

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen und zellulärer Ionentransport

Zellen jeglicher Art, vom Bakterium über Pflanzenzellen bis hin zum Neuron sind von einer Membran umgeben, die sie von ihrer Umgebung abgrenzt und ihnen Individualität verleiht. Eukaryontische Zellen besitzen zusätzlich Bereiche innerhalb der Zelle, sogenannte Kompartimente, die von Membranen umgeben sind. Biologische Membranen sind flächige Aggregate, die hauptsächlich aus Proteinen und Lipiden bestehen. Die amphiphilen Lipide bilden die eigentliche Membran, indem sie sich zu einer Doppelschicht zusammenlagern, nach deren Inneren sie ihre hydrophoben Kohlenwasserstoffketten orientieren, während die polaren Kopfgruppen dem wässrigen Medium zugewandt sind. In die Zellmembran sind Membranproteine integriert, die ebenfalls amphiphil sind. Die hydrophoben Bestandteile interagieren mit dem hydrophoben Inneren der Membran und ihre hydrophilen mit dem wässrigen Milieu innerhalb oder außerhalb der Zelle. Die unterschiedliche Ausrichtung der Proteine innerhalb der Membran verleiht dieser Asymmetrie. Biologische Membranen sind Permeabilitätsbarrieren für die Passage polarer Moleküle oder Ionen, wobei die Permeabilitäten für die verschiedensten polaren Substanzen durch die eingelagerten Proteine von der Zelle beeinflusst werden können. Im Folgenden soll nur die Passage anorganischer Ionen über die Membran betrachtet werden.

In lebenden Organismen sind die häufigsten anorganischen Kationen: Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Magnesiumionen, und die häufigsten anorganischen Anionen: Chlorid-, Hydrogencarbonat-, Phosphat- und Sulfationen. Die intra- und extrazellulären Konzentrationen der verschiedenen Ionen sind sehr unterschiedlich (Tab.1) und werden durch eine Vielzahl von primär (ATP-abhängigen) oder sekundär (Ionenaustauscher) aktiven Transportprozessen aufrechterhalten, die die Zelle aktiv steuern kann.

Die Nernst-Gleichung beschreibt das elektrochemische Potential der Ionen über die Zellmembran, wobei für die Summe der Ladungen innerhalb als auch außerhalb der Zelle das Elektroneutralitätsprinzip gilt.

Tabelle 1: Übersicht der Konzentrationen und Gleichgewichtspotentiale. Aufgeführt sind die physiologisch wichtigsten Ionensorten in einer Säugerzelle bzw. im menschlichen Blut (modifiziert nach (Ashcroft, 2000)).

Ion	Extrazellulär [mM]	Intrazellulär [mM]	Gleichgewichts- Potential (mV)
Natrium	135-145	12	+66
Kalium	3,5-5	140	-93
Calcium	2,25-2,52	10^{-4}	+135
Chlorid	115	2,5-50	ca.-90 bis -30

Der wichtigste aktive Transporter der Plasmamembran ist die Na^+/K^+ -ATPase, ein Membranprotein, das für jedes hydrolysierte ATP-Molekül drei Natriumionen aus der Zelle hinaus- und zwei Kaliumionen in die Zelle hineinpumpt. Dies führt zu einem Nettotransport von einer positiven Ladung pro ATP-Hydrolyse, weswegen die ATPase auch als elektrogen bezeichnet wird. Prinzipiell könnte die Na^+/K^+ -ATPase ein Potential aufbauen, das groß genug wäre, um den weiteren Auswärtstransport von Na^+ zu inhibieren. In manchen Zellen verbraucht die Na^+/K^+ -ATPase ca. 60% des gesamten ATPs. Der von ihr erzeugte Kationengradient treibt eine Vielzahl von anderen Transportprozessen an.

1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind eine spezielle Klasse integraler Membranproteine, die passiven Ionentransport ermöglichen, indem sie in der Zellmembran ionenspezifische Poren bilden (Hille, 1992). Sie bilden einen hydrophilen Kanal durch die Lipiddoppelschicht, der unselektiv für Kationen oder Anionen aber auch hochselektiv für eine Ionensorte sein kann. Die Selektivität für ein Ion wird durch den sogenannten Selektivitätsfilter gewährleistet. Ionenkanäle können sich in regulierbarer Weise öffnen und schließen. Dies wird durch unterschiedliche externe Stimuli hervorgerufen, die eine Konformationsänderung im Protein auslösen. Daraus ergibt sich neben der Einteilung der Ionenkanäle nach ihrer Selektivität eine weitere nach ihrem Aktivierungsmechanismus. Manche Ionenkanäle werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert (ligandengesteuerte Ionenkanäle), wie z.B. der nikotinische Acetylcholinrezeptor. Hierbei handelt es sich um einen relativ unselektiven

Kationenkanal, der durch Bindung von Acetylcholin (einem Neurotransmitter) aktiviert wird. Ein weiteres Beispiel ist der Glycinrezeptor (ein Chloridionenkanal), der durch extrazelluläre Glycinbindung zur Porenöffnung veranlaßt wird. Ionenkanäle werden aber auch von zytoplasmatischer Seite durch intrazelluläre Botenstoffe, wie cGMP, cAMP und Ca^{2+} oder durch Änderung des Zellvolumens reguliert. Eine weitere große Gruppe bilden diejenigen Ionenkanäle, deren Öffnung durch das Membranpotential bestimmt wird (spannungsgesteuerte Ionenkanäle). Hierzu gehören auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kalium- und Chloridkanäle der KCNQ- bzw. CLC-Familie.

1.3 Spannungsabhängige Kationenkanäle

Der erste spannungsabhängige Kationenkanal, der kloniert wurde, war ein Natriumkanal (Noda *et al.*, 1984). Dem folgten der erste Kalziumkanal (Tanabe *et al.*, 1987) und die ersten Kaliumkanäle des *shaker*-Genortes aus *Drosophila melanogaster* (Kamb *et al.*, 1987; Papazian *et al.*, 1987; Pongs *et al.*, 1988). Die α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Kationenkanäle gehören zu einer Genfamilie, die sich wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle des *shaker*-Typs kodieren für Proteine mit sechs Transmembrandomänen. Bei Natrium- und Kalziumkanälen wiederholt sich dieses Motiv viermal in der Primärstruktur. Auf die Struktur von spannungsabhängigen Kaliumkanälen wird im folgendem Abschnitt näher eingegangen.

Mittlerweile wurden zahlreiche Kationenkanäle kloniert, deren Monomere nur aus einer Minimalstruktur aus zwei Transmembrandomänen und der sogenannten „P-Schleife“ bestehen, wie z.B. die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle, wie „ROMK“ (Ho *et al.*, 1993), oder die „TWIK“-Kanäle (Lesage *et al.*, 1996), die strukturell eine Verdopplung dieses Motivs darstellen. Bei den „TOK“-Kanälen (Ketchum *et al.*, 1995) ist praktisch ein *shaker*-artiger Kaliumkanal am Carboxyterminus mit einem „Einwärtsgleichrichter“ fusioniert. Die Kaliumkanäle, die durch zyklische Nukleotide aktiviert werden, entsprechen strukturell im wesentlichen den *shaker*-Kanälen (Yau, 1994; Henn *et al.*, 1995), während der Amilorid-sensitive epitheliale Natriumkanal (ENaC) ein Multimer aus Untereinheiten mit zwei Transmembrandomänen ist (Canessa *et al.*, 1994).

1.3.1 Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle der Kv-Superfamilie

Wie schon erwähnt, bilden Kaliumkanäle eine große Superfamilie, die nach der Zahl der Transmembranbereiche (TM) und der Porenregion (P) in verschiedene Strukturklassen unterteilt ist. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten KCNQ-Kanäle gehören zu der Kv-Familie, den 6TM/1P-Kanälen, denen auch die Eag-, CNG-, und SK/IK-Kanäle angehören (Wei *et al.*, 1996; Jan *et al.*, 1997).

1.3.1.1 Struktur

Das topologische Modell der Kv-Kanäle entwickelte sich auf der Basis von Struktur/Funktionsuntersuchungen und Hydropathieanalysen (Abb.1.1) (Durell *et al.*, 1992; Miller, 1992).

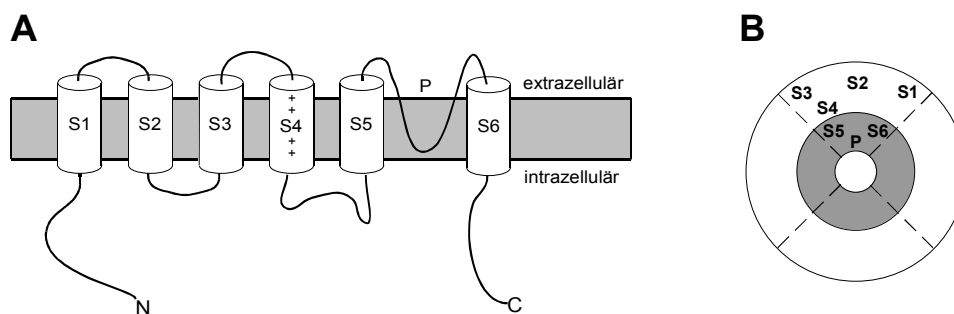


Abbildung 1.1: Topologiemodell von α -Untereinheiten der Kv-Kanäle. (A) Topologisches Modell der α -Untereinheiten von Kv-Kanal. Zu sehen sind die Transmembransegmente S1-S6, die P-Domäne und der Spannungssensor S4. (B) Schematische Darstellung der Kaliumkanalpore, die aus vier P-Domänen gebildet wird.

