

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen an den Kaliumkanalproteinen KCNQ2 und KCNQ3

Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind viel größere Ströme in *Xenopus* Oozyten messbar, wenn KCNQ2 und KCNQ3 koexprimiert werden, verglichen mit den jeweiligen homomeren Kanälen. Dies kann im wesentlichen drei Ursachen haben: 1) Zunahme der Einzelkanalleitfähigkeit, 2) Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit und 3) Zunahme der Anzahl aktiver Kanäle an der Zelloberfläche. Diese Alternativen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Um die Einzelkanalleitfähigkeiten von homo- und heteromeren KCNQ2 und KCNQ3 Kaliumkanälen zu bestimmen, wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen wurden mittels nicht-stationärer Rauschanalyse an großen Membranbereichen (sogenannte *Macro-patches*), die viele Kanäle enthielten, die Einzelkanalleitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten ermittelt und zum anderen wurden die Einzelkanalleitfähigkeiten durch Einzelkanalmessungen bestimmt. Durch diesen zweifachen Ansatz sollte ausgeschlossen werden, daß zufällig Einzelkanäle untersucht werden, die nicht den makroskopischen Strom ausmachen. Dies ist bei *Xenopus* Oozyten als Expressionsmodell besonders wichtig, da heterolog exprimierte Ionenkanäle wie z.B. CIC-0 (Bauer *et al.*, 1991) nicht gleichmäßig über die Oberfläche verteilt sind.

Die im folgenden dargestellten elektrophysiologischen Experimente zur Rauschanalyse und Einzelkanalmessungen wurden von Michael Pusch (Genua) durchgeführt.

4.1.1 Messung der Einzelkanalleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit mittels nicht-stationärer Rauschanalyse

Für die nicht-stationäre Rauschanalyse wurden injizierte *Xenopus* Oozyten im *cell-attached* Modus mit der *Patch-clamp* Technik gemessen. Wegen der hohen

Kalium-Konzentration im Bad (100mM) war das Ruhepotential der *Xenopus* Oozyten nahe 0mV. Die Pipette enthielt eine Kalium-Konzentration von 10mM, um damit große einwärtsgerichtete Kalium-Ströme messen zu können, die bei Sprüngen zu negativen Spannungen auftraten. Da der Kanal bei negativen Spannungen schließt, wurde der nicht-stationäre Strom (*tail currents*) nach einem Spannungssprung von +60mV (offene Kanäle) auf -100mV (geschlossene Kanäle) aufgezeichnet. Die meisten *patches* enthielten viele Kanäle und die Ströme, die für KCNQ2 und KCNQ2/KCNQ3 gemessen wurden, waren verhältnismäßig groß (Abb.4.1). Viel kleinere Ströme wurden für KCNQ3 gemessen, die sich kaum von denen uninjizierten Oozyten unterschieden und deswegen in Abb.4.1 nicht gezeigt werden.

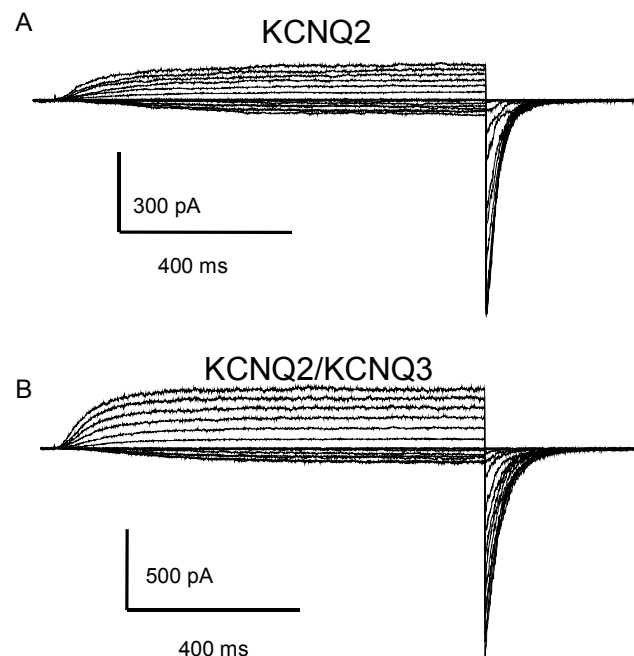


Abbildung 4.1: Macro-patch Aufnahmen von Oozyten, die KCNQ2 (A) oder KCNQ2 und KCNQ3 koexprimieren (B). Stromspuren gemessen im *cell-attached* Modus nach Injektion von KCNQ2 oder KCNQ2 und KCNQ3 cRNA. Die Spannung wurde von +60mV bis -70mV in 10mV Schritten geklemmt, gefolgt von einem konstanten Endpotential von -100mV (Haltepotential, -80mV; Aufnahmezeit: 10kHz, gefiltert bei 5kHz).

Die Rauschanalyse wurde durch wiederholte depolarisierende Spannungssprünge auf +60mV durchgeführt, gefolgt von einem hyperpolarisierenden Testpuls auf -100mV. Bei diesen negativen Spannungen schließen die Kanäle, die zuvor geöffnet waren, wodurch sich die Offenwahrscheinlichkeit (p_{open}) ändert. Diese Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit ist eine notwendige Voraussetzung zur

Durchführung der nicht-stationären Rauschanalyse. In Abb.4.2 sind Beispiele für KCNQ2 (Abb.4.2.A), KCNQ3 (Abb.4.2.B) und KCNQ2/3 (Abb.4.2.C) zu sehen.

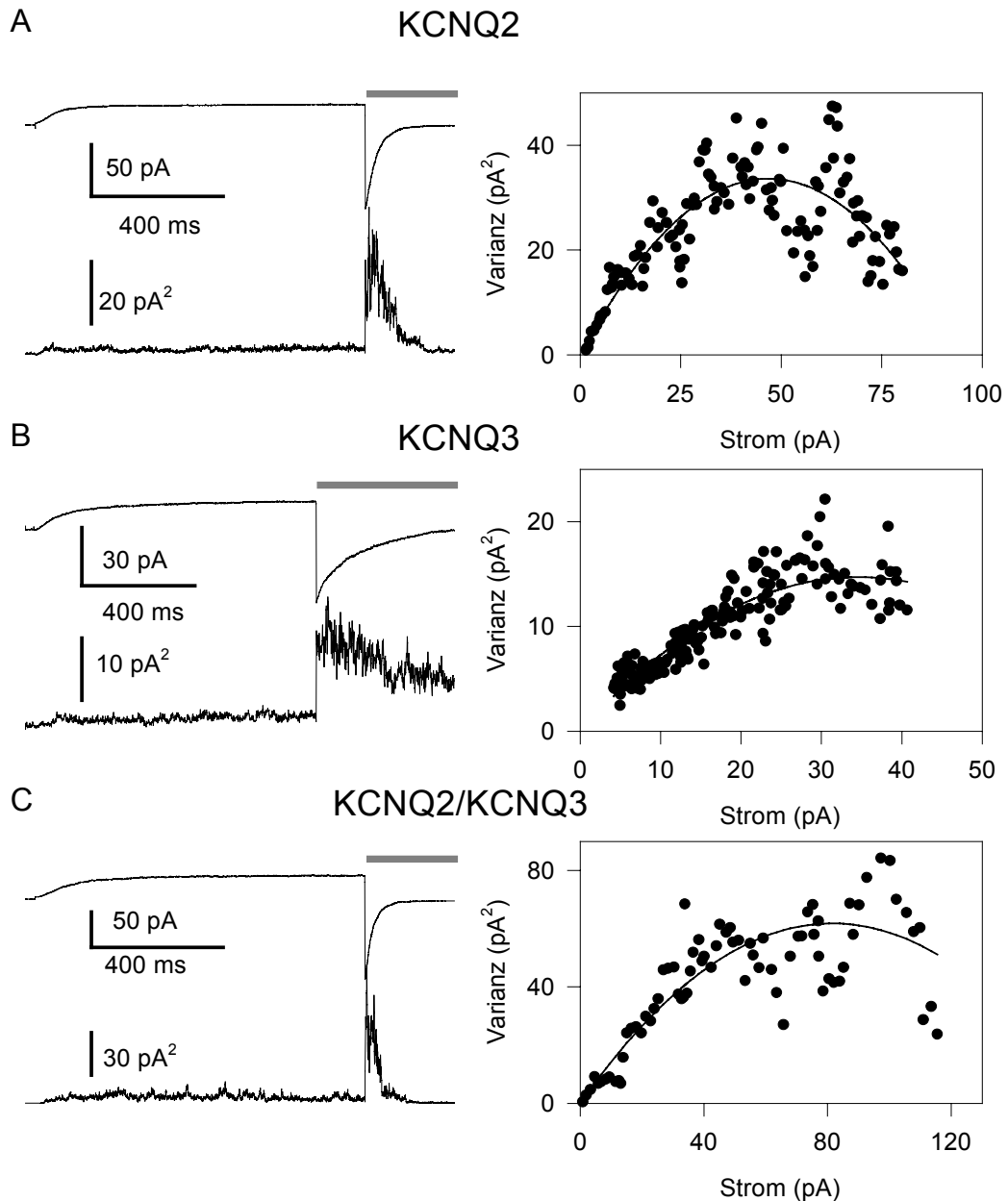


Abbildung 4.2: Rauschanalyse von KCNQ2 (A), KCNQ3 (B) und koexprimierten KCNQ2/KCNQ3 Kanälen (C). Die Spuren auf der linken Seite der Abbildung zeigen den gemittelten Strom (obere Darstellung) und die Varianz des mittleren Stroms (untere Darstellung), die erhalten wurden, nachdem wiederholt von +60mV auf die Testspannung von -100mV geklemmt wurde. Die mittleren Ströme bei -100mV wurden zur Rauschanalyse verwandt (das analysierte Intervall ist markiert durch den grauen Strich über den Stromspuren auf der linken oberen Seite). Auf der rechten Seite ist die Varianz gegen den gemittelten Strom für die Testspannung aufgetragen. Die *Fit*-Kurve gemäß der Gleichung: $\sigma^2 = i \cdot I - I^2/N$ (I ist der gemittelte Strom, i der Einzelkanalstrom, und N die Anzahl der Kanäle), ist als schwarze durchgezogene Linie dargestellt (weiterführende Erläuterungen im Methodenteil Kapitel 3.4.3).

Die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit homomerer KCNQ2 und heteromerer KCNQ2/3 Kanäle war praktisch identisch (KCNQ2: $17,8 \pm 3,1$ pS ($n=8$ (*patches*); \pm Standardabweichung); KCNQ2/3: $16,3 \pm 2,5$ pS ($n=21$)), wobei die Leitfähigkeit für KCNQ3 ungefähr halb so groß war ($7,3 \pm 0,7$ pS ($n=7$)) (alle Werte wurden bei -100 mV bestimmt). Daraus folgt, daß die große Stimulation des makroskopischen Stroms bei Koinjektion von KCNQ2 und KCNQ3 in *Xenopus* Oozyten (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), nicht mit einer Zunahme der Einzelkanalleitfähigkeit der heteromeren Kanäle erklärt werden kann.

Eine andere Möglichkeit ist, daß die Offenwahrscheinlichkeit der heteromeren Kanäle zunimmt. Von den Varianzkurven in Abbildung 4.2 kann die maximale Offenwahrscheinlichkeit durch die Gleichung $p_{\max} = I_{\max}/N/i$ abgeschätzt werden, wobei I_{\max} der größte einwärts-gerichtete Strom ist, der unmittelbar nach dem Spannungssprung zu -100 mV gemessen wurde, N gibt die Anzahl der Kanäle und i den Einzelkanalstrom an. Wieder sind die Werte für homomere KCNQ2 und heteromere KCNQ2/3 Kanäle nicht stark voneinander abweichend (KCNQ2: $0,61 \pm 0,1$ ($n=8$); KCNQ2/3: $0,72 \pm 0,1$ ($n=21$)). Die maximale Offenwahrscheinlichkeit für KCNQ3 war ein wenig kleiner (KCNQ3: $0,42 \pm 0,1$ ($n=7$)).

4.1.2 Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeiten durch Einzelkanalmessungen

Um die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.1 zu überprüfen, wurden Amplitudenhistogramme der Einzelkanäle erstellt. Einzelkanäle konnten gemessen werden in *patches*, die nur wenige aktive Kanäle enthielten, und bei denen ein großer Teil der Kanäle durch Anlegen einer hyperpolarisierenden Spannung geschlossen worden war. Beispiele sind in der Abbildung 4.3 zu sehen.

Für homomere KCNQ2 bzw. KCNQ3 Kanäle waren die Einzelkanalamplituden sehr homogen (gemessen bei -100 mV) und stimmten gut mit den Ergebnissen aus der nicht-stationären Rauschanalyse überein. Für KCNQ2 wurde eine durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit von $18,4 \pm 1,5$ pS (variierten von $16,1$ - $20,8$ pS; $n=12$) (Abb.4.3.B) und für KCNQ3 $7,4 \pm 0,7$ pS (variierten von $6,3$ - $8,6$ pS; $n=13$) (Abb.4.3.C) gemessen.

