King EC, La Perle KM, Lerner DJ, Abbott GW. (2010) Targeted deletion of Kcne2 causes gastritis cystica profunda and gastric neoplasia. PLoS One. Jul 6;5(7):e11451.

Roepke TK, Abbott GW. (2006). Pharmacogenetics and cardiac ion channels. Vascul Pharmacol. Feb;44(2):90-106.

Rudy, B. et al. (1999). Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. Ann N Y Acad Sci 868, 304-43

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac IKs potassium channel. Nature 384:80-83.

Schmidt PH, Lee JR, Joshi V, Playford RJ, Poulsom R, et al. (1999) Identification of a metaplastic cell lineage associated with human gastric adenocarcinoma. Lab Invest 79: 639–646.

Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. Nature Genet 17:267-268.

Schulze-Bahr E, Wedekind H, Haverkamp W, Borggrefe M, Assmann G, Breithardt G, Funke H (1999) The LQT syndromes--current status of molecular mechanisms. Z Kardiol 88(4):245-254.

Schroeder, B.C. et al. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. Nature 403, 196-9

Sesti, F. et al. (2000). A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 10613-8

Shao XD, Wu KC, Hao ZM, Hong L, Zhang J, et al. (2005) The Potent Inhibitory Effects of Cisapride, a Specific Blocker for Human Ether-a-Go-Go-Related Gene (HERG) Channel, on Gastric Cancer Cells. Cancer Biol Ther Mar; 4 (3):295-301.

Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S., Rhodes, K. J., Schechter, L. E., and Trimmer, J. S. (1996) Beta subunits promote K-channel surface expression through effects early in biosynthesis. Neuron 16, 843–852

Solé L, Felipe A. (2010). Does a physiological role for KCNE subunits exist in the immune system? Commun Integr Biol. Mar; 3 (2):166-8

Song, L., McGee, J.A. & Walsh, E.J. (2006). Consequences of combined maternal, fetal and persistent postnatal hypothyroidism on the development of auditory function in Tshrhyt mutant mice. Brain Res. 1101, 59–72

Stepan V, Ramamoorthy S, Nitsche H, Zavros Y, Merchant JL, et al. (2005) Regulation and function of the sonic hedgehog signal transduction pathway in isolated gastric parietal cells. J Biol Chem 280: 15700–15708.

Suzuki T, Takimoto K (2004) Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. Int J Oncol 25: 153–159.

Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. Science242:1042 -1045, 1988

Tang, Y.D. et al. Low thyroid function leads to cardiac atrophy with chamber dilatation, impaired myocardial blood flow, loss of arterioles and severe systolic dysfunction. Circulation 112, 3122–3130 (2005).

Tam GW, van de Lagemaat LN, Redon R, Strathdee KE, Croning MD, Malloy MP, Muir WJ, Pickard BS, Deary IJ, Blackwood DH, Carter NP, Grant SG. (2010). Confirmed rare copy number variants implicate novel genes in schizophrenia. Biochem Soc Trans. Apr; 38 (2):445-51

Tazebay, U.H. et al. (2000). The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. Nat. Med. 6, 871–878

Temple, J., Frias, P., Rottman, J., Yang, T., Wu, Y., Verheijck, E. E., Zhang, W., Siprachanh, C., Kanki, H., Atkinson, J. B., King, P., Anderson, M. E., Kupershmidt, S., and Roden, D. M. (2005). Atrial Fibrillation in KCNE1-null Mice. Circ Res 97, 62-69

Tester, D.J. & Ackerman, M.J. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. (2007). J. Am. Coll. Cardiol. 49, 240–246

Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M. & Barhanin, J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. Embo J 19, 6326-30 (2000).

VanTol, B.L. et al. (2007). Contribution of KCNQ1 to the regulatory volume decrease in the human mammary epithelial cell line, MCF-7. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 293, C1010–C1019

van Wassenaer, A.G. et al. (2002). The quantity of thyroid hormone in human milk is too low to influence plasma thyroid hormone levels in the very preterm infant. Clin. Endocrinol. 56, 621–627

Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, Liu J, McLaughlin KJ, Lesage F, Marcus DC, Lazdunski M, Heinemann SF, Barhanin J. (1996). Inner ear defects induced by null mutation of the isk gene. Neuron. Dec; 17(6):1251-64.

Vogel, L. K., Jorgensen, N. K., Klaerke, D. A., and Olesen, S. P. (2004) Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. J. Cell Sci. 117, 4517–4526

Von Basedow CA 1840 Exophthalmos durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle. Wschr Ges Heilk 197–220

Waldegger, S. (2003) Pflugers Arch. 446, 143–147

Wang, Z., Fermini, B., and Nattel, S. (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K_ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. Circ. Res. 73, 1061–1076

Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, et al. (2000) Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse Modell of gastric cancer. Gastroenterology 118: 36–47.

Warth R, Barhanin J. (2002). The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Mar; 282 (3):R639-48.

Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, et al. (2001). Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. Hum Mol Genet 10: 2989–3000.