Dieses Modell wird in neueren Untersuchungen bestätigt, in denen der prokaryontische Kaliumkanal KcsA aus *Streptomyces lividans* (Doyle *et al.*, 1998; MacKinnon *et al.*, 1998) und verschiedene Domänen von eukaryontischen Kv-Kanälen (Kreusch *et al.*, 1998; Bixby *et al.*, 1999) kristallisiert werden konnten.

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle setzen sich aus vier homologen α -Untereinheiten zusammen, die jeweils sechs Transmembranbereiche und zytosolische N- und C-terminale Domänen enthalten (Abb.1.1.A) (Rudy, 1988; Jan *et al.*, 1994). Die funktionelle Diversität resultiert zum einen aus der Vielzahl porenbildender α -Untereinheiten und zum anderen aus der Fähigkeit verschiedener α -Untereinheiten, Heteromultimere zu bilden (Isacoff *et al.*, 1990; Ruppersberg *et*

al., 1990; Covarrubias *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1993). Die effektive Interaktion der α -Untereinheiten wird in vielen Fällen durch eine zytoplasmatische Tetramerisierungsdomäne (T1_{A,B}), die im N-terminus lokalisiert ist, vermittelt (Li *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1993). Einige Kv-Kanäle bilden trotz Deletion der T1-Domäne funktionelle Kanäle (VanDongen *et al.*, 1990), was auf weitere für die Wechselwirkung relevante Bereiche hinweist. Bei den KCNQ-Kanälen konnte bislang keine Tetramerisierungsdomäne identifiziert werden, z.B. assembliert KCNQ1 auch ohne vollständigen N-Terminus (Wollnik *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 2000).

Die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle besitzen ein zentrale Pore, die von jeweils homologen Abschnitten der symmetrisch angeordneten α -Untereinheiten begrenzt wird (*P-loops*) (Abb.1.1.B) (MacKinnon, 1991; MacKinnon *et al.*, 1993). Die Pore ist für Alkalimetallionen permeabel, wobei die Selektivität von Kalium gegenüber Natrium um den Faktor 1000 größer ist (MacKinnon *et al.*, 1997). Die Selektivität wird durch eine in Kaliumkanälen konservierte Signatursequenz (GYG) gewährleistet, die innerhalb der P-Region liegt. (Heginbotham *et al.*, 1992; Heginbotham *et al.*, 1994). Die beiden hydrophoben Transmembransegmente S5 und S6 bilden mit der Porenregion, die von der extrazellulären Seite in die Membran eintaucht, die sogenannte Kernregion (Jan *et al.*, 1994). Das vierte Transmembransegment S4 enthält innerhalb der α -Helix basische, positiv geladene Aminosäuren, die in regelmäßigen Abständen angeordnet sind ((R/K-X-X)_n). Diese hochkonservierte Struktur dient als Spannungssensor und induziert die Kanalöffnung bei Depolarisation der Membran über einen für den Kanal kritischen Wert (Papazian *et al.*, 1991; Larsson *et al.*, 1996).

Die porenbildenden α -Untereinheiten stehen mit akzessorischen β -Untereinheiten in Wechselwirkung, was zu einer weiteren Diversität der Kanäle führt und wesentlichen Einfluß auf die biophysikalischen Eigenschaften haben kann (Rettig *et al.*, 1994). Diese Interaktion vermitteln C-terminale Bereiche der zytoplasmatischen β -Untereinheiten der Kv-Kanäle mit einem Teilbereich der T1-Domäne der α -Untereinheiten (Sewing *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996). Die akzessorischen, sogenannten KCNE-Untereinheiten der KCNQ-Kanäle besitzen eine Transmembran-domäne, wobei über den Mechanismus der Interaktion noch nichts bekannt ist (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Schroeder *et al.*, 2000).

1.3.1.2 Die KCNQ-Kanalfamilie

Die KCNQ-Kanalfamilie umfaßt der Zeit fünf Mitglieder (siehe Abb.1.2). Mutationen in vier Genen dieser Kanalfamilie (KCNQ1-4) führen zu verschiedenen Erbkrankheiten (Jentsch, 2000). Dies macht diese Kaliumkanalfamilie außergewöhnlich, wenn man bedenkt, das von den ca. 70 bekannten Kaliumkanälen des Menschen bisher nur 10 mit erblichen Krankheiten assoziiert werden können.

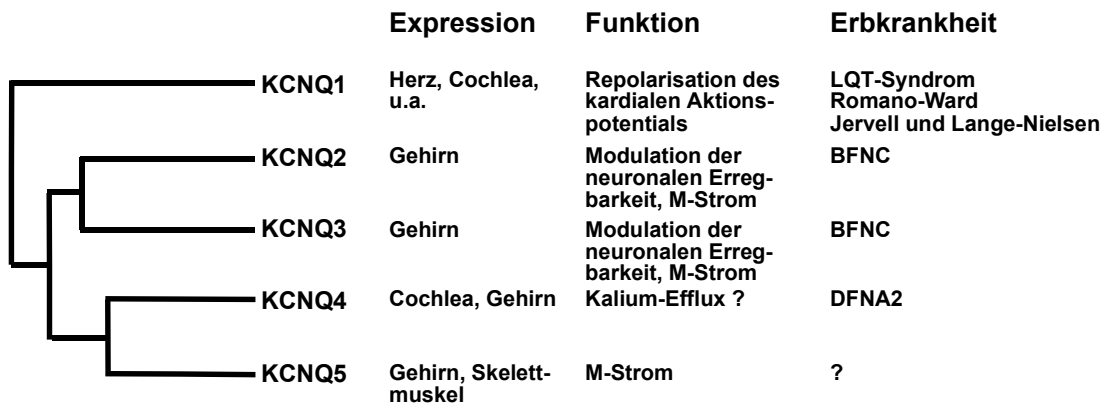


Abbildung 1.2: Die KCNQ-Familie in Säugern. Das Dendrogramm zeigt den Grad der Sequenzübereinstimmung und die assoziierten Erbkrankheiten.

Als erstes Familienmitglied wurde KCNQ1 (auch KvLQT1 genannt) durch positionelle Klonierung identifiziert (Wang *et al.*, 1996). Gendefekte führen zu dem sogenannten *long QT-Syndrom*. Bei dieser Erkrankung kommt es zu Abnormalitäten des kardialen Aktionspotentials, insbesondere in der Repolarisationsphase. Dadurch erscheint im Elektrokardiogramm (EKG) das QT-Intervall, das die Dauer zwischen dem Beginn der Erregung der Herzkammer und dem Beginn der Erregungsrückbildung beschreibt, verlängert. Diese Störung kann zum plötzlichen Bewußtseinsverlust und Tod nach ventrikulärer Arrhythmie, insbesondere vom Typ der *torsade de pointes* (Wang *et al.*, 1998) führen. Alle anderen Familienmitglieder wurden über ihre Homologie zu KCNQ1 kloniert (Biervert *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Kubisch *et al.*, 1999; Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000). Mutationen im *KCNQ4* Gen führen zu DFNA2, einer dominant vererbten Form fortschreitender Taubheit (Kubisch *et al.*, 1999). KCNQ4 wird hauptsächlich in den äußeren Haarzellen der Cochlea exprimiert, in denen der Funktionsverlust von KCNQ4 vermutlich zu einer Störung des Kaliumkreislaufs führt. Dies hätte eine Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration zur Folge,

was im Verlauf von Jahren die Zellen degenerieren lassen könnte (Kubisch *et al.*, 1999; Kharkovets *et al.*, 2000). KCNQ5 konnte kürzlich kloniert werden (Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000), wobei nicht bekannt ist, ob Mutationen in diesem Gen eine Krankheit verursachen können.

1.3.1.3 KCNQ2 und KCNQ3

KCNQ2 und KCNQ3 wurden durch Homologie zu KCNQ1 und positioneller Klonierung in Familien mit einer milden Form der Epilepsie bei neugeborenen Kindern (BFNC; *benign familial neonatal convulsions*) kloniert (Biervert *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). Beide Kanäle werden ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert und ihr Expressionsmuster im Gehirn ist stark überlappend (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Allerdings kommen sie unterschiedlich stark in den verschiedenen Regionen des Gehirns vor (Schroeder *et al.*, 1998), und manche Neuronen scheinen entweder nur den einen oder den anderen Kanal zu exprimieren (Cooper *et al.*, 2000). Sowohl KCNQ2 und KCNQ3 können homomere funktionelle Kanäle bilden, wobei der von KCNQ3 vermittelte Strom in *Xenopus* Oozyten viel kleiner ist, als der KCNQ2 Strom (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Beide Kanäle vermitteln Kaliumströme, die bei depolarisierenden Spannungen langsam aktivierten und nach Repolarisation nur langsam deaktivieren (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998). Für KCNQ2 wurden mehrere Spleißvarianten im C-Terminus gefunden, deren Funktion und physiologische Bedeutung ungeklärt ist (Biervert *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1998; Tinel *et al.*, 1998). Ein großer Anstieg des Kaliumstroms ist meßbar, wenn KCNQ2 und KCNQ3 in *Xenopus* Oozyten koexprimiert werden (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), wobei das Schaltverhalten, die Aktivierung und die Sensitivität gegenüber Inhibitoren nur leicht verändert ist (Wang *et al.*, 1998; Hadley *et al.*, 2000). Dieser Anstieg des Stroms zusammen mit dem überlappenden Expressionsmuster von KCNQ2 und KCNQ3 zeigte deutlich, daß diese Kanäle Untereinheiten in einem heteromeren Kanal sein können. Der Beweis erfolgte in Koexpressionsstudien in *Xenopus* Oozyten mit dominant-negativen KCNQ1 Mutationen, die an korrespondierender Stelle in KCNQ2 und KCNQ3 eingeführt wurden. Diese Mutationen führten zu einem Funktionsverlust des heteromeren Kanals, wenn sie mit den jeweilig anderen KCNQ2 oder KCNQ3