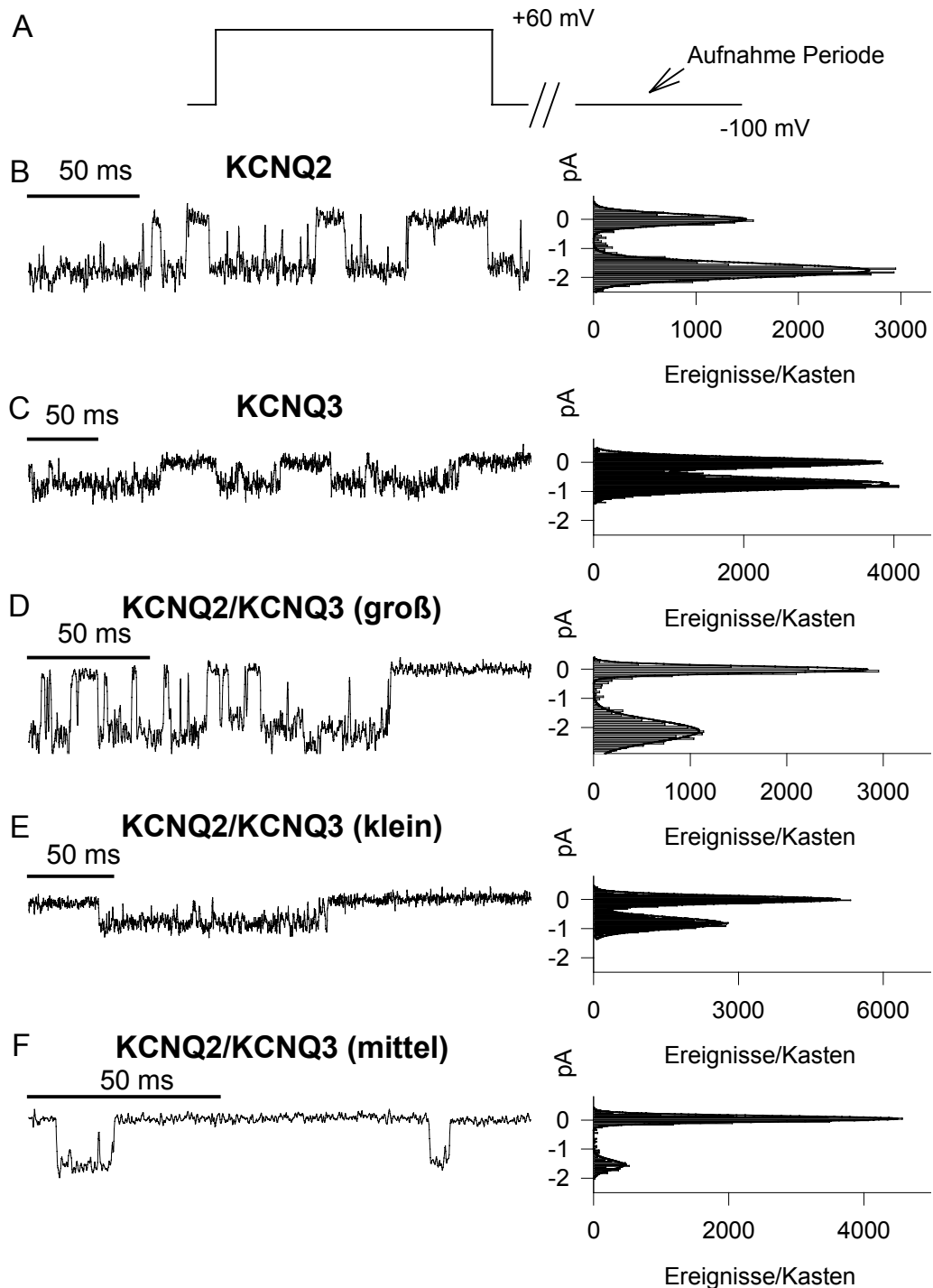


Abbildung 4.3: Typische Einzelkanalspuren von KCNQ2 (B), KCNQ3 (C), und KCNQ2/KCNQ3 (D-F) koexprimiert. Die Spuren auf der linken Seite wurden aufgenommen, während eine deaktivierende Spannung von -100mV anlag (siehe die schematische Darstellung unter A; der Pfeil zeigt die Aufnahme Periode, die begann, nachdem die meisten Kanäle deaktiviert waren und sich nur noch ein aktiver Kanal in dem *patch* befand). Die Striche über den Einzelkanalspuren verdeutlichen die Zeitskalen der Aufnahmen (50ms). Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Amplitudenhistogramme der Einzelkanalspuren angepaßt an die Summe zweier Gauß-Kurven zu sehen. Die Aufnahmen für die heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanäle zeigen deutlich die Heterogenität der Einzelkanalamplitude (D-F). Die Aufnahmen wurden bei 1kHz gefiltert. Die individuellen Einzelkanalamplituden für die gezeigten Aufnahmen sind: 1,76 pA (B), 0,74 pA (C), 2,1 pA (D), 0,81 pA (E), 1,63 pA (F). Die Stromskalen an den Amplitudenhistogrammen gelten auch für die Einzelkanalaufnahmen.

Im Gegensatz dazu ergaben die Auswertungen der Einzelkanalamplituden der *Xenopus* Oozyten, die KCNQ2 und KCNQ3 koexprimierten, einen großen Schwankungsbereich in den Einzelkanalleitfähigkeiten (8-22 pS) (Abb.4.3.D-F). Dieser Bereich beinhaltete mehrere Einzelkanalleitfähigkeitsstufen, die nicht für homomere KCNQ2 Kanäle bzw. KCNQ3 Kanäle gemessen wurden und vermutlich auf heteromere KCNQ2/KCNQ3 Kanäle mit unterschiedlicher Untereinheitenstöchiometrie zurückzuführen sind. Der durchschnittliche Wert, der so bestimmten Einzelkanalleitfähigkeit für heteromere KCNQ2/KCNQ3 Kanäle ($16,2 \pm 3,7$) war im wesentlichen identisch mit dem, der durch die nicht-stationäre Rauschanalyse bestimmt wurde.

4.1.3 Messung der Oberflächenexpression

Die große Zunahme des Stroms, der in *Xenopus* Oozyten gemessen wird, wenn KCNQ2 und KCNQ3 koexprimiert werden (mehr als 10-fach verglichen mit homomeren KCNQ2 und mehr als 100-fach im Falle von KCNQ3) (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), kann nach den in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.2 erhaltenen Ergebnissen nicht mit einer erhöhten Einzelkanalleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit erklärt werden.

Eine andere mögliche Erklärung könnte die Zunahme der Anzahl von heteromeren Kanälen an der Zelloberfläche sein. Um diese Frage zu beantworten, wurde untersucht, ob die Oberflächenexpression von KCNQ2 durch KCNQ3 erhöht werden konnte und umgekehrt. Dazu wurde ein extrazelluläres HA-Epitop in KCNQ2 und KCNQ3 eingefügt. Da diese Proteine keine große extrazelluläre Domäne besitzen, war es schwierig, eine geeignete Stelle für das Einfügen des Epitopes zu finden. Um eventuelle Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften wie Spannungsabhängigkeit, Ionenselektivität, Schaltverhalten und Gleichrichtung der Kanäle zu vermeiden, die das Einfügen des Epitopes zwischen die Transmembranbereiche S3 und S4 (wichtig für das spannungsabhängige Schalten) bzw. S5 und S6 (enthält die Porenregion) verursachen könnte, wurde das HA-Epitop zwischen die Transmembranbereiche S1 und S2 eingefügt (Abb.4.4). Da der extrazelluläre Bereich zwischen S1 und S2 im Falle von KCNQ2 und KCNQ3 sehr kurz ist (neun Aminosäuren) wurden zusätzliche Aminosäuren an beiden Seiten des Epitopes eingefügt, um eine gute

Zugänglichkeit für den Antikörper zu erreichen. Diese Aminosäuren stammten aus der großen extrazellulären Domäne (zwischen D1 und D2) des humanen Chloridkanals CIC-5, da dieser Kanal mit einem HA-Epitop in diesem Abschnitt elektrophysiologische Eigenschaften hat, die dem des Wildtyps entsprechen und die Messung der Oberflächenexpression mit dem HA-Antikörper möglich ist (Kapitel 4.2.2).

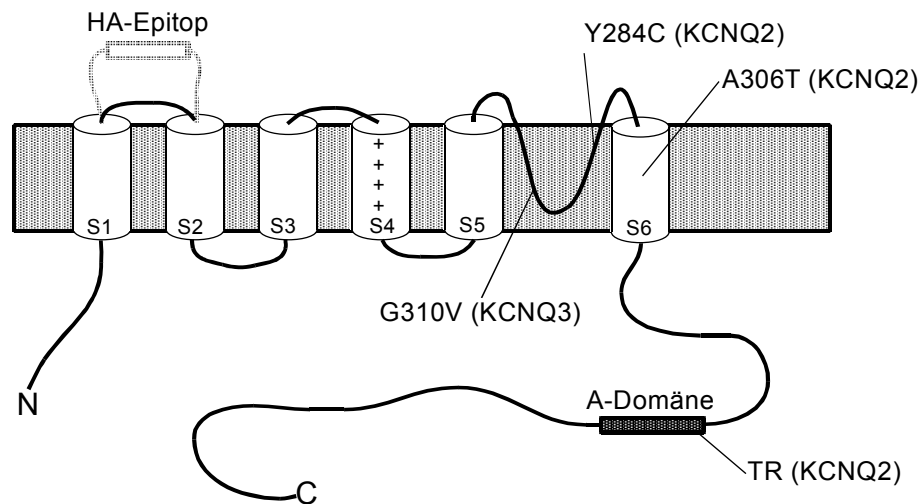


Abbildung 4.4: Topologiemodell der KCNQ-Kanäle. Das Topologiemodell der KCNQ-Kanäle zeigt die Stelle in der das HA-Epitop eingefügt wurde, um die Oberflächenexpression zu messen und die analysierten BFNC Mutationen. Drei dieser Mutationen sind Aminosäureaustausche, die sich in der Porenregion (KCNQ2(Y284C) und KCNQ3(G310V)) oder KCNQ2(A306T) in dem transmembranären Bereich S6 befinden. Bei einer weiteren untersuchten Mutation KCNQ2(1600ins5bp) (hier als TR bezeichnet) sind fünf Basenpaare an der Stelle 1600bp in KCNQ2 eingefügt. Dies führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und einem vorzeitigem Abbruch der Aminosäuresequenz.

Es wurden neben dem HA-Epitop (YPYDVDPDYA) für KCNQ2 insgesamt 16 und für KCNQ3 17 zusätzliche Aminosäuren aus CIC-5 eingefügt, wodurch sich die Aminosäuresequenz zwischen S1 und S2 wie folgt änderte:

¹¹⁵KEYEKSSEGSEHYPYDVDPDYAVTFEERDKCPEWNA¹²⁶ (KCNQ2)

¹⁴⁵KEYETVSGDNSEHYPYDVDPDYAVTFEERDKCPEWNW¹⁵⁶ (KCNQ3)

Das HA-Epitop ist fett hervorgehoben und die Aminosäuren, die von CIC-5 stammen, kursiv dargestellt.

Diese Mutanten wurden mittels rekombinanter PCR (Kapitel 3.1.8.3) hergestellt und durch Sequenzierung (Kapitel 3.1.9) überprüft. Die elektrophysiologische Analyse der HA-Epitop-tragenden Kanäle durch TEVC in *Xenopus* Oozyten

ergab für die homomeren HA-markierten KCNQ2 Kanäle eine reduzierte Stromamplitude, was mit einer verminderten Expression oder einer geringeren Stabilität der KCNQ2HA Kanäle erklärt werden kann. Für KCNQ3HA wurden keine Kaliumströme gemessen. Da aber schon KCNQ3 Wildtyp nur sehr schwach exprimiert (Schroeder *et al.*, 1998), war dieses Ergebnis nicht überraschend. Allerdings wurden für die heteromeren KCNQ2/KCNQ3HA und KCNQ2HA/KCNQ3 typische makroskopische Ströme gemessen, die in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften, wie Aktivierung und Rektifizierung nicht von den heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Wildtyp Kanälen zu unterscheiden waren. Der einzige Unterschied war, daß die Stromamplitude der heteromeren KCNQ2HA/KCNQ3 und KCNQ2/KCNQ3HA Kanäle nur etwa 50-70% von KCNQ2/KCNQ3 ausmachte (Abb.4.5).

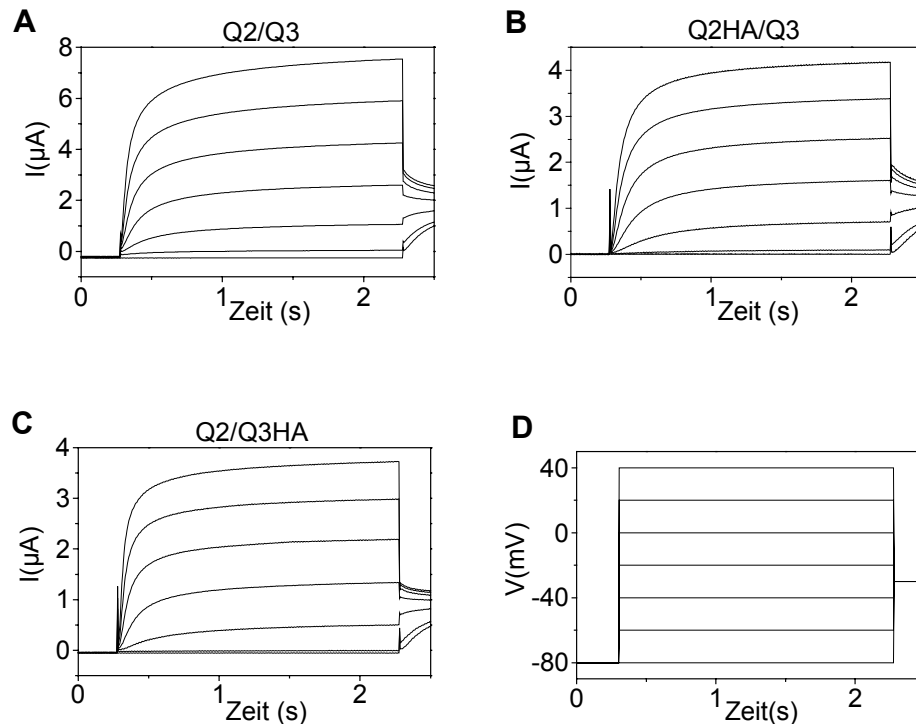


Abbildung 4.5: Funktionelle Expression der KCNQ2HA und KCNQ3HA Konstrukte in Koexpressionsexperimenten. Die HA-markierten KCNQ2 und KCNQ3 Konstrukte wurden mit den jeweils anderen nicht-markierten KCNQ-Untereinheiten koinjiziert und mit KCNQ2/KCNQ3 Kanälen verglichen. Es wurden in allen dargestellten Experimenten die cRNAs der Untereinheiten im Verhältnis 1:1 gemischt und in *Xenopus* Oozyten injiziert. Nach drei Tagen wurde mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme die Expression überprüft. In (A) KCNQ2/3 (Q2/Q3), (B) KCNQ2HA/3 (Q2HA/Q3) und (C) KCNQ3HA/2 (Q3HA/Q2) sind typische Stromspuren, der heteromeren Kanäle zu sehen. In (D) ist das Spannungsprotokoll zu sehen, mit dem die *Xenopus* Oozyten analysiert wurden.

Dies kann wiederum mit einer geringeren Expression oder einer geringeren Stabilität der HA-markierten Kanäle erklärt werden. Das Einfügen der zusätzlichen Aminosäuren änderte demnach nicht die biophysikalischen Eigenschaften der Kanäle (zumindest nicht die hier untersuchten), sondern verminderte nur leicht deren Expression.