Wible, B. A., Yang, Q., Kuryshev, Y. A., Accili, E. A., and Brown, A. M. (1998) Cloning and expression of a novel K-channel regulatory protein, KChAP. J. Biol. Chem. 273, 11745–1175

Wiedemann, H. (1983) Tumors and hemihypertrophy associated with the Wiedemann–Beckwith syndrome. Eur. J. Pediatr., 141, 129

Yamashita M, Hirokawa M, Nakasono M, Kiyoku H, Sano N, et al. (2002) Gastric inverted hyperplastic polyp. Report of four cases and relation to gastritis cystica profunda. Apmis 110: 717–723.

Yang, Y., Xia, M., Jin, Q., Bendahhou, S., Shi, J., Chen, Y., Liang, B., Lin, J., Liu, Y., Liu, B., Zhou, Q., Zhang, D., Wang, R., Ma, N., Su, X., Niu, K., Pei, Y., Xu, W., Chen, Z., Wan, H., Cui, J., Barhanin, J., and Chen, Y. (2004) Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. Am J Hum Genet 75, 899-905

Yang, W.P. et al. KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4017–4021 (1997).

Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. Nature 419, 35-42

Zhai Y, Wu R, Schwartz DR, Darrah D, Reed H, et al. (2002) Role of beta-catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. Am J Pathol 160: 1229–1238.

Zhang, M., Jiang, M. & Tseng, G. N. (2001). minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? Circ Res 88, 1012-9

Zheng Q, Chen XY, Shi Y, Xiao SD (2004) Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with Helicobacter pylori. J Gastroenterol Hepatol 19: 1192–1198.

Zaritsky, J. J., Redell, J. B., Tempel, B. L., and Schwarz, T. L. (2001) J. Physiol. 533, 697–710

6. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann bedanken, der mich in besonderer Art und Weise bestärkt und gefördert hat. Erst seine nachhaltige Unterstützung ermöglichte meine wissenschaftliche und klinische Entwicklung.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Friedrich C. Luft gilt mein besonderer Dank. Bereits zu Studienzeiten hat er mich durch seine wissenschaftliche Herangehensweise an klinische und basiswissenschaftliche Fragestellungen von der Notwendigkeit einer „molekularen Medizin“ überzeugt. Darüber hinaus bin ich ihm für die freundliche Aufnahme am Experimental & Clinical Research Center (ECRC) zu Dank verpflichtet.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl und Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl, die von der Doktorarbeit an über viele Jahre meine wissenschaftliche Tätigkeit unterstützt haben. Ohne ihre „Rückendeckung“ und den Entfaltungsspielraum, den sie mir, wenn immer möglich und mit der klinischen Tätigkeit vereinbar, gewährten, wäre eine wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen. Sie haben zudem schon frühzeitig meine weitere Entwicklung gefördert.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mentor und Freund Prof. Dr. Geoffrey W. Abbott, der meine wissenschaftliche Tätigkeit während meiner Zeit am Weill Medical College of Cornell University konstruktiv begleitet, mich gefördert und es verstanden hat, mich immer wieder zu motivieren.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ludwig Thierfelder und Herrn Prof. Dr. med. Rainer Dietz für die angenehme Aufnahme in der Charité am Campus Buch nach meiner Rückkehr aus den USA bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen neuen Kollegen am ECRC/MDC Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch, Herrn PD Dr. rer. nat. Dominik Müller, Herrn PD Dr. med. Ralf Dechend, Herrn PD Dr. med. Cemil Özcelik und Herrn Prof. Dr. med. Ingo Morano für die kollegiale und freundliche Aufnahme am Campus Berlin Buch, die guten Ratschläge und ihr Interesse an neuen gemeinsamen Forschungsprojekten bedanken.

Die wissenschaftlichen Arbeiten sind das Ergebnis von internationaler Zusammenarbeit. Ohne die Hilfe von vielen Kollegen wären die Ergebnisse nicht entstanden. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. Krista LaPerle, Herrn Dr. Dan J. Lerner, Frau Prof. Dr. med. Nancy Carrasco, Herrn Prof. Dr. med. John P. Geibel, Herrn Prof. Dr. Fadi Akar, Herrn Prof. Dr. med. David E. Gutstein, Herrn PD Dr. med. Philipp Kirchoff und Herrn Dr. med. Clemens Köhncke.

Ferner danke ich meinen Freunden und Kollegen Dr. med. Lars Stelter, Dr. med. Timm Denecke, Dr. med. Daniel O'Connor, Dr. med. Felix Knauf und Helmut Kraus, die mir auf unterschiedlichste Art und Weise während der Durchführung der Experimente und während des Verfassens der Schrift geholfen haben.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit danke ich der Charité, der Fritz-Thyssen-Stiftung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem ECRC und dem Max-Delbrück Center.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Frau Ingeborg Röpke und meinem Bruder Herrn Dr. jur. Axel B. Röpke und meine Schwägerin Katrin Röpke, die über viele Jahre durch verständnisvolle Unterstützung meinen wissenschaftlichen Weg ermöglichten.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

• weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,

• die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

• mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, August 2011

Dr. med. Torsten K. Röpke