Wildtypuntereinheiten koexprimiert wurden (Schroeder *et al.*, 1998). Die physiologische Interaktion der Untereinheiten wurde durch Koimmunpräzipitationsexperimente aus menschlichen Gehirngewebsproben gezeigt (Cooper *et al.*, 2000). Die KCNQ2/KCNQ3 Interaktion scheint sehr spezifisch zu sein, da KCNQ1 keinen Einfluß auf die KCNQ2- oder KCNQ3-vermittelten Ströme hat. Lediglich KCNQ4 und KCNQ5 können heteromere Kanäle mit KCNQ3 bilden, wenn sie koexprimiert werden. Die Aktivierung des KCNQ3 Stroms ist aber verglichen mit der KCNQ2-vermittelten viel kleiner (Kubisch *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 2000). Sehr umstritten ist die mögliche Interaktion von heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanälen mit der β -Untereinheit KCNE1. Yang *et al.* berichteten von einem Effekt der KCNE1 Untereinheit auf die Aktivierung und die Größe der KCNQ2/KCNQ3 Ströme, wenn KCNE1 stark überexprimiert wird (Yang *et al.*, 1998). Schroeder *et al.* konnten im Gegensatz dazu keinen solchen Einfluß nachweisen (Schroeder *et al.*, 1998). Bisher konnte die Expression von KCNE1 im zentralen Nervensystem nicht nachgewiesen werden, was eine mögliche physiologische Bedeutung dieser Interaktion unwahrscheinlich macht, aber nicht ausschließt.

BFNC und KCNQ2/KCNQ3:

Nur wenige epileptische Syndrome werden durch einzelne Gendefekte verursacht. Eine dieser seltenen Krankheiten trägt die englische Bezeichnung *benign familial neonatal convulsions* (BFNC), bei der es sich um eine autosomal-dominant vererbte Form der Epilepsie handelt, die typischerweise am dritten Tag nach der Geburt beginnt, aber nach 3-10 Wochen wieder verschwunden ist (Leppert *et al.*, 1989). Ungefähr 15% der Patienten haben weitere epileptische Anfälle im fortgeschrittenem Alter.

BFNC wurde Ende der achtziger Jahre (des vorigen Jahrhunderts) auf den Chromosomen 20q13.3 (Leppert *et al.*, 1989) und 8q24 (Lewis *et al.*, 1993) lokalisiert. An diesen Stellen befinden sich die Gene für KCNQ2 und KCNQ3 (Biervert *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). Mittlerweile sind etwa zehn BFNC Mutationen in KCNQ2 und zwei in KCNQ3 identifiziert worden (Jentsch, 2000). Bei diesen handelt es sich um *Missense*-, *Nonsense*-, Insertions- und Spleiss-Stellen-Mutationen. Eine Insertions-Mutation, die den C-Terminus von KCNQ2 stark verkürzt und einige *Missense*-Mutationen sind in *Xenopus* Oozyten analysiert worden (Schroeder *et al.*, 1998). Die Mutationen führten alle zum völligen

Funktionsverlust der Kanäle. Allerdings war in Koexpressionsstudien kein dominant-negativer Effekt auf die Wildtyp Untereinheiten nachweisbar. Dies deutet darauf hin, daß Haploinsuffizienz die Ursache für die dominante Vererbung ist (Schroeder *et al.*, 1998). Die BFNC Mutationen verursachten nur eine etwa 25%ige Reduktion des Stroms verglichen mit KCNQ2/KCNQ3 Wildtyp (Schroeder *et al.*, 1998). Diese Reduktion ist demnach ausreichend, um die neuronale Erregbarkeit im Neugeborenenalter auf epilepsiegefährdetes Niveau zu erhöhen (Schroeder *et al.*, 1998). Bisher ist noch keine dominant-negative BFNC Mutation identifiziert worden. Das liegt wahrscheinlich daran, daß das Vorliegen einer derartigen Mutation so schwere Folgen hätte, daß das betroffene Individuum nicht lebensfähig wäre. Diese Hypothese wird durch Befunde der KCNQ2 defizienten Maus unterstützt. Homozygote *knockout* Mäuse sterben kurz nach der Geburt (Watanabe *et al.*, 2000).

Der M-Strom:

Mit dem Begriff „M-Strom“ bezeichnet man einen bei depolarisierenden Spannungen langsam aktivierenden Kaliumstrom, der keine Inaktivierung zeigt. Dieser Strom wurde in vielen verschiedenen Arten von Neuronen nachgewiesen (Selyanko *et al.*, 1992; Selyanko *et al.*, 1993; Selyanko *et al.*, 1996) und wird in diesen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren und „Sekundärbotenstoffen“ (*second messenger*) reguliert (Marrion, 1997), wobei über den Mechanismus nur wenig bekannt ist. Eine Inhibition des M-Stroms wurde infolge muscarinerger Stimulation beobachtet (daher der Name) (Brown *et al.*, 1980). Die Modulation des M-Stroms hat einen wichtigen Einfluß auf die neuronale Erregbarkeit, weil der Strom die Neuronenmembran unter den Schwellenwert für die Auslösung des Aktionspotentials repolarisiert. Die langsame Aktivierung und Inaktivierung des M-Stroms ist wichtig für die Verlangsamung der Aktionspotentialfrequenz, weswegen die Inhibition des M-Stroms die neuronale Erregbarkeit steigert. Es konnte gezeigt werden, daß heteromere KCNQ2/KCNQ3 Kanäle die gleichen Schalteigenschaften und das gleiche pharmakologische Profil besitzen, wie die Kanäle, die den M-Strom vermitteln (Wang *et al.*, 1998). Ferner kommen KCNQ2 und KCNQ3 in den gleichen Neuronen vor, die als Modellsystem zur Untersuchung des M-Stroms gelten (Wang *et al.*, 1998), und homomere KCNQ2, KCNQ3 und heteromere KCNQ2/KCNQ3 Kanäle werden durch Muscarin inhibiert, wenn sie mit dem M1-Rezeptor koexprimiert werden (Selyanko *et al.*, 2000; Shapiro *et al.*, 2000). Diese

Ergebnisse deuten darauf hin, daß es sich bei heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanälen um den M-Kanal handeln könnte. Allerdings sind die anderen KCNQ-Familienmitglieder auch durch Muscarin inhibierbar und KCNQ4 und KCNQ5 besitzen ein ähnliches biophysikalisches Profil, das dem des M-Kanals entspricht. Dennoch paßt die Hypothese, daß der M-Kanal heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanälen entspricht, hervorragend zu deren Rolle bei der Epilepsie.

1.4 Chloridkanäle

In den Plasmamembranen der meisten Zellen wurden Chloridkanäle gefunden, die dort wichtige physiologische Funktionen erfüllen, wie z.B. beim transepithelialen Transport, der Stabilisierung des Membranpotentials in erregbaren Zellen wie Nerven- und Muskelzellen und der Zellvolumenregulation (Jentsch *et al.*, 1997). Die Chloridkanäle lassen sich in drei Familien einteilen: ligandengesteuerte Glycin- und γ -Aminobuttersäure (GABA)_A-Rezeptoren, den nukleotidabhängigen CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) und die spannungsgesteuerten Chloridkanäle der CLC-Familie.

1.4.1 Die spannungsabhängigen Chloridkanäle der CLC-Familie

Das erste Mitglied der CLC-Familie wurde 1990 aus dem elektrischen Gewebe des Rochens *Torpedo marmorata* durch Expressionsklonierung in *Xenopus* Oozyten identifiziert (Jentsch *et al.*, 1990). Mittlerweile sind in Säugetieren neun verschiedene CLC-Gene bekannt, die in drei Gruppen (Unterfamilien) unterteilt werden (Abb.1.3) (Waldegger *et al.*, 2000), zusätzlich wurden durch verschiedene Genomprojekte und Klonierungsstrategien gezeigt, daß CLC-Gene auch in Pflanzen, Hefe, Archaeobakterien und Eubakterien vorkommen (Jentsch *et al.*, 1999).