Die Menge an HA-Epitop an der Oberfläche nicht-permeabilisierter *Xenopus* Oozyten wurde durch Inkubation der Oozyten in einer Lösung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop quantifiziert. Dem folgte eine Inkubation mit einem Zweitantikörper, an den HRP gekoppelt ist. Die enzymatische Aktivität wurde durch Chemilumineszenz in einem Luminometer detektiert, das die erhaltenen Werte als relative Lichteinheiten (RLU; *Relative Light Unit*) angab. *Xenopus* Oozyten, die epitopfreie KCNQ-Kanäle exprimierten, dienten dabei als Negativkontrolle. Diese Methode zeichnet sich durch ein hervorragendes Verhältnis von Signal und Hintergrund aus und erlaubt die Detektion des HA-Epitopes als Maß für die Oberflächenexpression. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abb.4.6 dargestellt.

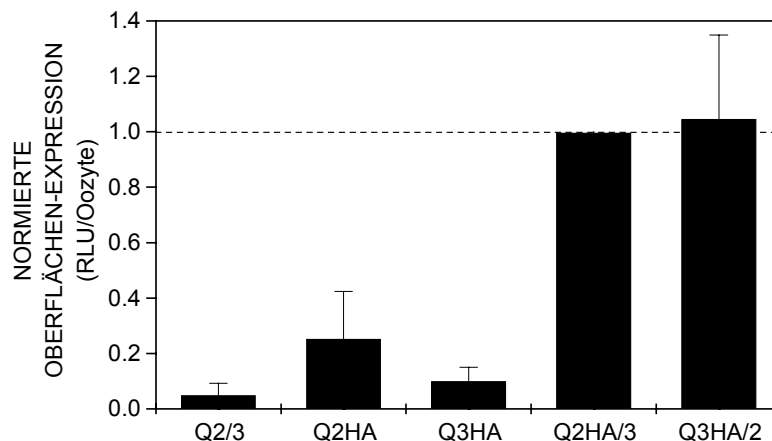


Abbildung 4.6: Oberflächenexpression von HA-markierten KCNQ2 (Q2HA) und KCNQ3 (Q3HA) Kanälen. Oozyten, die mit epitopfreien KCNQ2 und KCNQ3 (Q2/Q3) injiziert wurden, dienten als Negativkontrolle bzw. zur Überprüfung der unspezifischen Bindung des Antikörpers. Q2HA und Q3HA sind beide an der Oberfläche exprimiert, obgleich Q3HA in geringerem Maße. Koinjektion beider Untereinheiten führt zu einer starken Zunahme der Oberflächenexpression für Q2HA und Q3HA. Die Werte sind auf Q2HA/3 normiert, wie es durch die gestrichelte Linie verdeutlicht wird, um unterschiedliche Präparationen von Oozyten, die sich in der Expressionsstärke der KCNQ-Untereinheiten unterschieden, miteinander vergleichen zu können. In dieser und den folgenden Abbildungen der Analyse der Oberflächenexpression sind drei Experimente mit unterschiedlichen Oozyten und cRNA Präparationen zusammengefasst. Für jedes Konstrukt wurden 5-10 Oozyten pro Experiment analysiert (Fehler sind als Standardabweichung angegeben; RLU entspricht *Relative Light Unit*)

Nach den in Abb.4.6 gezeigten Ergebnissen, erreichen sowohl KCNQ2 als auch KCNQ3 als Homomere die Plasmamembran. Die KCNQ2 Oberflächenexpression war mehr als doppelt so groß wie die, die für KCNQ3 gemessen wurde.

Diese niedrigere Oberflächenexpression zusammen mit der reduzierten Einzelkanalleitfähigkeit ($\approx 7\text{pS}$ für KCNQ3 gegenüber $\approx 18\text{pS}$ für KCNQ2) und der geringeren Offenwahrscheinlichkeit ($\approx 0,4$ für KCNQ3 gegenüber $\approx 0,6$ für KCNQ2) erklärt die Beobachtung, daß KCNQ3 Ströme mehr als 10-fach kleiner sind als KCNQ2 Ströme (Schroeder *et al.*, 1998). Ein derartiges Stromverhältnis ergibt sich auch als Zusammenfassung aus den vorliegenden Ergebnissen.

Multipliziert man das Verhältnis der Einzelkanalleitfähigkeiten von KCNQ3 und KCNQ2 ($7/18$) mit dem Quotienten der Oberflächenexpressionsparameter ($2/5$) und dem Verhältnis der Offenwahrscheinlichkeiten ($2/3$), so erhält man einen Wert von 10,4%. Das bedeutet, daß nach dieser Analyse der KCNQ3 Strom nur etwa 10% des KCNQ2 Stroms ausmacht, was sehr gut mit den experimentellen Daten von Schroeder *et al.*, 1998 übereinstimmt (Schroeder *et al.*, 1998).

Koinjektion gleicher cRNA Mengen von KCNQ2 und KCNQ3 hatte zur Folge, daß die Oberflächenexpression sowohl von KCNQ2 als auch von KCNQ3 erhöht wurde. Für KCNQ2 erhöhte sich die Oberflächenexpression um einen Faktor von ungefähr fünf bei Koinjektion beider Kanäle und für KCNQ3 war der Faktor größer als zehn (Abb.4.6).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß hauptsächlich eine erhöhte Oberflächenexpression für den makroskopischen Anstieg des Stroms durch die Bildung heteromerer KCNQ2/KCNQ3 Kanäle verantwortlich ist. Wenn KCNQ2 und KCNQ3 koexprimiert wurden, war die Oberflächenexpression für KCNQ2 gleich der für KCNQ3. Dies deutet auf eine 1:1 Stöchiometrie beider KCNQ-Untereinheiten hin, bzw auf eine gemischte Stöchiometrie folgender Verteilung (unter der Annahme, daß keine heteromeren Kanäle bestimmter Stöchiometrie bevorzugt assoziieren):

3 3	2 3	2 2	2 2	2 2
3 3	3 3	3 3	2 3	2 2
<u>1</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
16	4	8	4	16
1	:	4	:	6
:	4	:	4	:
1	:	1	:	1

Diese Stöchiometrie-Verteilung erklärt auch die verschiedenen Einzelkanalleitfähigkeiten, die durch die Einzelkanalmessungen in Kapitel 4.1.2 bestimmt wurden.

Als nächstes wurde der Effekt von BFNC Mutationen auf die Oberflächenexpression untersucht. Bei KCNQ2(1600ins5bp) handelt es sich um eine Mutation, die in einer australischen Familie mit BFNC identifiziert wurde (Biervert *et al.*, 1998). Durch die Insertion von fünf Nukleotiden im zytoplasmatischen C-Terminus von KCNQ2 an der Stelle 1600bp verändert sich der offene Leserahmen, wodurch sich der folgende offene Leserahmen über einen Bereich von vier Aminosäuren verändert und ein vorzeitiges Stopkodon gelesen wird. Das hat zur Folge, daß der C-Terminus verkürzt wird und der Kanal eine Region verliert, die zwischen den KCNQ-Kanälen hochkonserviert ist (Abb.4.4). Es wurden zwei weitere BFNC-assoziierte Mutationen in KCNQ2 gefunden, die ebenfalls das Protein vor oder in dieser Region verkürzten und zu einem Funktionsverlust des Kanals führten (Singh *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse der Expression der HA-markierten KCNQ2(1600ins5bp) Mutante und die der Koexpression mit KCNQ3 sind in der Abb.4.7 zusammengefaßt. An dieser Stelle muß noch einmal darauf hingewiesen werden, daß in den folgenden Experimenten, die cRNAs der mutierten Kanäle mit den korrespondierenden Wildtyp Untereinheiten im Verhältnis 1:1 koinjiziert wurden. Dies spiegelt nicht den Status der Gendosis im heterozygoten Patienten wieder. Die Krankheit wird dominant vererbt, somit ist noch funktionsfähiges Kanalprotein durch das gesunde Allel vorhanden, wenn der Kanal nicht dem *imprinting* unterliegt. Die in BFNC gefundenen KCNQ2 und KCNQ3 Mutationen zeigen keinen dominant-negativen Effekt auf den heteromeren Strom (Schroeder *et al.*, 1998). Die Situation der Gendosis in einem Patienten stellt sich deswegen durch ein Verhältnis 1:1:2 (z.B. mutierter KCNQ2, Wildtyp KCNQ2, Wildtyp KCNQ3) dar, bei der nur eine etwa 25%ige Reduktion des Stroms verglichen mit dem Wildtyp Heteromer in *Xenopus* Oozyten gemessen wurde (Schroeder *et al.*, 1998).

Die Expression der HA-markierten KCNQ2(1600ins5bp) Mutante ergab keine signifikante Oberflächenexpression (Abb.4.7 Q2HA(TR)). Ferner wurde die Oberflächenexpression dieses verkürzten Kanals nicht durch Koexpression mit KCNQ3 verstärkt, und umgekehrt stimulierte er nicht die Oberflächenexpression von HA-markiertem KCNQ3.

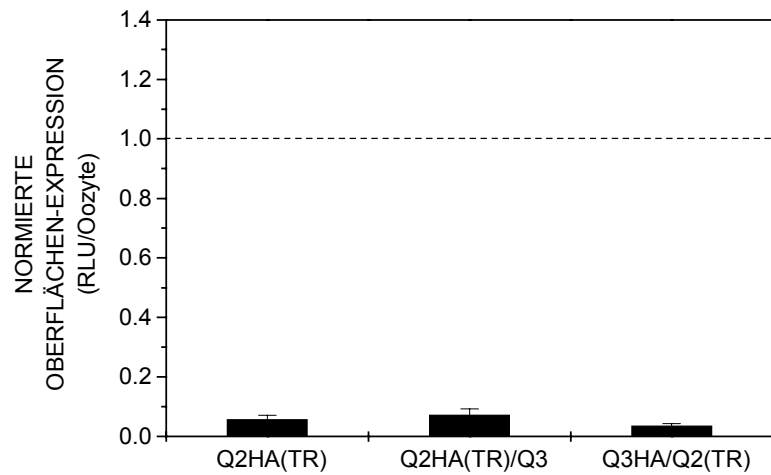


Abbildung 4.7: Oberflächenexpression der HA-markierten KCNQ2(1600ins5bp) Mutante. Die Oberflächenexpression dieser Mutante (Q2HA(TR)) unterscheidet sich nicht von der Negativkontrolle (Abb.4.6). Dies gilt auch für die Koexpressionsexperimente.

Bei BFNC-assoziierten KCNQ2 *Missense*-Mutationen, die entweder in der Pore bildenden P-Domäne (Y284C) oder in dem transmembranären Bereich S6 lagen, wurden im Gegensatz dazu Oberflächenexpressionswerte gemessen, die etwa gleich groß waren wie die für KCNQ2.

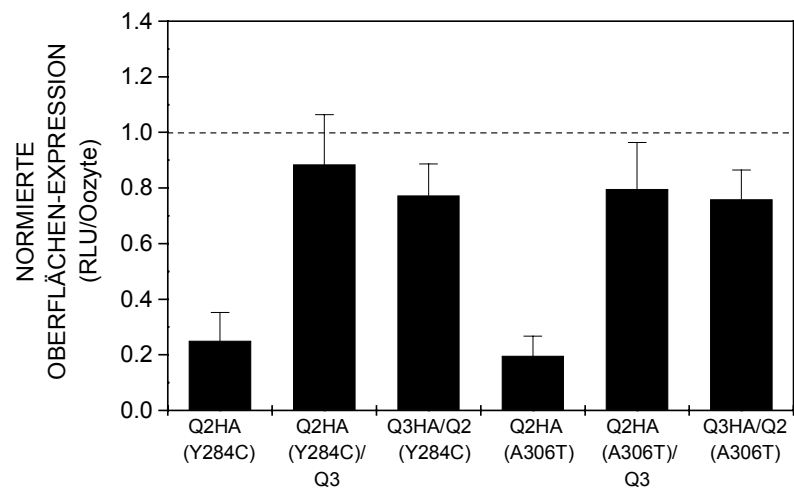


Abbildung 4.8: Oberflächenexpression der BFNC-assoziierten *Missense*-Mutationen in KCNQ2. Die Mutanten KCNQ2(Y284C) und KCNQ2(A306T) (benannt: Q2HA(Y284C) und Q2HA(A306T)) erreichten die Oberfläche der Oozyten ungefähr in gleichem Maße wie Q2HA (Abb.4.6). Ferner stimulierten sie die Oberflächenexpression von KCNQ3 bzw. wurden selber durch die Koexpression mit KCNQ3 in ihrer Oberflächenexpression stimuliert.

Beide KCNQ2 *Missense*-Mutationen stimulierten die Oberflächenexpression von HA-markierten KCNQ3 fast in dem gleichen Maße wie KCNQ2 Wildtyp. Einen

ähnlich großen Effekt auf die Oberflächenexpression HA-markierter und mutierter KCNQ2 Kanäle hatte KCNQ3 (Abb.4.8).

Nun wurde eine BFNC-assoziierte KCNQ3 Mutante KCNQ3(G310V), die wie KCNQ2(Y284C) einen Aminosäuren-Austausch in der Porenregion aufweist, untersucht. Die Oberflächenexpression dieser Mutante glich der des KCNQ3 Wildtyps und die Koexpressionsstudien ergaben, daß KCNQ3(G310V) die Oberflächenexpression HA-markierter KCNQ2 Kanäle verstärkte. Umgekehrt wurde die HA-markierte KCNQ3(G310V), wie in Abb.4.9 gezeigt, durch die Koexpression mit KCNQ2 in ihrer Oberflächenexpression stimuliert. Weder die KCNQ3 *Missense*-Mutation in der Porenregion des Kanals noch die beiden KCNQ2 *Missense*-Mutationen in der Porenregion und der S6 Transmembrandomäne (Vergleiche Abb.4.4) beeinflussen die Oberflächenexpression und damit die Zielsteuerung der Proteine.

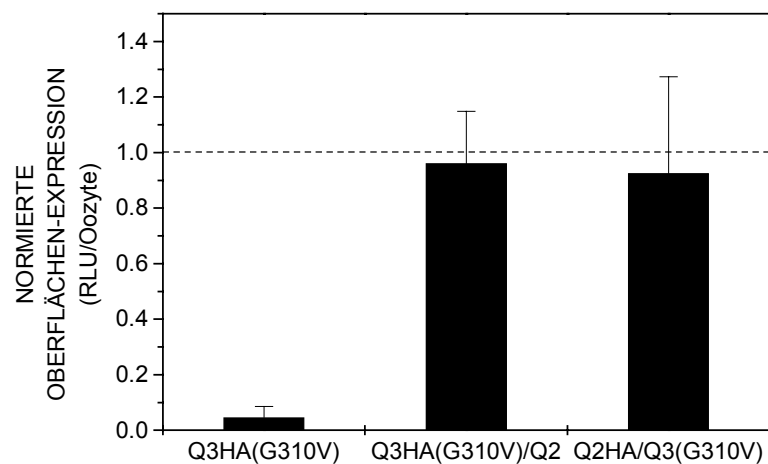


Abbildung 4.9: Oberflächenexpression einer BFNC-assoziierten *Missense*-Mutation in KCNQ3. Die KCNQ3(G310V) Mutation besitzt die gleiche Oberflächenexpression wie KCNQ3 WT und stimuliert die Oberflächenexpression von KCNQ2 ähnlich stark, wie sie auch selber von KCNQ2 in ihrer Oberflächenexpression stimuliert wird.

Um zu überprüfen, ob die Oozyten, die kein Signal in diesen Experimenten lieferten, HA-markiertes Protein exprimierten, wurden sie für jedes injizierte Konstrukt zusammengefaßt und mittels *Western-Blot* Analyse auf die Gesamtexpression HA-markierter KCNQ-Konstrukte untersucht. Dazu wurde der Antikörper aus der Oberflächenexpressionsanalyse verwandt. Diese Analyse ergab, daß alle unterschiedlichen HA-markierten KCNQ2- und KCNQ3-Konstrukte ähnlich stark in den Oozyten exprimiert wurden wie die jeweiligen Wildtyp Kanäle (Abb.4.10), wenn man beachtet, daß in die Oozyten immer die

gleiche Menge an cRNA injiziert wurde. Das erklärt, warum das Signal im *Western-Blot* für die heteromeren Kanäle nur etwa halb so intensiv ist, wie das für die homomeren Kanäle (vergleich dazu z.B. in Abb.4.10.A die Spuren A,B,C und D mit den Spuren G,H,I und J).

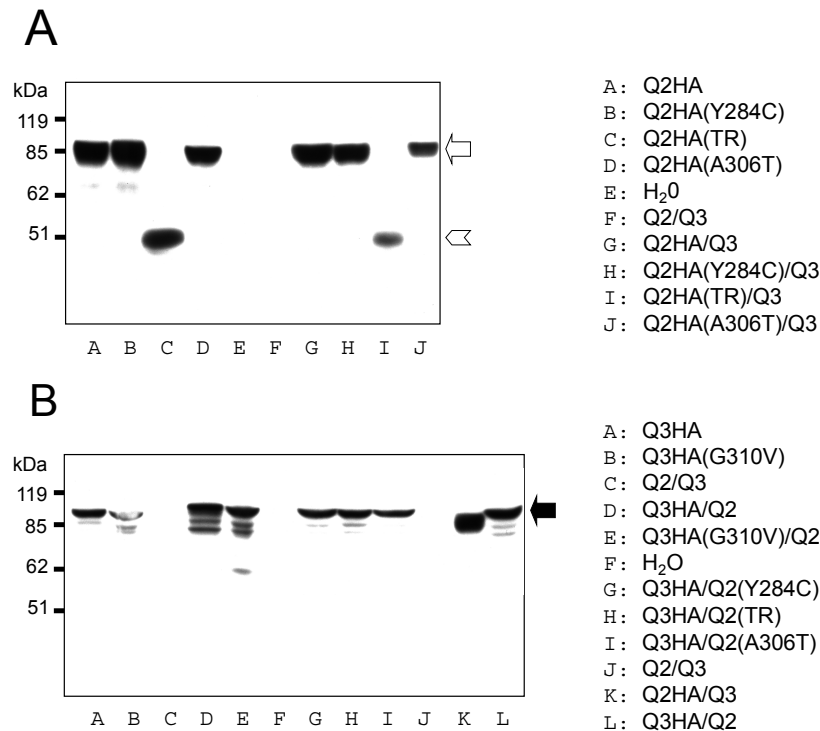


Abbildung 4.10: Western-Blot Analyse der Proteinexpression HA-markierter KCNQ2 und KCNQ3 Kanäle. Zur *Western-Blot* Analyse der Oozyten wurden für jedes injizierte Konstrukt die *Xenopus* Oozyten gesammelt und auf die gesamte Proteinexpression HA-markierter KCNQ-Untereinheiten mit dem Antikörper gegen das HA-Epitop untersucht. Der Pfeil in A deutet auf die Signale von den HA-markierten KCNQ2 Untereinheiten. Der Pfeilkopf in A zeigt das Signal der trunkierten HA-markierten KCNQ2 Mutante. Der Pfeil in B weist auf das Signal, das von den HA-markierten KCNQ3 Untereinheiten stammt. Aufgrund der konstanten Mengen an Gesamt-cRNA wurde in Oozyten, die koinjiziert wurden, nur halb so viel HA-markierte cRNA injiziert.

Es ist ferner deutlich zu sehen, daß der HA-markierte KCNQ2 Kanal ein kleineres apparentes molekulares Gewicht als der HA-markierter KCNQ3 Kanal (B, zweite Spur von rechts (K), verglichen mit (L)) besitzt. Verglichen mit den KCNQ3 Signalen sind die KCNQ2 Signale über einen weiteren Molekularbereich verschmiert sind. Dieses breitere Signal deutet darauf hin, daß KCNQ2 stärker glykosyliert wird als KCNQ3. Eine weitere wichtige Information ist, daß, wie in Abb.4.10.A in den Spuren C und I zu sehen ist, die verkürzte HA-markierte KCNQ2(1600ins5bp) Mutante exprimiert wurde.

Sie erreicht aber aufgrund des fehlenden C-terminalen Bereiches die Oberfläche der *Xenopus* Oozyten nicht (Abb.4.7).

4.2 Untersuchungen an dem Chloridionenkanal CIC-5

4.2.1 Mutationsanalyse eines PY Motivs im zytoplasmatischen C-Terminus von CIC-5.

Die Mitglieder der zweiten Unterfamilie der CLC-Kanalfamilie sind zu 80% homolog. Beim Vergleich der zytoplasmatischen C-Termini fällt auf, daß nur CIC-5 ein Prolin-reiches Motiv mit einem Tyrosin besitzt, das zwischen den beiden CBS-Domänen liegt (Abb.4.11.A). Dieses Motiv besitzt große Ähnlichkeit zu einem sogenannten PY Motiv, das in den drei Untereinheiten des Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanals (ENaC) vorkommt und dort eine wichtige Rolle bei der Regulation der Stabilität dieses Kanals spielt (siehe Kapitel 1.5.2). Daher war es naheliegend, durch Mutationen das PY Motiv zu zerstören und den Effekt auf CIC-5 zu analysieren.

A

```

CLC-3      . . . . .RLNGYPFLD AKEEFEFTHHTLAAD VMRPRRNDPPLAVLT
CLC-4      . . . . .HLNGYPFLD VKD--EFTHRTLATD VMRPRRGEPPLSVLT
CLC-5      . . . . .RLNGYPFLE AKE--EFAHKTAMD VMKPRRNDPPLTLVLT

- - - - - CBS1 - - - - -
CLC-3      QDNMTVDD IENMINE TS YNGFPVIMSKE SQ RL VGFALRRDLTIAI
CLC-4      QDSMTVEDVETLI KE TD YNGFPVVVSRDSE RL IGFAQRRELILAI
CLC-5      QDSMTVEDVETI I SE TTYSGFPVVVSRESQ RL VGFVLRDLII SI

- - - - -
CLC-3      ESARKKQEGIVGSSR VCFAQHTPSLPAESP RPLKLRSLDMSPT
CLC-4      NNARQRQEGIVSNSI MYFTEEPPELPANSP HPLKLRILNLSPT
CLC-5      ENARKKQDGVVSTSI IYFTEHS PPLPPYTP PTLKLRNILDLSPT

- - - - - CBS2 - - - - -
CLC-3      VTDHTPMEIVVDI FR KLGLRQCLVTHNGRL LGIITKKDILRHMAQ
CLC-4      VTDHTPMEIVVDI FR KLGLRQCLVTRSGRL LGIITKKDVLRHMAQ
CLC-5      VTDLTPMEIVVDI FR KLGLRQCLVTHNGRL LGIITKKDVLKHIAQ

CLC-3      TANQDPAS IMFN
CLC-4      MANQDPES IMFN
CLC-5      MANQDPDS ILFN

```

B

```

CIC-5      FTEHSPPLPPYTPPT
CIC-5 AAE_A FTEHSPPLAAETAPT
CIC-5 Y672E FTEHSPPLPETPPT

```

Abbildung 4.11: Primärstruktur eines Teils der C-Termini von CIC-3, CIC-4 und CIC-5. A) Vergleich der C-Termini, der zu einer Unterfamilie gehörenden CIC-3, CIC-4 und CIC-5, wobei nur der Bereich zu sehen ist, der die beiden CBS-Domänen umfaßt. Die Prolin-reiche Region in CIC-5 ist grau unterlegt. B) Schematische Darstellung der in CIC-5 eingefügten Mutationen, die das PY Motiv zerstören.

Wie in Abb.4.11.B gezeigt, wurden innerhalb des PY Motivs in CIC-5 drei Prolin-Reste und ein Tyrosin-Rest gegen drei Alanine bzw. ein Glutamat ausgetauscht (CIC-5 AAE_A). Diese Substitutionen sollten ausreichend sein um das Motiv zu zerstören. Für ein weiteres Konstrukt wurde nur der Tyrosin-Rest ausgetauscht (Y672E), da im Falle von ENaC dieser Rest innerhalb des PY Motivs den größten Effekt auf die Stromamplitude hatte (Firsov *et al.*, 1996; Schild *et al.*, 1996). Die cRNAs dieser Mutanten und des Wildtyps wurden in *Xenopus* Oozyten injiziert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb.4.12. zusammengefaßt.

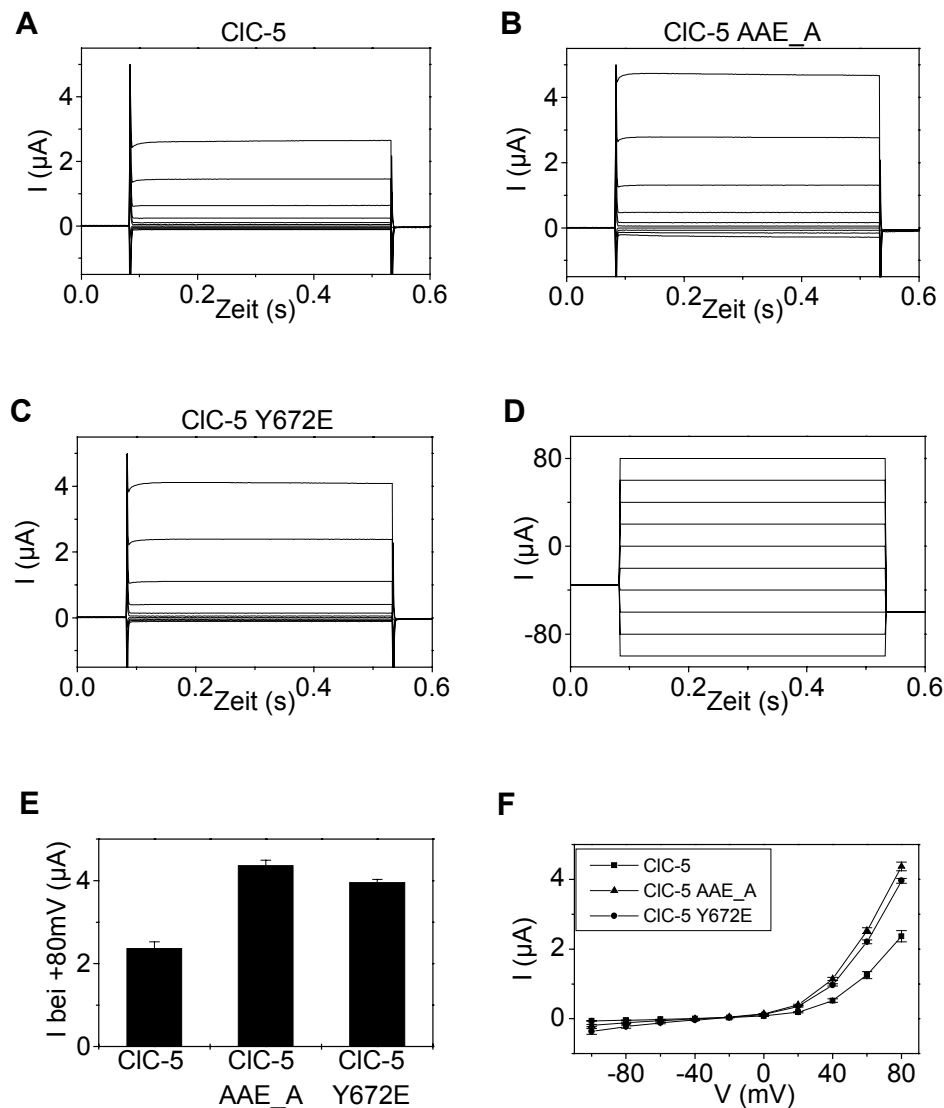


Abbildung 4.12: Elektrophysiologische Analyse der PY Motiv Mutanten von CIC-5. In (A) (B) und (C) sind typische Stromkurven zu sehen, die erhalten wurden, wenn die *Xenopus* Oozyten zwei bis drei Tage nach Injektion mittels TEVC analysiert wurden. In (A) ist CIC-5, in (B) CIC-5 AAE_A und in (C) CIC-5 Y672E zu sehen. (D) zeigt schematisch das Spannungsprotokoll, das angewandt wurde, um die CIC-5 vermittelten Ströme zu analysieren. In (E) sind zur besseren Veranschaulichung nur die Stromamplituden bei +80mV dargestellt und in (F) die I/V Diagramme, die wie in (E) einen Mittelwert von mindestens sechs Oozyten repräsentieren.