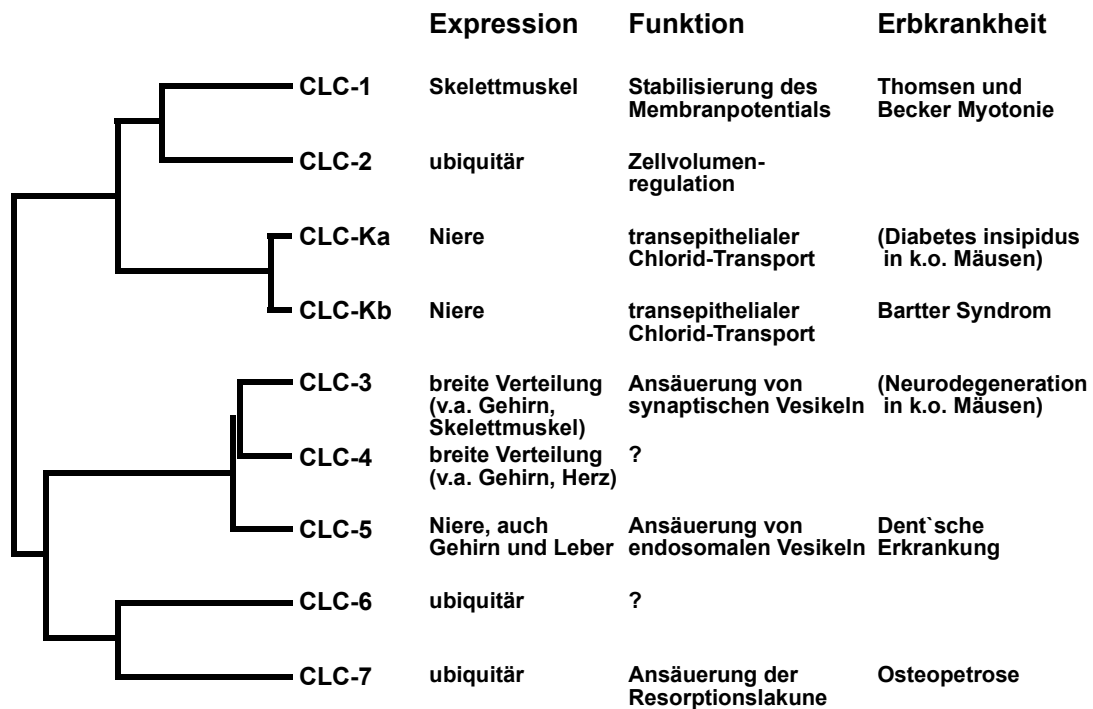


Abbildung 1.3: Dendrogramm der Mitglieder der CLC-Familie in Säugern. Drei Unterfamilien lassen sich abgrenzen, die weniger als 30% Sequenzhomologie zueinander aufweisen. Bekannte Funktionen und assoziierte Erbkrankheiten sind aufgelistet.

CIC-0 ist der elektrophysiologisch am besten charakterisierte Kanal der CLC-Familie. Er besitzt, wie fast alle anderen CIC-Kanäle, eine hohe Selektivität für Chlorid ($Cl^- > Br^- > I^-$). Die Einzelkanalleitfähigkeit wurde auf etwa 9 pS (in 150mM Cl^-) bestimmt und es konnte gezeigt werden, daß funktionelle CIC-0 Kanäle Homodimere sind, bei denen jedes Homomer eine separate Pore bildet (Ludewig *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 1996).

Dieses sogenannte „double-barrel“-Modell war schon viele Jahre zuvor anhand von elektrophysiologischen Messungen an rekonstituierten Kanälen aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* postuliert worden (White *et al.*, 1979). Anderen Untersuchungen zufolge entwickelte sich ein Modell, welches einen homodimeren Kanal mit nur einer Pore vorsieht (Fahlke *et al.*, 1997; Fahlke *et al.*, 1997). Während die spannungsabhängigen Kationenkanäle einen intrinsischen Spannungssensor, in Gestalt der S4 Helix besitzen, findet man etwas ähnliches bei den CIC-Kanälen nicht. Zumindest für CIC-0 konnte gezeigt werden, daß das permeierende Anion selbst für das potentialabhängige Schalten verantwortlich ist (Pusch *et al.*, 1995).

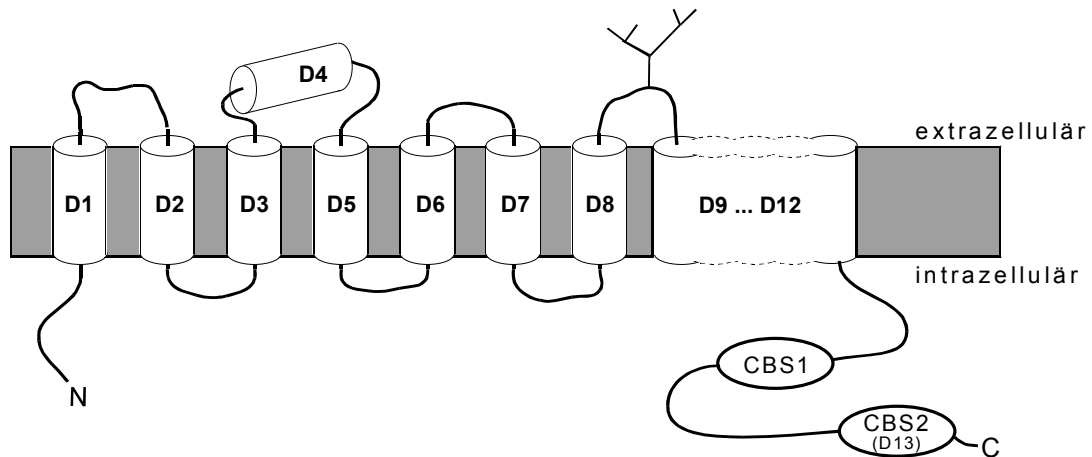


Abbildung 1.4: Topologiemodell der CLC-Kanäle (Schmidt-Rose *et al.*, 1997)

Abb.1.4 zeigt das für CLC-Kanäle am breitesten akzeptierte Topologiemodell. Der Aminoterminus und der Carboxyterminus der Kanäle liegen intrazellulär. Durch Hydropathieanalyse von CIC-0 wurden anfänglich 13 hydrophobe Bereiche (D1-D13) als mögliche Transmembrandomänen identifiziert (Jentsch *et al.*, 1990). Spätere Untersuchungen zeigten aber, daß D13 die Plasmamembran nicht durchquert (Grunder *et al.*, 1992). Auch die schwach hydrophobe und wenig konservierte D4-Domäne ist nach dem aktuellen Topologiemodell (Schmidt-Rose *et al.*, 1997) keine Transmembrandomäne. Sie ist vielmehr extrazellulär lokalisiert. Andere Untersuchungen geben jedoch Hinweise darauf, daß auch D4 die Membran durchquert (Fahlke *et al.*, 1997), was eine umgedrehte Orientierung der abwärts gelegenen Transmembrandomänen erfordern würde. Es ist noch unklar, ob die Region D9-D12 die Membran drei- oder fünfmal durchquert, so daß entweder 10 oder 12 Transmembrandomänen gebildet werden. Nach D12 schließen sich bei allen bisher gefundenen eukaryontischen CLC-Proteinen zwei CBS-Domänen an (benannt nach dem Vorkommen dieses Strukturmotivs in der Cystathionin- β -Synthase), für die eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktion diskutiert wird (Ponting, 1997). Weitere Untersuchungen zur endgültigen Klärung der Membrantopologie sind erforderlich.

1.4.1.1 Die erste Unterfamilie

Von den neun in Säugern bekannten CIC-Kanälen weisen CIC-1 und CIC-2 die größte Ähnlichkeit zu CIC-0 auf und bilden aufgrund ihrer Homologie untereinander

eine Unterfamilie zusammen mit den nierenspezifischen ClC-Ka und ClC-Kb (im Menschen, bzw. ClC-K1 und ClC-K2 in der Ratte/Maus).

ClC-1 wurde aus dem Skelettmuskel kloniert, seine Expression findet man fast ausschließlich in diesem Gewebe (Steinmeyer *et al.*, 1991). Seine Funktion ist dort die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials der Muskelzellen. Da in diesen Zellen etwa 70-85% der Gesamtleitfähigkeit durch Chloridkanäle erzeugt wird, entspricht die Membranspannung in etwa dem Gleichgewichtspotential von Cl⁻ (Bretag, 1987). ClC-1 trägt dadurch wesentlich zur Repolarisation des muskulären Aktionspotentials bei. Mutationen im *CLCN1* Gen führen zu zwei verschiedenen Formen von Myotonie (Koch *et al.*, 1992; Steinmeyer *et al.*, 1994): der dominant vererbten Myotonie vom *Thomsen*-Typ und der rezessiven vom *Becker*-Typ. Dominante Mutationen verschieben die spannungsabhängige Öffnung des Kanals zu sehr positiven, nicht physiologischen Werten, während rezessive Mutationen einen kompletten Funktionsverlust des Kanals verursachen. In beiden Fällen kommt es zu einer verminderten Chloridleitfähigkeit im physiologischen Spannungsbereich, wodurch die Myotonie im Sinne einer Repolarisationsstörung zu erklären ist (Pusch *et al.*, 1995).

ClC-2, ClC-Ka und ClC-Kb wurden aufgrund ihrer Homologie zu ClC-1 kloniert (Thiemann *et al.*, 1992; Kieferle *et al.*, 1994). ClC-2 wird ubiquitär exprimiert und besitzt aufgrund seiner Stimulierbarkeit durch hypotone Medien wahrscheinlich eine wichtige Funktion bei der zellulären Volumenregulation. Die beiden zu 90% identischen ClC-K Kanäle werden spezifisch in der Niere exprimiert. Die Sequenzhomologie der ClC-K Kanäle einer Spezies ist höher, als die der orthologen Kanäle verschiedener Spezies. Daher wurden die Kanäle aus der Ratte und der Maus ClC-K1 und ClC-K2 genannt, die aus dem Menschen ClC-Ka und ClC-Kb (Uchida *et al.*, 1993; Kieferle *et al.*, 1994), wobei vermutlich ClC-Ka ClC-K1 und ClC-Kb ClC-K2 entspricht. Bisher konnte nur ClC-K1 funktionell exprimiert werden (Uchida *et al.*, 1995; Waldegger *et al.*, 2000). Die möglichen physiologischen Funktionen konnten kürzlich für ClC-K1 und ClC-Kb gezeigt werden. ClC-K1 defiziente Mäuse besitzen einen Defekt im transepithelialen Chloridtransport im dünnen aufsteigendem Ast der Henle'schen Schleife im Nephron (Uchida *et al.*, 1995) und die Symptome eines renalen *Diabetes insipidus* (Matsumura *et al.*, 1999).