In Abb.4.12.A,B und C sind typische Stromkurven von ClC-5 und den beiden untersuchten Mutanten zu sehen. Sowohl die Mutante, die das PY Motiv komplett zerstört, als auch die Substitutionsmutante Y672E änderten nicht die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals, wie z.B. die starke Auswärtsgleichrichtung und die sehr schnelle Aktivierung des Chloridstroms. Der einzig erkennbare Unterschied war, daß diese Mutationen eine Erhöhung der Stromamplitude um einen Faktor von ca. 2 zur Folge hatten. In Abb.4.12.E und F sind die Ergebnisse der elektrophysiologischen Analyse verschiedener cRNA- und Oozyten-Präparationen zusammengefaßt. Zur besseren Veranschaulichung der Größe der Stromzunahme sind in E nur die Stromamplituden bei +80mV dargestellt, wobei in dem I/V Diagramm (F) deutlich zu sehen ist, daß sich nichts an den oben genannten biophysikalischen Eigenschaften des Kanals änderte, wenn Aminosäureaustausche innerhalb des PY Motiv vorgenommen wurden. In einigen Oozyten-Präparationen wurde bei den PY Motiv Mutanten ein bei -80mV langsam aktivierender einwärts-gerichteter Chloridstrom gemessen, der aber nicht die Ionenselektivität der ClC-Familie ($\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$) besaß und auch nicht eingehender analysiert wurde.

4.2.2 Messung der Oberflächenexpression

Um zu untersuchen, ob der Anstieg des Stroms für die beiden PY Motiv Mutanten durch eine erhöhte Anzahl von Kanälen in der Plasmamembran erklärt werden kann, wurde (wie auch für KCNQ2 und KCNQ3 in Kapitel 4.1.3) ein HA-Epitop in eine extrazelluläre Domäne von ClC-5 und den beiden Mutanten eingesetzt. ClC-5 hat zwei extrazelluläre Domänen, die für eine Insertion eines HA-Epitops in Frage kamen, nämlich zwischen D1 und D2 und zwischen D8 und D9. Der Bereich zwischen D3 und D5 wurde nicht gewählt, da die Lokalisation dieser Transmembrandomänen sehr kontrovers diskutiert wird (Fahlke *et al.*, 1997; Schmidt-Rose *et al.*, 1997). Die Insertion an dieser Stelle hätte vermutlich einen Effekt auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals bzw. eine Fehlfaltung des Proteins zur Folge gehabt.

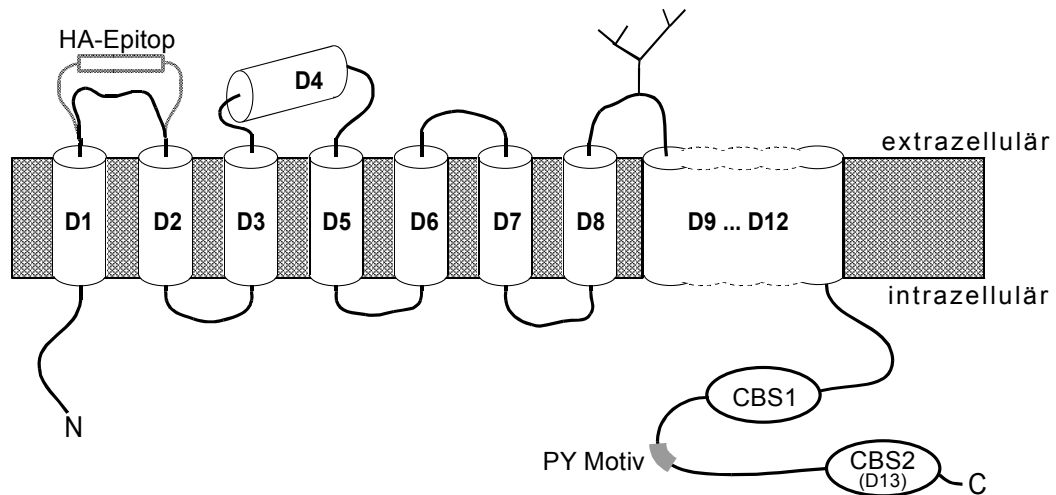


Abbildung 4.13: Topologie Modell des CIC-5 Kanals. Das Topologie Modell von CIC-5 zeigt die Stelle in der das HA-Epitop eingefügt wurde, um die Oberflächenexpression zu messen. Das PY Motivs ist grau unterlegt.

Wie in Abb.4.13 schematisch gezeigt, wurde das HA-Epitop in die große extrazelluläre Domäne zwischen D1 und D2 (zwischen den Aminosäuren 107 und 108) eingefügt. Von einer Insertion des Epitopes zwischen D8 und D9 wurde abgesehen, da sich hier (Abb.4.13) eine Glykosylierungsstelle befindet, deren Oligosaccharid mit der Antikörperbindung interferieren könnte. Diese HA-markierten Konstrukte ergaben in *Xenopus* Oozyten Ströme, die nicht von dem Wildtyp Kanal zu unterscheiden waren (Abb.4.14).

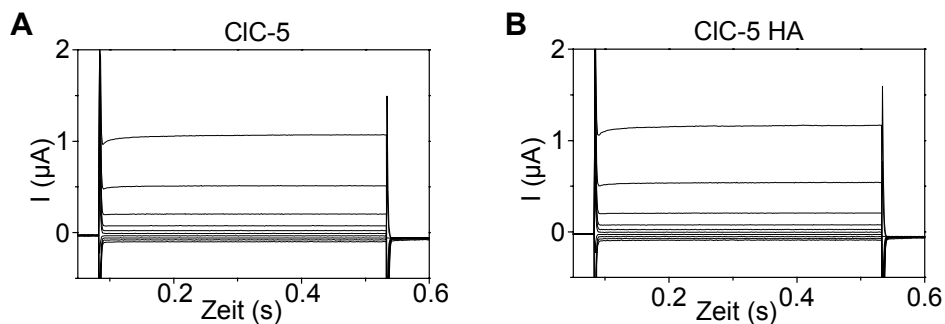


Abbildung 4.14: Elektrophysiologische Analyse des HA-markierten CIC-5. Typische Stromkurven von CIC-5 (A) und CIC-5 HA (B) sind dargestellt. Das Einfügen anderer Epitope (FLAG oder Myc) an die gleiche Stelle änderte die Kanaleigenschaften ebenfalls nicht (Daten nicht gezeigt).

Die Menge an HA-Epitop an der Zelloberfläche wurde wie bereits beschrieben (Kapitel 4.1.3) quantifiziert. In Abb.4.15.A ist die Oberflächenexpression der

beiden HA-markierten PY Motiv Mutanten und dem HA-markierten CIC-5 zu sehen, die sehr gut mit den gemessenen Strömen in Abb.4.12 übereinstimmen.

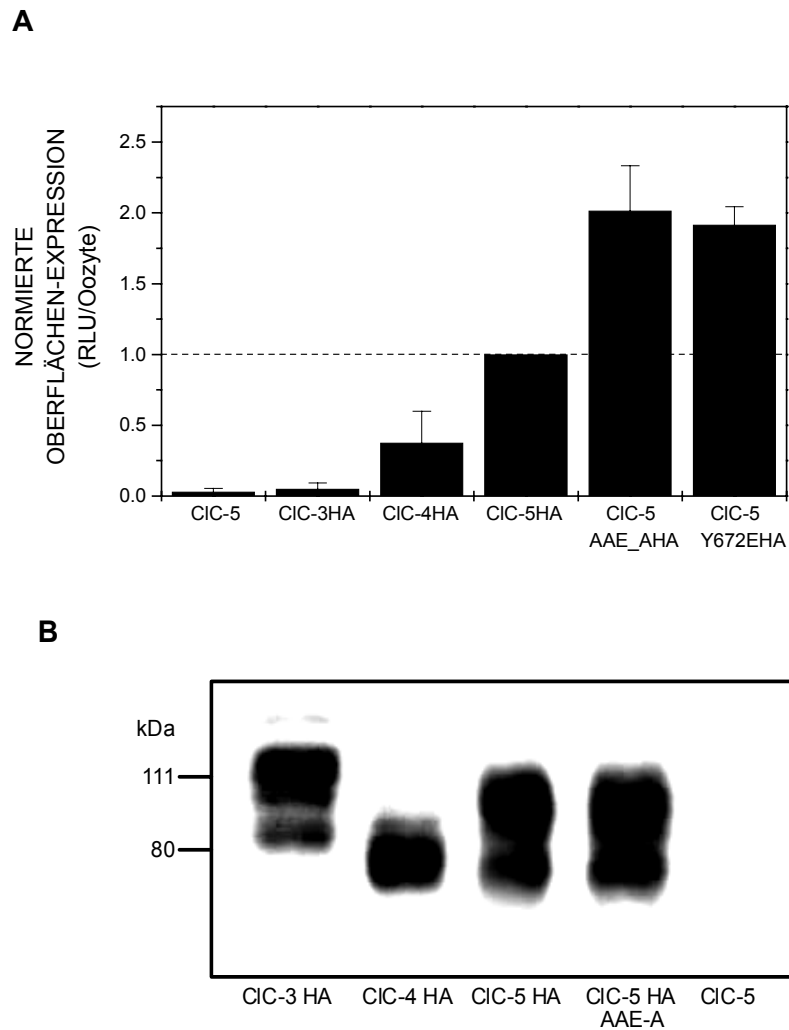


Abbildung 4.15: Oberflächenexpression von CIC-3, CIC-4, CIC-5 und den PY Motiv Mutanten. Die Oberflächenexpression von HA-markierten CIC-3, CIC-4, CIC-5 und den beiden PY Motiv Mutanten ist in (A) dargestellt. Oozyten, die mit nicht-markierten CIC-5 injiziert wurden, dienten als Negativkontrolle. Die Werte für die Oberflächenexpression wurden auf CIC-5 HA normiert (gestrichelte Linie), um verschiedene Präparationen von Oozyten miteinander vergleichen zu können. Insgesamt sind drei verschiedene Oozyten und cRNA Präparationen zusammengefaßt, bei denen mindestens fünf Oozyten pro Konstrukt analysiert wurden. Die Oberflächenexpression korreliert mit den Stromamplituden, die bei +80mV gemessen werden konnten. Die Oozyten, die zur Bestimmung der Oberflächenexpression genutzt wurden, wurden für jedes Konstrukt (außer CIC-5 HA Y672E) und für jede Oozytenpräparation zusammengefaßt und hinsichtlich der Expression von HA-markierten Proteinen mittels *Western-Blot* analysiert (B).

Die Oberflächenexpression der HA-markierten PY Motiv Mutanten war ungefähr zweimal so groß wie die vom HA-markierten CIC-5. In diese Untersuchungen wurden die HA-markierten CIC-3 und CIC-4 Kanäle mit einbezogen. Epitop-freier CIC-5 diente als Negativkontrolle. Wie in Abb.4.15.A dargestellt, konnte

keine Oberflächenexpression für den HA-markierten CIC-3 Kanal gemessen werden. Für den HA-markierten CIC-4 Kanal wurde die Oberflächenexpression ungefähr auf ein Drittel der für HA-markierten CIC-5 bestimmt.

Ähnlich wie CIC-5 war HA-markierter CIC-4 elektrophysiologisch in *Xenopus* Oozyten nicht von nicht-markierten CIC-4 zu unterscheiden (Abb.4.16).

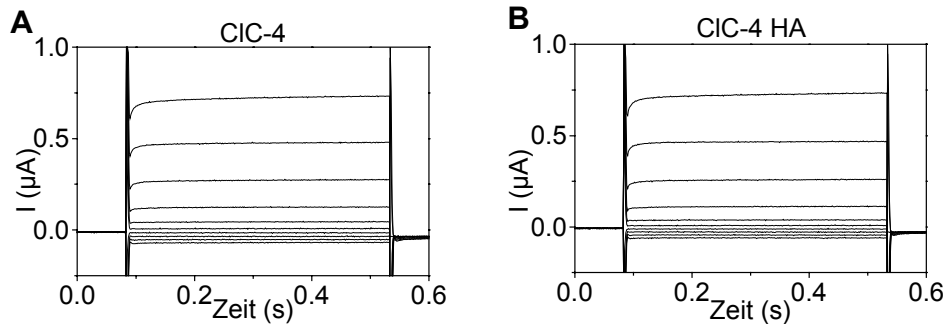


Abbildung 4.16: Elektrophysiologische Analyse des HA-markierten CIC-4. Typische Stromkurven von CIC-4 (A) und CIC-4 HA (B) sind dargestellt.

Auch in diesem Kanal scheint das Einfügen des Epitops keinen Einfluß auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals zu haben. Bei CIC-3 war es unmöglich diesen Vergleich in *Xenopus* Oozyten anzustellen, da selbst nicht-markierter CIC-3 in diesem Expressionssystem keine Chloridströme induziert. Um zu zeigen, daß HA-markierter CIC-3 tatsächlich in den analysierten Oozyten exprimiert wurde (und um auszuschließen, daß die PY Motiv Mutanten nicht nur effizienter translatiert werden), wurde die Gesamtmembranproteinexpression der Oozyten, die für den Oberflächenexpressionssay benutzt wurden, im *Western-Blot* analysiert. Das Ergebnis (Abb.4.15.B) zeigt deutlich, daß die AAE_A Motiv Mutante, die das gesamte PY Motiv zerstört, in gleicher Menge wie CIC-5 exprimiert wurde. Weiterhin ist zu sehen, daß CIC-5 und die AAE_A Mutante eine Doppelbande erzeugen, die zwischen 80kDa und 100kDa im Proteingel läuft. Bei HA-markierten CIC-4 hingegen ist nur eine Bande zu erkennen, wobei bei HA-markierten CIC-3 wieder eine Doppelbande zu sehen ist, die ein etwas größeres apparentes Molekulargewicht aufweist.

Als einfache Erklärung für den Anstieg des Stroms der beiden PY Motiv Mutanten hätte eine Tyrosin-Phosphorylierung herangezogen werden können. In Mutationsanalysen wird häufig ein Glutamat eingefügt, um die negative Ladung, die durch eine Phosphorylierung an einem Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest im

Protein entsteht, nachzuahmen. Es wurde deswegen neben der Y672E auch die Y672A Mutante in *Xenopus* Oozyten analysiert. Dabei wurde kein Unterschied in der Größe der Ströme und den elektrophysiologischen Eigenschaften gegenüber Y672E gemessen (Daten nicht gezeigt). Da bei der AAE_A Mutante, die die drei Prolinaustausche und den Tyrosinaustausch trägt, der größten Effekt auf den Strom und die Oberflächenexpression gemessen wurde, wurden die nachfolgenden Untersuchungen nur mit dieser Mutante durchgeführt.

4.2.3 Bestimmung der Halbwertszeit von CIC-5 an der Zelloberfläche

Eine mögliche Erklärung für den Anstieg des Stroms bei Mutanten im PY Motiv ist eine längere Verweildauer der mutierten Kanäle in der Plasmamembran. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden *Xenopus* Oozyten mit cRNA von CIC-5 und der AAE_A Mutante injiziert. Nach drei bis vier Inkubationstagen erreichten CIC-5 vermittelte Ströme ihre maximale Größe (Abb.4.17) und kein weiterer Anstieg des Stroms für CIC-5 und der CIC-5 AAE_A Mutante war meßbar (Abb.4.17).

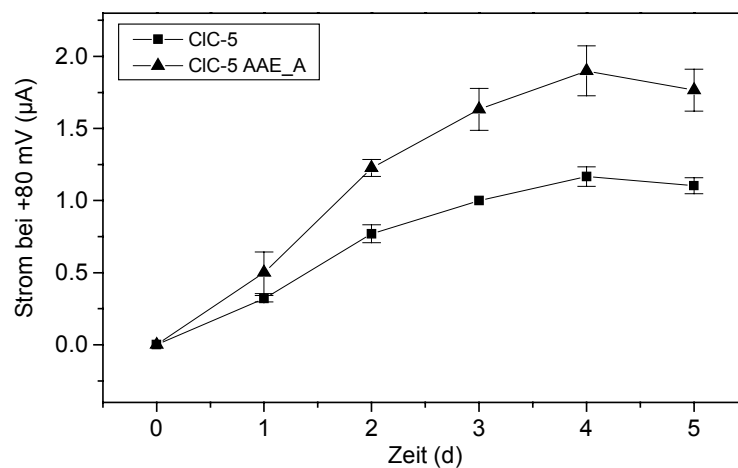


Abbildung 4.17: Zeitverlauf der CIC-5 Expression und der CIC-5 AAE_A Mutante. Insgesamt sind in dieser Abbildung drei Experimente mit verschiedenen *Xenopus* Oozyten und cRNA Präparationen zusammengefaßt. Dazu wurden die Ströme aus den jeweiligen Experimenten auf den CIC-5 Strom am Tag 3 nach Injektion der cRNA normiert. Für jeden Zeitpunkt und jedes Konstrukt wurden mindestens sechs Oozyten gemessen. In diesem Diagramm sind die Stromamplituden bei +80mV gegen die Zeit aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ein Teil der Oozyten wurde am dritten Tag nach cRNA Injektion in Brefeldin A (BFA) haltiges Barth Medium transferiert, um die Insertion neu synthetisierter Kanäle in die Plasmamembran zu verhindern. BFA ist ein Pilzmetabolit, welcher den anterograden Transport von Vesikeln vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat verhindert, wobei der retrograde Transport immer noch stattfindet. Das hat zur Folge, daß das ER und der Golgi-Apparat miteinander verschmelzen und kein Transport von neu-synthetisierten Proteinen zu den verschiedensten Zellkompartimenten und zur Plasmamembran mehr stattfindet (Pelham, 1991). Obwohl BFA an vielen Stellen in die vesikulären Transportprozesse innerhalb der Zelle eingreift, hat es keinen Effekt auf die *Clathrin*-vermittelte Endozytose an der Plasmamembran (Pelham, 1991). Es wurde schon gezeigt, daß BFA in *Xenopus* Oozyten ebenfalls aktiv ist, und daß mit dieser Substanz die Halbwertszeiten von Kanalproteinen in der Plasmamembran bestimmt werden können (Shimkets *et al.*, 1997). Durch die Inhibition der Auslieferung neu-synthetisierter Kanäle in die Plasmamembran konnte die Abnahme der Kanalaktivität von Wildtyp und mutierten Kanälen in der Plasmamembran durch Messen der CIC-5 Ströme verfolgt werden. Abb.4.18 zeigt den Effekt von BFA auf die Ströme von CIC-5 und der AAE_A Mutante.

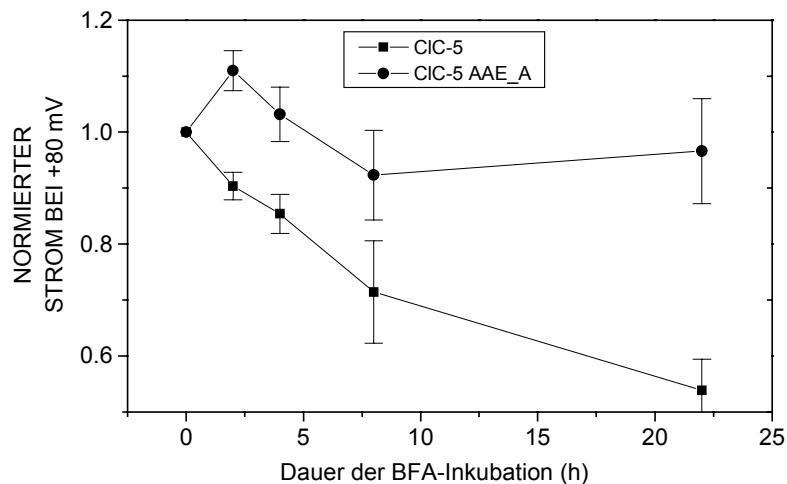


Abbildung 4.18: Effekt von Brefeldin A auf die Kanalaktivität von CIC-5 und der CIC-5 AAE_A Mutante. Drei Tage nachdem die cRNA der beiden Konstrukte in *Xenopus* Oozyten injiziert worden war, wurden die Oozyten in BFA-haltiges (10µg/ml) Barth Medium überführt. Mindestens sechs Oozyten wurden für jeden Zeitpunkt für drei verschiedene Oozyten Präparationen gemessen und die erhaltenen Stromamplituden bei +80mV auf die für die beiden Konstrukte beim Zeitpunkt t=0 normiert. Die Ergebnisse der drei Experimente sind hier zusammengefaßt, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen.

Es ist deutlich zu sehen, daß der von CIC-5 vermittelte Strom nach Zugabe von BFA über eine Zeit von 22 Stunden fortschreitend abfällt. Dagegen bleibt der von der AAE_A Mutante über diese Zeit annähernd konstant, wenn man den Anstieg nach 2h und den anschließenden Abfall außer acht läßt. Für CIC-5 konnte der Zeitverlauf sehr gut einer einfachen exponentiellen Gleichung angepaßt werden, wodurch sich die Halbwertszeit der Kanäle in der Plasmamembran auf 23 ± 3 h berechnen ließ. Für die AAE_A Mutante beschreibt eine monoexponentielle Funktion den Zeitverlauf nicht zufriedenstellend.

Eine signifikante Abnahme der Kanalexpression konnte im Zeitbereich der Messungen für die AAE_A Mutante nicht festgestellt werden (Abb.4.18), weswegen die Angabe eines Zahlenwertes für die Halbwertszeit der AAE_A Mutante keinen Sinn macht. Die Verweildauer der AAE_A Mutante in der Plasmamembran ist jedoch in jedem Fall als wesentlich größer als für den Wildtyp anzusetzen.

4.2.4 Bestimmung der Halbwertszeit durch pulse-chase Experimente

Die Halbwertszeiten von Proteinen werden auch häufig durch sogenannte *pulse-chase* Experimente bestimmt. In dieser Methode werden Zellen, die die zu untersuchenden Konstrukte entweder transient oder stabil exprimieren in Methionin- und/oder Cystein-freiem Medium ausgehungert und danach bei 37°C in einem Medium inkubiert, das radioaktiv (^{35}S) markiertes Methionin und/oder Cystein enthält. Dieser Schritt wird als *pulse* bezeichnet, dabei werden sämtliche Proteine, die in dieser Zeit synthetisiert werden, radioaktiv markiert, sofern sie Methionine oder Cysteine enthalten. In den Versuchen dieser Arbeit wurden die Zellen 30min mit radioaktivem Methionin inkubiert, um sicherzustellen, daß ausreichend Protein radioaktiv markiert wurde. Diese Inkubationszeit erscheint auf dem ersten Blick sehr lang, weil es Proteine gibt, die in dieser Zeit schon wieder abgebaut werden. Da aber die Halbwertszeit von CIC-5 aus Kapitel 4.2.3 zumindest in *Xenopus* Oozyten als viel größer als 30min anzusetzen ist, ist die Menge an Protein, die während des *pulse* Schrittes schon wieder degradiert wird, als niedrig zu betrachten. Ferner ist bei diesem Experiment eine längere Halbwertszeit von CIC-5 als in den BFA Experimenten zu erwarten, da in diesem Fall das Protein, das noch im ER und dem Golgi-Apparat prozessiert wird zur

Verlängerung der Halbwertszeit beiträgt. Allerdings ist dieser Effekt um so stärker zu vernachlässigen, je länger die Halbwertszeit des Proteins ist, welches untersucht wird.

Für diese Experimente wurden mit CIC-5 und CIC-5 AAE_A stabil transfizierte Säugetierzellen (CHO K1) hergestellt, um Probleme mit unterschiedlichen Transfektionseffizienzen auszuschließen. Die verwendeten CHO K1 CIC-5 Wildtyp und CIC-5 AAE_A Mutante exprimierenden Zellen wurden nach der Expressionsstärke der Proteine (bestimmt durch *Western-Blot* Analyse) ausgewählt. Diese sollten gleich groß sein, um einen Vergleich der Halbwertszeiten zuzulassen. Nach dem *pulse* werden die Zellen mit frischem, nicht radioaktiv markiertem Medium versetzt und verschiedenen lange Zeiten bei 37°C inkubiert (*chase*). Während dieser Zeit unterliegen die zuvor synthetisierten Proteinmoleküle ihrem normalen Metabolismus in der Zelle und werden nach und nach degradiert. Ein Ergebnis dieser Analyse ist in Abb.4.19.A dargestellt.

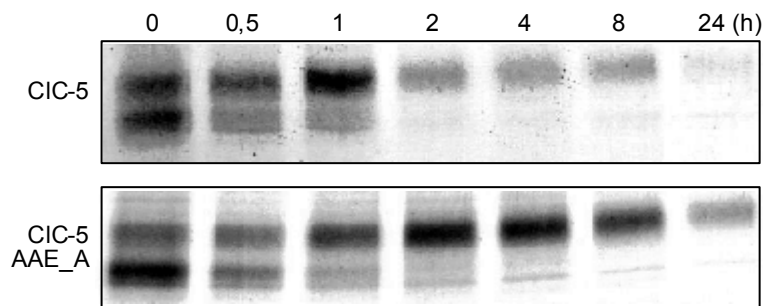
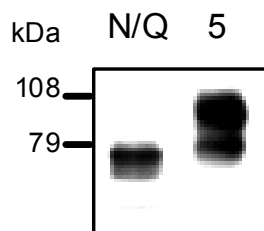
A**B**

Abbildung 4.19: Bestimmung der Halbwertszeit von CIC-5 und der AAE_A Mutante durch *pulse-chase* Experimente. Abgebildet sind die Ergebnisse eines *pulse-chase* Experimentes mit stabil transfizierten CHO K1 Zellen (A). Die Immunpräzipitation des radioaktiv markierten CIC-5 oder der AAE_A Mutante fand nach den angegebenen Zeiten mit dem Antikörper 5A2 statt, der gegen ein N-terminales Peptid gerichtet ist. Teil (B) zeigt die *Western-Blot* Analyse zweier CHO K1 Zellsate, die mit der Glykosylierungsmutante N408Q oder CIC-5 Wildtyp transient transfiziert worden waren. Zur Detektion wurde in diesem Fall ebenfalls der 5A2 Antikörper eingesetzt.

Wie deutlich zu sehen ist, besitzt CIC-5 eine verhältnismäßige lange Lebensdauer, selbst nach 24h war sowohl für den Wildtyp, als auch für die AAE_A Mutante noch Protein nachweisbar. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den im vorherigem Abschnitt erhaltenen Ergebnissen. Die Signale für die AAE_A Mutante sind über einen längeren Zeitraum sehr viel intensiver als die für den Wildtyp, wobei die Signale für beide Klone beim Zeitpunkt null ungefähr gleich groß erscheinen (fast man beide Banden zusammen). Dies deutet darauf hin, daß die AAE_A Mutante eine verlängerte Halbwertszeit hat und bestätigt die Experimente in Kapitel 4.2.5. Dennoch wurde von einer Quantifizierung wie in Kapitel 4.2.5 abgesehen, da dies hier mit vielen Unsicherheitsfaktoren behaftet wäre, wie z.B. die Ausbeute der Immunpräzipitation, die Menge der eingesetzten Zellen, die Vollständigkeit des Einbaus radioaktiver Aminosäuren, usw. Das in Abb.4.19.A gezeigte Experiment gibt aber einen wichtigen Einblick in den Reifungsprozeß des Ionenkanals. Bei der unteren der beiden Bande, die bei den Zeitpunkten 0, 0,5 und 1h zu sehen sind, handelt es sich vermutlich um gerade am ER synthetisierten CIC-5, der noch nicht vollständig glykosyliert ist. Da diese Bande mit der Zeit schwächer wird und die Intensität sich offensichtlich zu höherem Molekulargewicht verschiebt, ist davon auszugehen, das CIC-5 das ER verläßt, im Golgi-Apparat vollständig glykosyliert wird und so an der Plasmamembran erscheint. Um diesen Reifungsprozeß näher zu untersuchen, wurde eine CIC-5 Glykosylierungsmutante (N408Q) hergestellt. Heterologe Expression dieser Mutante in *Xenopus* Oozyten ergab nur noch die Hälfte der Stromamplitude des Wildtyps (Daten nicht gezeigt). In der *Western-Blot* Analyse von transient mit CIC-5 N408Q transfizierten CHO K1 Zellen in Abb.4.19.B ist aber deutlich nur eine Bande zu sehen, die sogar ein noch kleineres Molekulargewicht besitzt, als die untere in Abb.4.19.B für Wildtyp CIC-5. Bei der unteren Wildtyp Bande handelt es sich somit vermutlich um das Kanalprotein, das die innere Kernregion (*core region*) der Polysaccharidkette trägt, die es während der Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum angeheftet bekommt.

Bemerkenswert bei dem *pulse-chase* Experiment ist zusätzlich die untere Bande der CIC-5 AAE_A Mutante beim Zeitpunkt Null. Diese scheint noch intensiver zu sein, als die des Wildtyps zu diesem Zeitpunkt. Unter der Annahme, daß die BFA-induzierte Inhibition des Proteintransportes vom ER zum Golgi-Apparat noch nicht vollständig ist, könnte so der Anstieg des Stroms am Zeitpunkt 2h in

Abb.4.18 für die AAE_A Mutante erklärt werden, wenn man berücksichtigt, daß die AAE_A Mutante nicht so schnell internalisiert wird wie der Wildtyp. Dieser mögliche Zusammenhang müßte allerdings durch weitere *pulse-chase* Experimente näher untersucht werden.