Mutationen im *CLCNKB* Gen führen zu einer bestimmten Form des *Bartter* Syndroms (III), einer autosomal rezessiv vererbten menschlichen Erkrankung, die

durch mangelhafte Salzresorption in der Niere charakterisiert ist (Simon *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Tatsache muß ClC-Kb ein typischer Plasmamembran Chloridionenkanal sein, und kein intrazellulärer. Vor diesem Hintergrund ist es erstaunlich, daß ClC-Kb bislang noch nicht funktionell heterolog exprimiert werden konnte. Andere Formen des *Bartter* Syndroms werden durch Mutationen im Na-K-2Cl-Kotransporter und im Kaliumkanal ROMK verursacht (Simon *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1996). Es kann daher auf eine direkte Beteiligung von ClC-Kb am Ionentransport in der Niere geschlossen werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß *Bartter* Mutationen, die im *CLCNKB* Gen gefunden wurden, die Aktivität eines chimären Kanals, der aus ClCKb und ClC-K1 besteht, zerstören bzw. stark reduzieren können (Waldegger *et al.*, 2000). Daraus folgt, das *Bartter* Syndrom (III) durch einen Verlust der Chloridleitfähigkeit des ClC-Kb Kanals hervorgerufen wird.

1.4.1.2 Die zweite Unterfamilie

ClC-3, ClC-4 und ClC-5 sind zu 80% homolog und bilden die zweite Unterfamilie der CLC-Proteine. Sie sind in der Zelle vorwiegend intrazellulär in verschiedenen Vesikeln lokalisiert (Jentsch *et al.*, 1997; Jentsch *et al.*, 1999; Waldegger *et al.*, 2000) Auf ClC-5 wird im weiteren Verlauf dieser Einleitung (Kapitel 1.4.1.4) ausführlich eingegangen, da er ein Hauptgegenstand dieser Arbeit ist.

ClC-3 und ClC-4 zeigen ein breites, fast ubiquitäres Verteilungsmuster, wobei ClC-3 hauptsächlich im Gehirn und Skelettmuskel und ClC-4 im Gehirn und Herz nachzuweisen ist (Kawasaki *et al.*, 1994; van Slegtenhorst *et al.*, 1994). Den Ergebnissen einiger Arbeitsgruppen zufolge kann ClC-3 heterolog exprimiert werden, allerdings wurde hierbei die für ClC-Kanäle untypische Selektivität $I > Cl$ gemessen (Kawasaki *et al.*, 1994; Kawasaki *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1997; Fahlke *et al.*, 1997). Andere Gruppen hingegen konnten in heterologen Systemen bisher keine Ströme für ClC-3 nachweisen (Borsani *et al.*, 1995; Jentsch *et al.*, 1995). Nach Duan *et al.* handelt es sich bei ClC-3 um den lange gesuchten schwellungsaktivierten Chloridkanal (Duan *et al.*, 1997). Ein tiefen Einblick in die physiologische und zelluläre Funktion von ClC-3 wurde durch die Generierung einer ClC-3 defizienten Maus gewonnen. Bei diesen Mäusen beginnt der Hippocampus und die Retina um den Tag 12 nach der Geburt zu degenerieren, was zu einem fast kompletten Verlust dieser Strukturen nach 12 Wochen führt (Stobrawa *et al.*, 2001). In dieser

Untersuchung konnte ferner gezeigt werden, daß CIC-3 ein intrazellulär vorkommender Chloridkanal ist, der auch in synaptischen Vesikeln vorkommt. Dort vermittelt CIC-3 vermutlich die Paralleleitfähigkeit für Chloridionen, um ein effizientes Ansäuern der Vesikel durch die elektrogene H^+ -ATPase zu ermöglichen. Dies ist notwendig, damit die Vesikel mit Neurotransmittern beladen werden können. In Leber- und Pankreaszellen aus den CIC-3 defizienten Mäusen konnte der schwellungsaktivierte Chloridstrom gemessen werden. Dies schließt die von Duan *et al.* postulierte Funktion von CIC-3 aus (Stobrawa *et al.*, 2001).

CIC-4 vermittelt, wie auch CIC-5, bei heterologer Expression in *Xenopus* Oozyten oder HEK293-Zellen auswärts-gleichrichtende Ströme mit einer Ionenselektivität von $NO_3^- > Cl^- > Br^- > I^-$. CIC-4 und CIC-5 vermittelte Ströme unterscheiden sich nur leicht in der Spannungsabhängigkeit und pH-Sensitivität (Friedrich *et al.*, 1999). Bemerkenswert in Bezug auf CIC-4 ist, daß durch die Verpaarung von zwei Mausarten (*Mus spretus* und *Mus musculus*) eine CIC-4 defiziente Maus gezüchtet werden kann. Dies ist möglich, da die beiden Mausstämme eine unterschiedliche chromosomale Lokalisation des CLC-4 Gens besitzen. Diese Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp, wobei der Umfang der Analyse nicht deutlich beschrieben wurde (Palmer *et al.*, 1995; Rugarli *et al.*, 1995).

1.4.1.3 Die dritte Unterfamilie

Die dritte Unterfamilie besteht aus den ubiquitär exprimierten Mitgliedern CIC-6 und CIC-7 (Brandt *et al.*, 1995). Beide Proteine konnten bislang nicht funktionell in *Xenopus* Oozyten oder Kulturzellen exprimiert werden, so daß ihre Funktion als Chloridkanal noch nicht bewiesen ist (Brandt *et al.*, 1995). Es gibt Hinweise darauf, daß es sich bei CIC-6 und CIC-7 um intrazelluläre Proteine handelt (Brandt *et al.*, 1995; Buyse *et al.*, 1998). Dies könnte erklären, warum bei heterologer Expression dieser Kanäle keine Ströme messbar sind. Wie für CIC-3 ergab die Analyse einer CIC-7 defizienten Maus Aufschluß über die zelluläre und physiologische Funktionen dieses Mitglieds der CLC-Familie. Die CIC-7 defizienten Mäuse besitzen neben einer Retinadegeneration eine starke Osteopetrose, die durch eine Fehlfunktion von Osteoklasten verursacht wird (Kornak *et al.*, 2001). Diese spezialisierten Zellen vermitteln die Knochenresorption durch die Sekretion von HCl in den geschlossenen extrazellulären Raum zwischen Knochenmaterial und Zelle (Resorptionslakune). Die

HCl Sekretion erfolgt über eine spezialisierte Membran (*Ruffled Border*) des Osteoklasten, die durch die Fusion saurer Vesikel mit der Plasmamembran generiert wird. In *CLC-7* defizienten Mäusen findet keine Resorption statt, da die Osteoklasten diesen extrazellulären Raum nicht mehr effizient ansäuern können (Kornak *et al.*, 2001). Ferner wurden Mutationen im *CLC-7* Gen eines Patienten gefunden, der an einer bestimmten Form einer infantilen malignen Osteopetrose erkrankt war (Kornak *et al.*, 2001).

1.4.1.4 *CLC-5*

Das *CLCN5* Gen konnte von Fisher *et al.* durch einen positionellen Klonierungsansatz aus der Region Xp11.22 des X-Chromosoms isoliert werden, die in *linkage* Studien über die Dent'sche identifiziert worden war (Fisher *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995; Lloyd *et al.*, 1996). Das Genprodukt wies eine signifikante Homologie zur Familie der spannungsabhängigen Chloridkanäle auf, besonders zu den kurz vorher beschriebenen Mitgliedern *CLC-3* und *CLC-4*, und wurde daher als *CLC-5* bezeichnet. Parallel dazu war das Rattenhomolog *rCLC-5* (*r=rat*) von *hCLC-5* (*h=human*), aufgrund der Homologie zu *CLC-3* und *CLC-4* kloniert worden (Steinmeyer *et al.*, 1995). Beide *CLC-5* Homologe werden überwiegend in der Niere der jeweiligen Spezies exprimiert (Steinmeyer *et al.*, 1995; Lloyd *et al.*, 1996). Eine nähere Untersuchung der Verteilung von *rCLC-5* mittels RT-PCR fand an isolierten Tubuli statt. Dabei konnte die *CLC-5* mRNA im gesamten Nephron detektiert werden, mit der schwächsten Expression im Glomerulus und dem S2-Segment des proximalen Tubulus (Steinmeyer *et al.*, 1995). Die heterologe Expression des Kanals ergab stark auswärts gleichrichtende Ströme, die erst bei starker Depolarisation ($>+20\text{mV}$) auftraten und die ebenfalls die typische Ionenselektivität der *CLC*-Familie aufwiesen (Steinmeyer *et al.*, 1995).

Das humane *CLC-5* Protein besteht aus 746 Aminosäuren und besitzt wie die anderen *CLC*-Kanäle vermutlich 10-12 Transmembrandomänen, wobei der extrazelluläre Bereich zwischen der Transmembrandomäne D1 und D2 besonders groß ist (wie auch bei *CLC-3* und *CLC-4*), verglichen mit den anderen Mitgliedern der *CLC*-Familie. Mutationen im *CLCN5* Gen wurden bei drei Krankheiten gefunden, die Hyperkalziurie und Nierenversagen hervorrufen und heute eher zu einer Krankheit zusammengefaßt werden. Bei diesen Krankheiten handelt es sich um die Dent'sche

Erkrankung (*Dent's disease*), X-chromosomal vererbte Nierensteine (*X-linked recessive nephrolithiasis*) und die X-chromosomal vererbte hypophosphatämische Rachitis (*X-linked recessive hypophosphatemic rickets*) (Scheinman *et al.*, 1999). Diese Syndrome haben ein klinisches Symptom gemeinsam: das drastisch erhöhte Ausscheiden von Proteinen geringen Molekulargewichtes mit dem Urin (LMWP; *low molecular weight proteinuria*). So wurden später Mutationen im *CLCN5* Gen in japanischen Familien gefunden, die nur dieses eine klinische Symptom aufwiesen (Scheinman *et al.*, 1999).

Bei den Mutationen handelt es sich um *Missense*-, *Nonsense*-, Insertions-, Deletions- und Spleiss-Stellen-Mutationen, die entweder zu einer Verkürzung des Proteins oder zu einem Aminosäureaustausch führen, die die Kanalfunktion zerstören oder stark reduzieren. Dies konnte in Messungen an *Xenopus* Oozyten gezeigt werden. Es war lange Zeit unklar, ob ClC-5 tatsächlich die Ströme vermittelt, die in *Xenopus* Oozyten gemessen wurden, oder ob ClC-5 lediglich eine Chloridleitfähigkeit reguliert. Erst als durch Mutationsanalyse Aminosäuren gefunden wurden, die die Rektifizierung, Aktivierung und Ionenselektivität von ClC-5 veränderten (Friedrich *et al.*, 1999), war es eindeutig, daß es sich bei ClC-5 um einen Chloridkanal im eigentlichen Sinne handelt.

Das klinische Symptom LMWP deutete auf einen Defekt in den proximalen Tubuli der Niere hin, da hier primär-filtrierte Proteine geringeren Molekulargewichtes durch Endozytose resorbiert werden. Von Günther *et al.* konnte mit ClC-5 spezifischen Antikörpern gezeigt werden, daß der Kanal in endozytotischen Vesikeln des proximalen Tubulus vorkommt (Günther *et al.*, 1998). Die ClC-5 positiven Vesikel waren unterhalb der Bürstensaummembran konzentriert, wo auch die H⁺-ATPase des V-Typs nachgewiesen werden konnte. Ferner konnte gezeigt werden, daß ClC-5 in endozytotischen Vesikeln der Schaltzellen des α -Typs im Sammelrohr exprimiert wird und auch dort mit der H⁺-ATPase kolokalisiert. Zudem gab es deutliche experimentelle Hinweise, daß ClC-5 an der Endozytose beteiligt ist. Hierzu wurde Ratten fluoreszenzmarkiertes β 2-Mikroglobulin in die Bauchvene injiziert, die Nieren der Tiere nach einigen Minuten fixiert und die Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes im Vergleich zu ClC-5 an Dünnschnitten untersucht. Dieses Protein kolokalisierte nach kurzer Zeit mit ClC-5 und der H⁺-ATPase (Günther *et al.*, 1998; Devuyst *et al.*, 1999). Ferner konnte in transient-transfizierten COS7-Zellen gezeigt werden, daß ClC-5 mit einer rab5 Q79L Mutante kolokalisiert, die als

Markerprotein für frühe Endosomen gilt (Günther *et al.*, 1998). Aus diesen Ergebnissen wurde ein Modell entwickelt, das zumindest die Ausscheidung der Proteine niedrigen Molekulargewichtes erklären kann (Abb.1.5): CIC-5 ist demnach für die effiziente Ansäuerung der endozytotischen Vesikel notwendig, weil der Kanal die positive Ladung, die durch die H^+ -ATPase transportiert wird, durch das Leiten von Chlorid ausgleicht. Bei Dysfunktionalität von CIC-5 infolge einer Mutation würde der ladungsneutralisierende Cl^- -Strom ins Lumen der Vesikel fehlen, wodurch sich die Vesikelmembranen so stark positiv aufladen würden, daß keine weitere H^+ -Translokation möglich wäre.

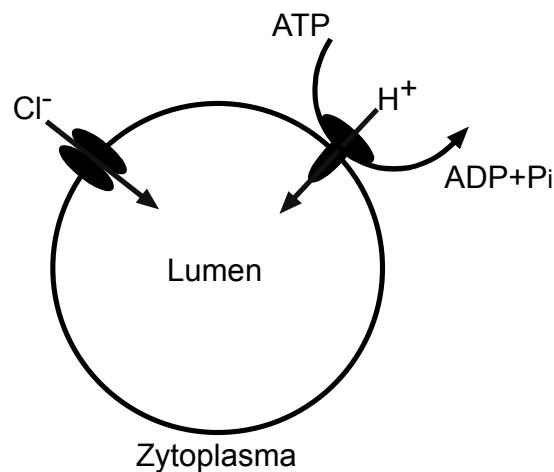


Abbildung 1.5: Modell zur effizienten Ansäuerung von endozytotischen Vesikeln. Eine H^+ -ATPase des V-Typs pumpt aktiv Protonen ins Vesikellumen. Der Ladungsausgleich wird durch einen passiven Cl^- -Transport bewirkt, welcher von einem Chloridionenkanal getragen wird. Ohne diesen Ladungsausgleich ist kein effizienter Protonentransport möglich, da sich die Vesikelmembran gemäß der Nernst-Gleichung für Protonen aufladen würde.

Diese Hypothese wird durch die Analyse einer CIC-5 defizienten Maus unterstützt (Piwon *et al.*, 2000). Diese Mäuse weisen eine stark verminderte Endozytose in der apikalen Region des proximalen Tubulus auf. Sowohl die rezeptorvermittelte Endozytose, als auch die Endozytose der Flüssigphase und die Internalisierung von Plasmamembran-Transportern sind betroffen. Erste Experimente an aufgereinigten Endosomen aus der Niere zeigen deutlich, daß die Ansäuerung der Vesikeln aus der CIC-5 defizienten Maus langsamer erfolgt als bei Wildtyp Mäusen (Piwon *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen die Hypothese, daß CIC-5 die Chloridleitfähigkeit in den endozytotischen Vesikeln des proximalen Tubulus der Niere vermittelt, die für eine effiziente Ansäuerung notwendig ist. CIC-5 ist damit

der erste Chloridionenkanal, für den diese Rolle in dem endozytotischem Weg der Zelle gezeigt werden konnte.

1.5 Endozytose

Von de Duve führte 1963 den Begriff der Endozytose ein (De Duve, 1963). Unter diesem Begriff werden Mechanismen zusammengefaßt, die Säugetier-Zellen entwickelt haben, um kleine Moleküle, Makromoleküle und Partikel aufzunehmen und zu bestimmten Organellen im Zytoplasma zu transportieren. Die Zelle bedient sich dabei verschiedener Methoden, wie der Phagozytose, Pinozytose, *Clathrin*-abhängige rezeptorvermittelte Endozytose und *Clathrin*-unabhängige Endozytose. Die Zelle nimmt hauptsächlich über die rezeptorvermittelte Endozytose Nährstoffe, Hormone, Wachstumsfaktoren, Lipoproteine, Enzyme, aber auch Toxine und Viruspartikel auf, wodurch die umfassende biologische Bedeutung dieses Prozesses deutlich wird. Die Mechanismen dieser Form der Endozytose sind gut charakterisiert und sollen kurz zusammengefaßt werden, wobei die Motive, die Proteine zur Endozytose benötigen, besondere Beachtung in einem eigenem Abschnitt finden.

1.5.1 Mechanismen der rezeptorvermittelten Endozytose

Die Zelloberfläche ist übersät von sogenannten *coated-pits* (besetzen etwa 2% einer typischen Säugetier-Zelle). Das sind Einbuchtungen der Plasmamembran, die auf der Zytosolseite mit dem Protein *Clathrin* bedeckt sind. *Clathrin* besitzt die Fähigkeit, durch Polymerisierung ein dichtes regelmäßiges Gitterwerk um Membranvesikel zu bilden und ist ein wesentliches Merkmal der rezeptorvermittelten Endozytose.

Viele Zelloberflächenrezeptoren sind Transmembranglykoproteine mit einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer verhältnismäßig kleinen intrazellulären Domäne (z.B. LDL-Rezeptor, Megalin, der Asialoglykoproteinrezeptor), wobei manche als Homodimer vorliegen (z.B. der Transferrinrezeptor). Einige dieser Rezeptoren treten in *coated-pits* zusammen, ohne einen Liganden gebunden zu haben; andere wiederum sammeln sich dort erst nach der Bindung ihrer entsprechenden Liganden. Danach stülpen sich die *coated-pits* unter Ausbildung des *Clathrin* Gitterwerkes ein. Es entstehen umhüllte Vesikel (*coated vesicles*), die von der Plasmamembran durch die GTPase Dynamin abgetrennt

werden (Chen *et al.*, 1991; van der Blik *et al.*, 1991; van der Blik *et al.*, 1993). Da die Anwesenheit einer *Clathrin*-Hülle die Vesikel daran hindert die importierten Rezeptoren und Proteine ihrer Bestimmung zuzuführen, wird *Clathrin* durch ein ATP-abhängiges *uncoating* Enzym entfernt und es entstehen durch das Verschmelzen einiger Vesikel die Sortierungsendosomen bzw. die frühen Endosomen (Mellman, 1996). Ein wichtiges Charakteristikum dieser Endosomen ist ihr pH-Wert, der im sauren Bereich liegt und zur Dissoziation vieler Rezeptor-Liganden-Komplexe führt. Dies ermöglicht es den Liganden und Rezeptoren verschiedene Wege innerhalb des endozytotischen Systems der eukaryontischen Zelle zu gehen. Die grundlegenden Prinzipien des Endozytoseprozesses sind in Abb.1.6 zusammengefaßt.