4.2.5 Koexpressionsstudien mit Dynamin

Nach den Ergebnissen aus dem Kapitel 4.2.3 verbleibt die AAE_A Mutante längere Zeit in der Plasmamembran. Aber welcher Mechanismus veranlaßt die Internalisierung von ClC-5 ? Eine Möglichkeit stellt die *Clathrin*-vermittelte Endozytose dar, die wie in anderen Studien gezeigt wurde (Damke *et al.*, 1994; Shimkets *et al.*, 1997) durch Koexpression einer dominant-negativen Dynamin Mutante (K44E) inhibiert werden kann. Um zu überprüfen, ob diese Mutante einen Einfluß auf die ClC-5 vermittelten Ströme hat, wurde die cRNA dieser Mutante in *Xenopus* Oozyten mit ClC-5 und der AAE_A Mutante koexprimiert. Überraschenderweise wurden für alle *Xenopus* Oozyten, denen die dominant-negative Dynamin Mutante K44E injiziert wurde, Ströme gemessen, die keine ClC-5 Charakteristik aufwiesen. Diese Ströme zeigten eine langsamere Aktivierungskinetik bei depolarisierenden Spannungen als ClC-5 und zeichneten sich durch eine von der CLC-Familie abweichende Ionenselektivität ($I^+ > Cl^-$) aus. Zusätzlich waren diese Ströme auch messbar, wenn Dynamin K44E allein exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Um sicherzustellen, daß es sich bei den beobachteten Signalen tatsächlich nicht um ClC-5 vermittelte Ströme handelte, wurden folgende Koexpressionsstudien durchgeführt. Dazu wurde eine ClC-5 Mutante E221A mit der Dynamin-Mutante K44E koinjiziert, die eine vom Wildtyp stark unterschiedliche Spannungsabhängigkeit aufweist (Friedrich *et al.*, 1999). Die ClC-5 E221A Mutante vermittelt Ströme bei hyperpolarisierenden Spannungen, bei denen der durch die Dynamin-Mutante K44E vermittelte endogene Strom nicht auftritt. Die Ergebnisse dieser Koexpressionsstudien sind in Abb.4.20 zusammengefaßt.

Es ist deutlich zu sehen, daß Dynamin und die Dynamin Mutante K44E bei der hier aufgetragenen Spannung von -160mV kaum messbare Ströme in *Xenopus* Oozyten induzierten.

Es ist aber offensichtlich, daß die Dynamin Mutante K44E den CIC-5 E211A vermittelten Strom inhibiert. Dynamin Wildtyp hat nur einen kleinen Effekt auf diesen Strom, verglichen mit dem Strom, der in *Xenopus* Oozyten gemessen wurde, die nur mit CIC5 E211A injiziert wurden. Die CIC-5 E211A Expression in der Plasmamembran scheint durch Koexpression mit der dominant-negativen Dynamin Mutante eher inhibiert zu werden, statt wie erwartet zu steigen. Des weiteren deutet das Auftreten großer endogener Stromsignale auf eine massive Veränderung im Stoffwechsel der Plasmamembranproteine hin, deren Ursache unklar ist. Deshalb ist die Methode unbrauchbar zur Untersuchung der *Clathrin*-Hypothese.

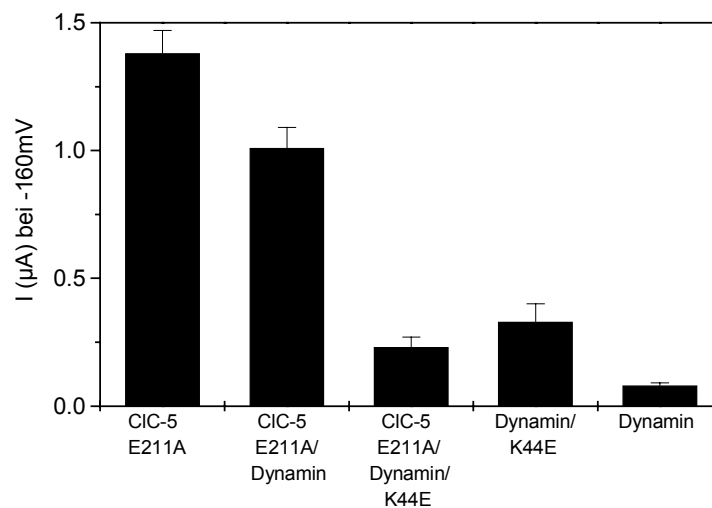


Abbildung 4.20: Koexpression von CIC-5 E211A mit Dynamin und einer dominant-negativen Dynamin Mutante. Zusammenfassung der Ergebnisse der Koexpression von CIC-5 E211A mit Dynamin Wildtyp und der dominant-negativen Mutante K44E, die die GTPase-Aktivität von Dynamin zerstört.

4.2.6 Koexpressionsstudien mit rab5

In einer früheren Studie wurde gezeigt, daß CIC-5 in transient transfizierten COS7 und MDCK-Zellen mit der GTPase-defizienten rab5 Q79L Mutante kolokalisiert (Günther *et al.*, 1998; Devuyt *et al.*, 1999). Rab5 gilt als Indikator für frühe Endosomen (Stenmark *et al.*, 1994). Ferner ist für rab5 und rab5 Q79L in *Xenopus* Oozyten gezeigt worden, daß sie die Endozytose von HRP (*horse radish peroxidase*) verstärken, wobei die dominant-negative rab5 Mutante S34N diese Art der Endozytose inhibiert (Mukhopadhyay *et al.*, 1997). Um den Effekt einer

veränderten Endozytoserate auf die CIC-5 vermittelten Ströme zu untersuchen, wurde CIC-5 und die AAE_A Mutante mit den oben genannten rab5 Konstrukten in *Xenopus* Oozyten koexprimiert. Die Ergebnisse dieser Koexpressionsstudien sind in Abb.4.21 zusammengefaßt.

Koexpression von CIC-5 mit rab5 und rab5 Q79L führt zu einer Verminderung der CIC-5 vermittelten Ströme auf Hintergrundniveau. Die Koexpression der dominant-negativen rab5 S34N Mutante rief hingegen eine Erhöhung des Stroms im Vergleich zu CIC-5 Wildtyp hervor (Abb.4.21.A).

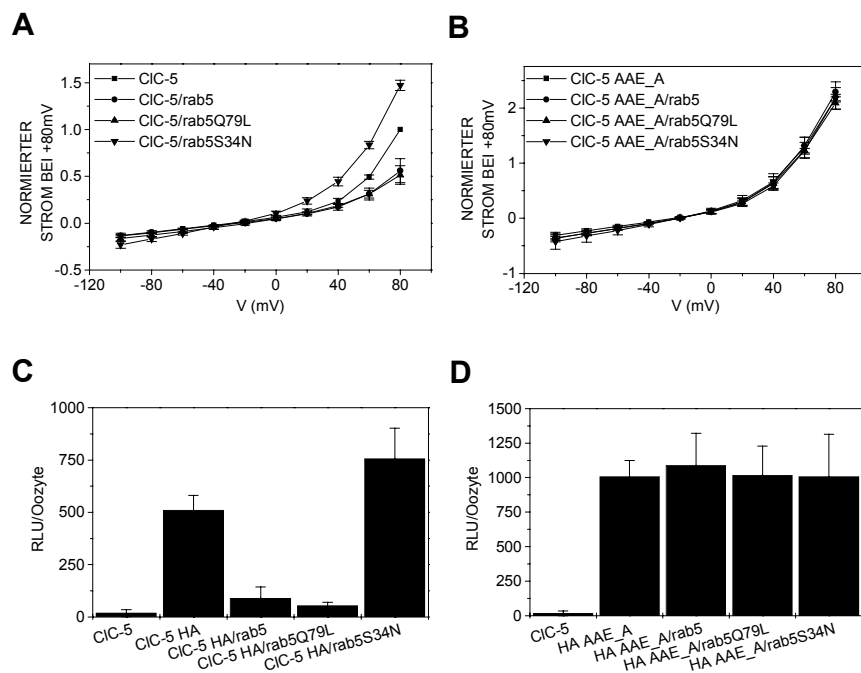


Abbildung 4.21: Koexpression von CIC-5 und der CIC-5 AAE_A Mutante mit mehreren rab 5 Konstrukten. Vergleich der Strom-Spannungs Kurven, die erhalten wurden, wenn CIC-5 alleine oder mit rab5, rab5 Q79L oder rab5 S34N exprimiert wurde. (A) Koexpression der dominant-negativen rab5 S34N Mutante führte zu einem Anstieg des CIC-5 vermittelten Stroms fast auf das Niveau der AAE_A Mutante. rab5 und rab5 Q79L dagegen verminderten den Strom auf Hintergrundniveau. Diagramm (B) zeigt das gleiche Experiment für die AAE_A Mutante. In den beiden I/V Diagrammen sind drei verschiedene Oozyten und cRNA Präparationen zusammengefaßt, wobei für jedes Konstrukt mindestens fünf Oozyten gemessen wurden. Um einen Vergleich der drei Präparationen zu ermöglichen, wurden die Ströme auf die Stromamplitude von CIC-5 bei +80mV normiert. In (C) und (D) sind die Ergebnisse der Analyse der Oberflächenexpression HA-markierter CIC-5 und der CIC-5 AAE_A Mutante allein und koexprimiert mit den rab5 Konstrukten zu sehen.

Die Stromamplituden der CIC-5 AAE_A Mutante wurden nicht durch die Koexpression mit den rab5 Konstrukten beeinflusst. Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in den Strömen durch eine veränderte Zahl von Kanälen an der Zelloberfläche hervorgerufen wurde, wurden *Xenopus* Oozyten, die die Kanäle mit den rab5 Konstrukten koexprimierten mit der Oberflächenexpressionsmethode

untersucht (Abb.4.21.C und D). Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Oberflächenexpression von CIC-5 Wildtyp durch die Koexpression von rab5 oder der rab5 Mutante Q79L vermindert wurde. Die dominant-negative rab5 S34N Mutante hingegen erhöht die Oberflächenexpression des Wildtyps fast auf das Niveau der AAE_A Mutante, die von diesen rab5 Koexpressionen nicht beeinflusst wurde. Das deutet daraufhin, daß CIC-5 durch Endozytose aus der Plasmamembran entfernt wird. Die CIC-5 AAE_A Mutante wird nicht mehr in gleicher Weise reguliert. Die Internalisierung von CIC-5 hängt demnach von dem PY Motiv ab.

4.2.7 Koexpressionsstudien mit WWP2

Als nächstes wurde der Effekt von WWP2 und defizienten Konstrukten (Abb.4.23) dieses Proteins auf CIC-5 Wildtyp und die AAE_A Mutante untersucht. WWP2 weist große Ähnlichkeit mit Nedd4 auf und zählt wie dieses zur Familie der Ubiquitin-Protein Ligasen. Wie alle Mitglieder dieser Familie besitzt WWP2 eine N-terminale C2-Domäne, mehrere (vier) WW-Domänen und eine C-terminale HECT-Domäne. Es konnte gezeigt werden, daß die vierte WW-Domäne mit hoher Affinität an ein synthetisches Peptid bindet, welches das PY Motiv von CIC-5 umfaßte (Pirozzi *et al.*, 1997). Um zu überprüfen, ob diese biochemische Interaktion von physiologischer Bedeutung sein könnte, wurde zunächst die Gewebsverteilung von WWP2 untersucht. Das Ergebnis dieser *Northern-Blot* Analyse ist in Abb.4.22 zu sehen.

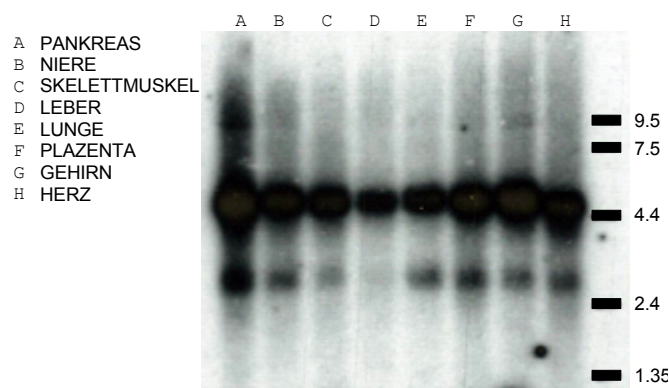


Abbildung 4.22: Northern-Blot Analyse der Gewebsverteilung von WWP2. Zur Bestimmung der Gewebsverteilung wurde aus dem gesamten offenen Leserahmen der cDNA des WWP2 Proteins die radioaktive Sonde gewonnen und auf eine Membran hybridisiert, auf der Poly(A+) RNAs verschiedener Gewebe der Größe nach aufgetrennt worden waren (CLONTECH). Der Größenstandard ist in kb angegeben.

Die Expression des WWP2 Proteins konnte in allen getesteten humanen Geweben nachgewiesen werden, insbesondere in der Niere, dem menschlichen Gewebe, in dem CIC-5 fast ausschließlich vorkommt.

Die Domänenstruktur von WWP2 ist in Abb.4.23 schematisch dargestellt. Bei der N-terminalen C2-Domäne handelt es sich um eine Kalzium-abhängige Phospholipid-Bindungsdomäne (ein Kalzium-abhängiger „Membran-Anker“). Die vier WW-Domänen sind Protein-Protein Interaktionsdomänen, wobei diese an prolin-reiche Sequenzabschnitte binden. Die HECT-Domäne bindet ein Ubiquitin über einen konservierten Cysteinrest und vermittelt die Ubiquitin-Protein Ligase Aktivität dieser Proteinfamilie. Die in Abb.4.23 dargestellten defizienten WWP2 Konstrukte sollten nicht funktionell sein. Die Ubiquitin-Ligase Aktivität wurde allerdings nicht getestet. Um die von Pirozzi *et al.* (Pirozzi *et al.*, 1997) nachgewiesene biochemische Interaktion in einem elektrophysiologischen Ansatz zu überprüfen, wurden die in Abb.4.23 schematisch dargestellten WWP2 Konstrukte in *Xenopus* Oozyten mit CIC-5 und der AAE_A Mutante koexprimiert.