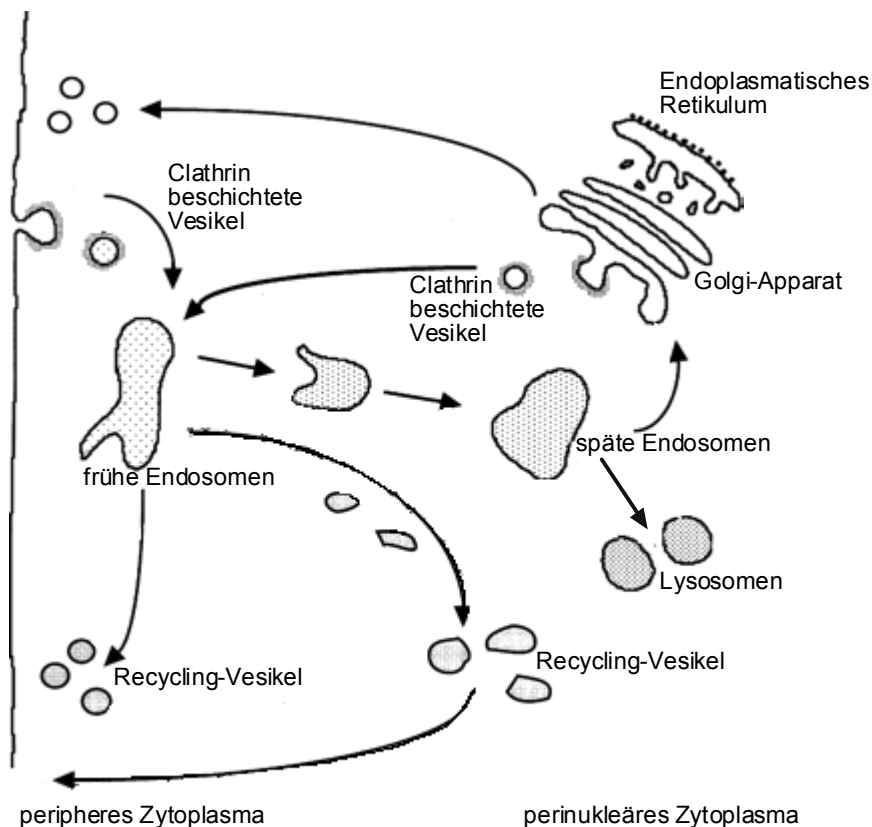


Abbildung 1.6: Endozytoseprozesse in einer eukaryontischen Zelle (modifiziert nach Mellman, 1996).

Die lysosomalen Enzyme gelangen ebenfalls rezeptorvermittelt in die späten Endosomen und die Lysosomen. Die neusynthetisierten Enzyme werden über *Clathrin*-beschichtete Vesikel (bei diesem Prozeß spielt auch wieder Dynamamin eine

wichtige Rolle (Jones *et al.*, 1998)) vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Endosomen transportiert. Hierbei sind sie pH-sensitiv an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gebunden, von denen sie erst in den späten Endosomen aufgrund des dort herrschenden niedrigeren pH-Wertes, dissoziieren können.

Die Beeinflussung des pH-Wertes in den bei der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligten Kompartimenten, zeigt deutlich dessen Bedeutung für diesen Prozeß. So führen permeationsfähige Basen wie NH_3 oder Chloroquin zu einer Hemmung der rezeptorvermittelten Endozytose und der gesamte Endozytoseprozeß ist stark verringert (Clague *et al.*, 1994; Gekle *et al.*, 1995; van Weert *et al.*, 1995). Ein Molekül, das von der Zelle durch Endozytose aufgenommen wurde und zu den Lysosomen transportiert wird, durchläuft einen Weg, der durch einen immer niedriger werdenden pH-Wert gekennzeichnet ist. In den Sortierungsendosomen liegt der pH-Wert bei ca. 5,9-6,0. Auf dem Weg zu den Lysosomen erfolgt eine weitere Ansäuerung, wodurch der pH-Wert in den späten Endosomen 5,0-6,0 und in den Lysosomen 5,0-5,5 beträgt (Clague *et al.*, 1994; Mukherjee *et al.*, 1997). Dieser niedrige pH-Wert ist notwendig für die optimale Aktivität lysosomaler Enzyme.

Eine ATP-abhängige Protonenpumpe sorgt für die Ansäuerung der endozytotischen Kompartimente (Abb.1.5) (Al-Awqati, 1986; Mellman *et al.*, 1986; Forgac, 1992). Die H^+ -ATPase vom V-Typ setzt sich aus mindestens 13 Untereinheiten zusammen, welche zwei funktionelle Domänen V_0 und V_1 bilden. Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert wie die Aktivität dieser Protonenpumpe reguliert wird. So soll diese Regulation über Disulfidbrücken im aktiven Zentrum der ATPase und durch den Zusammenbau der Domänen V_0 und V_1 zur funktionellen Protonenpumpe erfolgen. In spezialisierten Zellen, wie den Schaltzellen der Niere oder den Osteoklasten, wurde beschrieben, daß H^+ -ATPasen durch Endo- und Exozytose in die Plasmamembran ein- und ausgebaut werden. Dadurch kann die Anzahl der Protonenpumpen in den Kompartimenten indirekt reguliert werden (Forgac, 1996).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Ansäuerung von intrazellulären Kompartimenten ergibt sich aus der Tatsache, daß die H^+ -ATPase elektrogen ist (vergleiche dazu auch Kapitel 1.4.1.4). Durch den Transport der Protonen wird Ladung transportiert, die nicht durch den gleichzeitigen Transport eines anderen Ions ausgeglichen wird. Somit ist die Ansäuerung von Kompartimenten durch die H^+ -ATPase mit der Ausbildung eines positiven Membranpotentials verknüpft. Ab einem bestimmten Wert würde die weitere Ansäuerung verhindert werden, wenn es nicht

durch einen Einstrom von Anionen in die Kompartimente oder einen Ausstrom von Kationen abgebaut werden würde (Abb.1.5).

Es wurde daher schon lange diskutiert, daß andere Ionentransporter und Ionenkanäle, wie z.B. ClC-5 oder andere Mitglieder dieser Familie, die Regulation der Ansäuerung beeinflussen (Günther *et al.*, 1998). Zumindest für die frühen endozytotischen Vesikel im proximalen Tubulus der Maus scheint dieses ClC-5 zu sein, wie von unserer Arbeitsgruppe durch die Analyse der ClC-5 defizienten Maus gezeigt werden konnte (vergleiche Kapitel 1.4.1.4) (Piwon *et al.*, 2000).

1.5.2 Endozytosemotive

Viele Transmembranproteine, die von der Plasmamembran über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, besitzen kurze Aminosäuresequenzen (Motive), die die Endozytose vermitteln. In Tab. 2 sind verschiedene Motive zusammengefaßt. Sie sind in vielen intrazellulären Bereichen von Rezeptoren und Membranproteinen gefunden und charakterisiert worden (Trowbridge *et al.*, 1993; Mellman, 1996).

Tabelle 2: Übersicht über Endozytosemotive. Tyrosin-basierte (Y)-Motive sind gekennzeichnet durch 4 Aminosäuren, die einen kritischen Tyrosinrest beinhalten, wobei drei Gruppen zu unterscheiden sind (X kann jede Aminosäure sein und Φ ist ein großer hydrophober Rest).

Endozytosemotiv:	Protein:
Tyrosin-basierte (Y)-Motive:	
NPXY	Megalin, LDL-Rezeptor
YXX Φ	Transferrinrezeptor
PPXY	α -, β - und γ - Untereinheiten des EnaC
Dileucin-basierende (LL)-Motive:	GLUT-4, Vasopressin-V2-Rezeptor

Proteine mit diesen Motiven werden über die *Clathrin*-abhängige rezeptorvermittelte Endozytose von der Zelle aufgenommen. Ein eindrucksvolles Beispiel ist das NPXY Motiv des LDL-Rezeptors. Eine Mutation des Tyrosins verringert die Internalisierung des Rezeptors um 50% und wurde als Ursache einer vererbaren Krankheit (familiäre Hypercholesterolämie) identifiziert (Davis *et al.*, 1986). Im folgenden wird das PY Motiv und seine Rolle bei der Endozytose des ENaCs erläutert. Dieses Motiv wurde als Prolin-reich beschrieben und besitzt ebenfalls einen kritischen Tyrosinrest. Es gehört damit zu der Familie der Tyrosin-basierten Motive.

Das PY Motiv:

Dieses Motiv wurde zuerst in zwei Proteinen, WBP-1 und WBP-2 (*WW-domain binding protein*) identifiziert. Mit diesem Motiv interagieren sogenannte WW-Domänen aus dem YAP-Protein (*yes associated protein*) (Chen *et al.*, 1995; Sudol *et al.*, 1995). WW-Domänen bestehen aus ungefähr 35 Aminosäuren. Zwei hochkonservierte Tryptophanreste und ein ebenfalls hochkonservierter Prolinrest in der Nähe des zweiten Tryptophans zeichnen diese Domäne aus. Zusätzlich besitzt diese Domäne in ihrer zentralen Region einen Bereich aus hydrophoben und aromatischen Aminosäuren (Sudol *et al.*, 1995).

Besonders interessant wurde das PY Motiv durch dessen Identifikation in den drei Untereinheiten des epithelialen Amilorid-sensitiven Natriumkanals (ENaC) (Schild *et al.*, 1996). Dieser Ionenkanal vermittelt die Resorption von Natriumionen über die apikale Membran vieler epithelialer Zellen, z.B im distalen Tubulus der Niere, im distalen Dickdarm oder im respiratorischen Atemtrakt (Renard *et al.*, 1995). Er spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Blutvolumens und der Geschmackswahrnehmung. Ferner reguliert er die Absorption und Sekretion von Flüssigkeit in der Lunge und kontrolliert die geringe Natrium Konzentration in der Cochlea des Innenohrs (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2000).

Der ENaC ist als Heterooligomer aus den drei homologen Untereinheiten α , β und γ zusammengesetzt (Canessa *et al.*, 1993; Canessa *et al.*, 1994), die den Kanal mit der Stöchiometrie 2α , 1β , 1γ bilden (Firsov *et al.*, 1998). Jede Untereinheit besitzt zwei Transmembrandomänen, die durch eine große extrazelluläre Schleife miteinander verknüpft sind. Der N- und der C-Terminus sind beide sehr kurz und liegen intrazellulär. Die C-Termini aller drei Untereinheiten enthalten ein PY Motiv. Mutationen innerhalb der β - und γ -Untereinheiten, die das PY Motiv zerstören, oder den C-Terminus verkürzen, wurden in Patienten mit dem Liddle Syndrom gefunden (Shimkets *et al.*, 1994; Hansson *et al.*, 1995; Hansson *et al.*, 1995). Diese Krankheit ist sehr selten und durch einen sehr hohen Blutdruck gekennzeichnet, welcher durch die stark erhöhte Resorption von Na^+ innerhalb des distalen Tubulus der Niere entsteht.

Die Analyse der Liddle Syndrom Mutationen in *Xenopus* Oozyten ergab, daß diese verkürzten β - und γ -Untereinheiten erhöhte Ströme erzeugten, wenn sie mit den korrespondierenden Wildtyp Untereinheiten des ENaCs koexprimiert wurden (Schild

et al., 1995; Snyder *et al.*, 1995; Schild *et al.*, 1996). Durch gezielte Mutagenese konnte in der β - und γ -Untereinheit das PY Motiv als Zielsequenz identifiziert werden, das bei Deletion einen erhöhten Strom verursacht. Dieser wird zum einen hervorgerufen durch eine vergrößerte Anzahl von Kanälen in der Plasmamembran und zum anderen durch eine Vergrößerung der Offenwahrscheinlichkeit der mutierten Kanäle (Firsov *et al.*, 1996). Ferner wurde die erhöhte Aktivität der mutierten ENaC Kanäle mit einer defekten Na^+ -abhängigen Rückkopplungsinhibition zu erklären versucht (Kellenberger *et al.*, 1998). Mutationen, die das PY Motiv der α -Untereinheit zerstören, ergaben keine Aktivitätsänderungen des ENaCs in *Xenopus* Oozyten (Schild *et al.*, 1996).

Die Ubiquitin-Protein Ligase Nedd4 wurde durch das Hefe-Zwei-Hybrid (*yeast two hybrid*) System als Bindungspartner für die PY Motive der α -, β - und γ -Untereinheiten identifiziert (Staub *et al.*, 1996). Dieses Protein wurde 1992 kloniert und besteht aus einer N-terminalen C2/CalB Domäne (eine Kalzium-abhängige Lipid-Bindungsdomäne), drei WW-Domänen (vier im Falle der humanen und *Xenopus laevis* Homologen) (Staub *et al.*, 1996), dabei handelt es sich um Protein-Protein-Interaktionsmodule, und einer HECT-Domäne (*homologous to E6-AP protein COOH-terminal*, eine Ubiquitin-Protein Ligase Domäne) (Huibregtse *et al.*, 1995). Nedd4 bindet über seine WW-Domänen an die PY Motive der α -, β - und γ -Untereinheiten des ENaCs, wobei die Bindung am stärksten an die β -Untereinheit erfolgt. Die Nedd4 Bindung an das PY Motiv der β -Untereinheit konnte durch Mutationen innerhalb des PY Motivs aufgehoben werden, dabei wurde durch die Mutationen PAXY und PPXA die Bindung vollständig verhindert (Staub *et al.*, 1996).

Ubiquitinierung von Proteinen führt zu einem schnellen Abbau des Proteins durch das Proteasom oder im Fall von manchen Transmembranproteinen zu deren Abbau innerhalb der Lysosomen (Hershko *et al.*, 1998). Es konnte für den Ionenkanal ENaC gezeigt werden, daß es sich dabei um ein Proteinkomplex handelt, der kurzlebig ist und *in vivo* ubiquitiniert wird (Staub *et al.*, 1997). Diese Proteinmodifikation erfolgt an Lysinresten innerhalb der N-Termini der α - und γ -Untereinheiten des ENaCs. Die Analyse von *Missense*-Mutationen dieser Lysinreste ergab eine verminderte Ubiquitinierung und eine erhöhte ENaC Aktivität, die durch eine Vergrößerung der Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran erklärt werden konnte. Die

Ubiquitinierung der β -Untereinheit konnte nicht nachgewiesen werden (Staub *et al.*, 1997). Durch die überlappende Expression der beiden Proteine wird deutlich, daß diese Interaktion von Nedd4 mit dem ENaC von physiologischer Bedeutung ist (Duc *et al.*, 1994).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß Nedd4 über seine WW-Domänen mit den ENaC PY Motiven interagiert und vermutlich direkt deren Ubiquitinierung verursacht. Dies führt zur *Clathrin*-vermittelten Endozytose des Kanals und dessen lysosomaler Degradation. Dieser Prozeß ist wahrscheinlich in Liddle Syndrom Patienten gestört. Deren ENaC Kanäle interagieren nicht mehr mit Nedd4, wodurch sich die Anzahl der Kanäle in der apikalen Membran des distalen Tubulus in der Niere erhöht. Die vermehrte Na^+ -Resorption führt schließlich zur Erhöhung des Blutdruckes.

1.6 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Aminosäuresequenzen in Ionenkanälen untersucht werden, die wichtig sind für die Zielsteuerung der Proteine und der Interaktion mit anderen Proteinen. Die Untersuchungen bezogen sich auf die physiologisch sehr wichtigen Mitglieder der CLC- und KCNQ-Familie: CLC-5, KCNQ2 und KCNQ3.

Bei den beiden KCNQ-Kanälen war bekannt, daß sie miteinander interagieren und einen heteromeren Kanal bilden können (Biervert *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Dies beruhte auf biochemischen, elektrophysiologischen, humangenetischen und pharmakologischen Befunden. In elektrophysiologischen Untersuchungen an *Xenopus* Oozyten zeigte sich eine Aktivierung des Stroms bei Koexpression beider Untereinheiten (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Ferner gab es deutliche Hinweise, daß es sich bei dem heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Ionenkanal um das molekulare Korrelat des M-Strom vermittelnden Kaliumkanals handelt (Wang *et al.*, 1998). Ein Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, wie der Anstieg des Stroms der heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanäle, verglichen mit den homomeren KCNQ2 und KCNQ3 Kanälen, zu erklären ist. Dafür gab es drei mögliche Gründe, die entweder alleine oder kombiniert diese Beobachtung erklären können. 1) Die Einzelkanalleitfähigkeit oder 2) die Offenwahrscheinlichkeit des heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanals ist größer als die der homomeren KCNQ2 und

KCNQ3 Kanäle. 3) Die Anzahl der aktiven heteromeren Kanäle in der Plasmamembran ist verglichen mit der der homomeren Kanäle größer. Zusätzlich sollten BFNC Mutationen in den KCNQ2 und KCNQ3 Kanälen in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung heteromerer Kanäle untersucht werden. Daraus sollten mögliche Interaktionsdomänen abgeleitet werden, die für die Bildung und damit für die Zielsteuerung des heteromeren Kanals von Bedeutung sind.

Im Fall von CIC-5 war zuvor bereits eine PY Motiv-artige Aminosäuresequenz zwischen den beiden CBS-Domänen in Carboxyterminus identifiziert worden (Pirozzi *et al.*, 1997). In einem biochemischen Ansatz interagierten mit dieser Sequenz WW-Domänen aus drei verschiedenen Proteinen. Diese Proteine wurden WWP1, WWP2 und WWP3 genannt (Pirozzi *et al.*, 1997). WWP2 war das einzige vollständig klonierte Protein und gehört zur Familie der Ubiquitin-Protein Ligasen. Ferner zeigte die vierte WW-Domäne in diesem Protein die größte Affinität zu der PY Motiv-artigen Aminosäuresequenz in CIC-5 (Pirozzi *et al.*, 1997). Nedd4 gehört ebenfalls zu der Familie der Ubiquitin-Protein Ligasen und bindet an die PY Motive der α - und γ -Untereinheiten des ENaCs (Staub *et al.*, 1996). Diese Ubiquitin-Protein Ligase vermittelt vermutlich die Ubiquitinierung des Kanals und damit seine Endozytose und Degradation (Staub *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob CIC-5 ebenfalls einer vergleichbaren Regulation unterliegt, oder ob es andere Einflußmöglichkeiten gibt, die die Aktivität des Kanals in der Plasmamembran regulieren. Besonders der Einfluß endozytotischer Prozesse ist interessant, da CIC-5 in renalen Gewebe eine wichtige Rolle bei der Endozytose spielt (Piwon *et al.*, 2000).