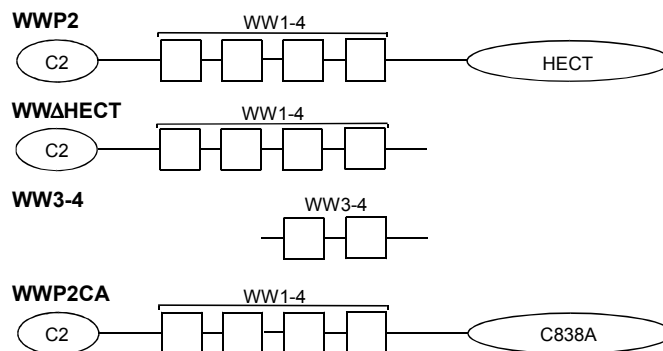


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung der WWP2 Konstrukte. C2 steht für die C2-Domäne, WW für die WW-Domänen und HECT für die HECT-Domäne.

Das Konstrukt WW Δ HECT besitzt keine HECT-Domäne, WW3-4 besteht ausschließlich aus den beiden letzten WW-Domänen (die vierte WW-Domäne besitzt die größte Affinität zum PY Motiv aus CIC-5) (Pirozzi *et al.*, 1997) und das dritte Konstrukt, WWP2CA, trägt eine Punktmutation in der HECT-Domäne, die zu einem Aminosäureaustausch von Cystein zum Alanin führt. Dadurch verliert das Protein die Fähigkeit Ubiquitin zu binden und damit seine

vermeintliche Ubiquitin-Protein Ligase Aktivität, wie es für Nedd4 gezeigt wurde (Huibregtse *et al.*, 1995; Abriel *et al.*, 1999). In Abb.4.24 sind die I/V-Diagramme der Koexpressionsstudien dieser Konstrukte mit CIC-5 und der AAE_A Mutante zu sehen.

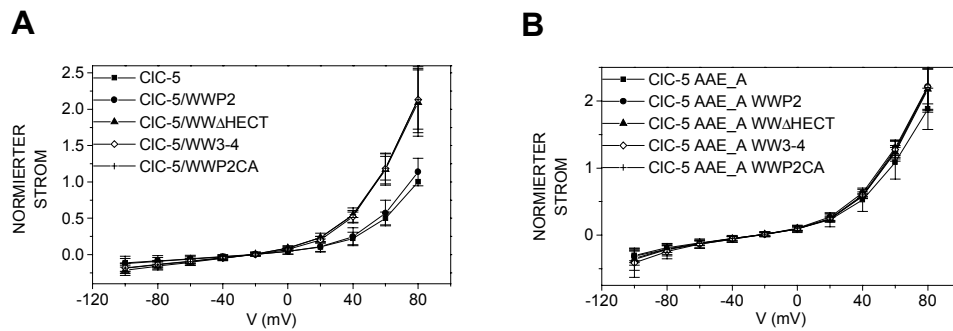


Abbildung 4.24: Ergebnisse der Koexpressionsstudien der WWP2 Konstrukte mit CIC-5 (A) und der CIC-5 AAE_A Mutanten (B). Es sind drei verschiedene *Xenopus* Oozyten und cRNA Präparationen zusammengefaßt und die Ströme auf die Stromamplitude von CIC-5 bei +80mV normiert.

Die Koexpression von WWP2 mit CIC-5 hat keinen Effekt auf die Ströme. Die Koexpression der drei defizienten WWP2 Konstrukte führte hingegen zu einem Anstieg der CIC-5 vermittelten Ströme um einen Faktor von ungefähr zwei (Abb.4.24.A). Kein Effekt wurde bei der AAE_A Mutante gemessen (Abb.4.24.B). Dies deutet darauf hin, daß die biochemische Interaktion zwischen den WW-Domänen des WWP2 Proteins und dem PY Motiv in CIC-5 auch den von CIC-5 vermittelten Strom beeinflusst, und daß diese Interaktion von einem intakten PY Motiv abhängt. Diese Ergebnisse zeigen, daß das WWP2 Protein ein möglicher Interaktionspartner von CIC-5 ist und es eine mögliche regulatorische Rolle für die Funktion dieses Chloridkanals in nativen Zellen haben könnte. Um sicher zu stellen, daß der Anstieg des in Abb.24.A beobachteten Stroms durch eine Erhöhung der Oberflächenexpression von CIC-5 hervorgerufen wird, wurde der HA-markierte CIC-5 Kanal und die AAE_A Mutante mit einem ausgewähltem nicht funktionellen WWP2 Konstrukt (WWP2CA) koexprimiert und die Oberflächenexpression nach der bereits beschriebenen Methode bestimmt.

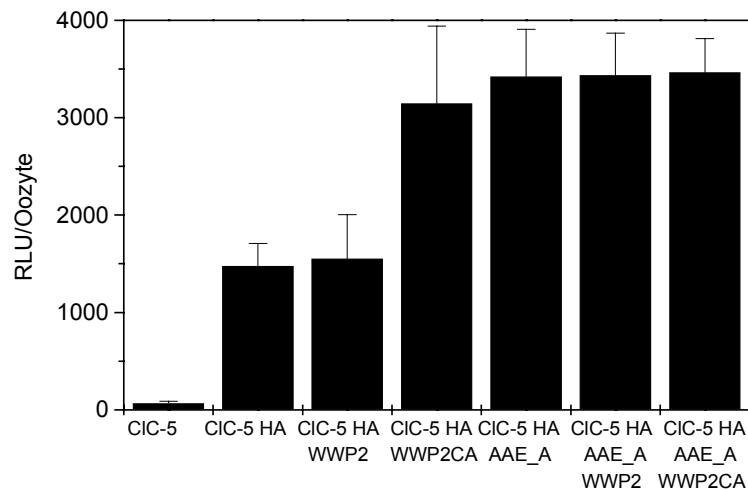


Abbildung 4.25: Oberflächenexpression von HA-markierten CIC-5 und der CIC-5 AAE_A Mutante mit einem ausgewähltem nicht-funktionellen WWP2 Konstrukt. In dieser Grafik ist nur eine *Xenopus* Oozyten Präparation gezeigt. (RLU entspricht *Relative Light Units*, N=5, Fehler ist als Standardabweichung angegeben)

Die Abb.4.25 zeigt deutlich, daß tatsächlich die Oberflächenexpression von HA-markiertem CIC-5 um einen Faktor von zwei erhöht wurde, wenn dieser mit dem Ligase-defizienten WWP2CA Konstrukt koexprimiert wurde. Für die AAE_A Mutante wurde keine Veränderung in der Oberflächenexpression registriert.

4.2.8 Identifizierung eines weiteren Internalisierungsmotivs

Da der Effekt der Mutationen innerhalb des PY Motivs von CIC-5 relativ klein ist (verglichen mit den Beobachtungen am ENaC), ist es wahrscheinlich, daß es sich bei dem PY Motiv nicht um das einzige Internalisierungsmotiv von CIC-5 handelt. Die meisten Internalisierungsmotive (siehe Kapitel 1.5.2) enthalten aromatische Aminosäuren, wie z.B. Tyrosin (Y) oder Phenylalanin (F), oder zwei Leucine (L) hintereinander. Um weitere Internalisierungsmotive in CIC-5 zu identifizieren, wurden verschiedene Y, F und L Aminosäuren in putativen Motiven mit den Konsensussequenzen Y(F)XXΨ (Ψ; „große“ hydrophobe Aminosäure), LL und YF in intrazellulären Bereichen des Kanals durch Alanine (A) mittels rekombinanter PCR ersetzt und in *Xenopus* Oozyten analysiert. Die Ergebnisse dieser Studie sind in folgender Tab.4.3 zusammengefaßt.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Analyse möglicher Internalisierungsmotive. Die Aminosäuresequenzen von CIC-5, die möglichen Internalisierungsmotiven entsprechen, sind in der ersten Spalte der Tabelle aufgeführt. Die zweite Spalte zeigt die eingefügten Aminosäureaustausche und die dritte die Auswirkungen auf den Strom, der in *Xenopus* Oozyten gemessen wurde.

Aminosäuresequenz (CIC-5)	Eingefügte Mutation	Auswirkung auf den Strom, verglichen mit Wildtyp CIC-5
616-YSGF-621	616-ASGF-621 616-YSGA-621	Beide Mutationen ergaben eine Reduktion des Stroms um ca. 60%
660-YF-663	660-AA-663	Anstieg des Stroms um ca. 300% (siehe Abb.4.26)
593-LL-596	593-AA-596	Kein Unterschied zum Wildtyp feststellbar
718-LL-721	718-LL-721	Kein Unterschied zum Wildtyp feststellbar
16-FNTID-22	16-FHTID-22 16-ANTRD-22	Reduktion des Stroms um 50% Kein Strom mehr meßbar

Es ist auffällig, daß nur ein Aminosäurepaar eine Erhöhung der Stromamplitude verursachte, was ein Hinweis für ein Internalisierungsmotiv ist. Alle anderen möglichen Motive haben entweder keinen Einfluß auf die Stromamplitude (LL-Motive) oder reduzieren die Stromamplitude (YSGF und FNTID). Die Aminosäuresequenz YSGF liegt mitten in der CBS1 Domäne im C-Terminus von CIC-5. Die Funktion der Domänen CBS1 und CBS2 in den CLC-Proteinen ist noch unbekannt (Ponting, 1997). Studien an CIC-1 weisen darauf hin, daß beide Domänen notwendig für die Kanalfunktion sind (Schmidt-Rose *et al.*, 1997). Mutationen innerhalb dieser Domänen könnten die dreidimensionale Struktur des Proteins zerstören und somit die Reduktion des Stroms für die YSGF Mutanten erklären. Aus diesem Grund wurden die YSGF Mutanten nicht weiter untersucht. Die Sequenz FNTID wurde ebenfalls nicht weiter analysiert, da die Mutation der kritischen Reste in diesem Motiv die Stromamplitude reduzierten. Um diesen Effekt zu erklären, bedarf es weitere Untersuchungen.

Nur das YF erfüllte das Kriterium für ein Internalisierungsmotiv. Dieses Motiv (Schweizer *et al.*, 2000) besteht aus den beiden Resten Y661 und F662, die sich zehn Aminosäuren vor dem kritischen Aminosäurerest Y672 des PY Motivs befinden (vergleiche dazu Abb.4.11.A). Die vorläufigen Ergebnisse erster Expressionsstudien sind in Abb.4.26 zu sehen.

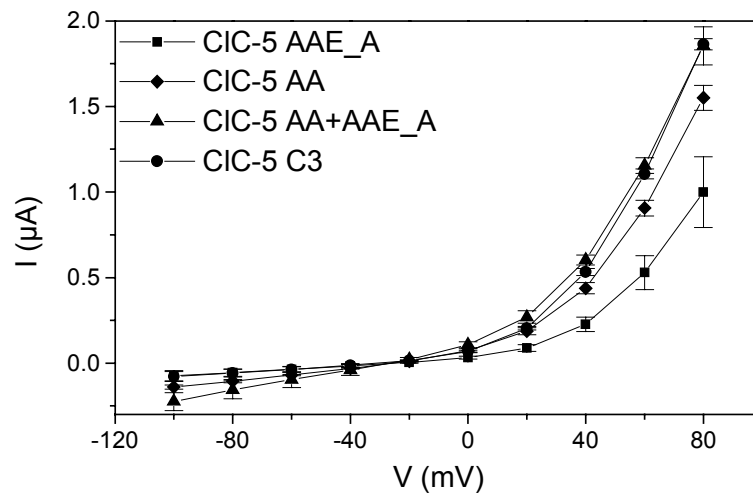
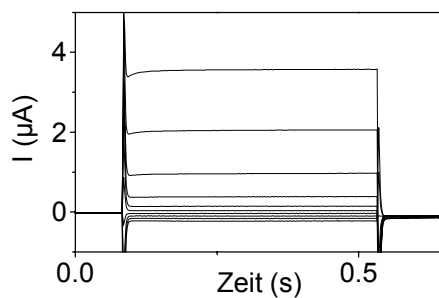
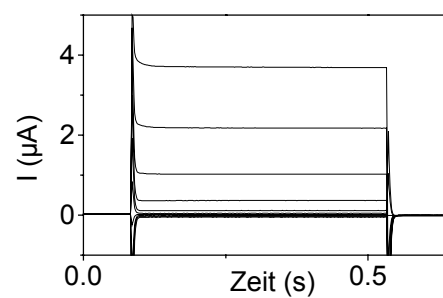
A**B****C**

Abbildung 4.26: Identifikation eines putativen Internalisierungsmotivs. Aufgeführt sind die Strom-Spannungs Kurven der AAE_A Mutante, verglichen mit der Y661A-F662A Mutante (AA benannt), der Doppelmutante Y661A-F662A/AAE_A (AA+AAE_A benannt) und der CIC-5 C3 Chimäre (A). In (B) ist eine Stromkurve von der AA+AAE_A Doppelmutante zu sehen und in (C) eine der CIC-5 C3 Chimäre.

In diesem Fall sind die I/V Werte auf den Wert normiert, der für die AAE_A Mutante bei +80mV erhalten wurde. Die Y661A-F662A (AA) Mutante ergab in dieser Untersuchung einen um 50% größeren Strom als die AAE_A Mutante. Dies bedeutet, daß der Strom verglichen mit CIC-5 Wildtyp dreimal so groß ist. Die Doppelmutante ergab sogar eine fast vierfach vergrößerte Stromamplitude. Da CIC-3 weder das PY Motiv noch das vollständige YF Motiv trägt, wurde in diese Expressionsstudie eine Chimäre zwischen CIC-5 und CIC-3 eingeschlossen, bei der der C-Terminus von CIC-5 gegen den von CIC-3 durch rekombinante PCR ausgetauscht wurde. Diese Chimäre (CIC-5 C3 genannt) war in der Größe der Stromamplitude nicht zu unterscheiden von der CIC-5 AA+AAE_A Doppel-

mutante. Dies deutet darauf hin, daß damit das komplette Internalisierungsmotiv, das die C-Termini von CIC-5 und CIC-3 voneinander unterscheidet, identifiziert wurde. Allerdings kann bei CIC-3 eigentlich nicht von einem Internalisierungsmotiv gesprochen werden, da der Kanal nicht die *Xenopus* Oozyten Oberfläche erreicht (siehe Abb.4.15). Die Ströme der AA und der AA+AAE_A Doppelmutante scheinen sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Vergleicht man die CIC-5 C3 Chimäre (Abb.4.26.C) mit der AA+AAE_A Doppelmutante (siehe Abb.4.26.B) so ist zu erkennen, daß diese Chimäre offensichtlich einen Einfluß auf die Aktivierung des CIC-5 Stroms hat. Da der Effekt aber sehr klein ist, wird es schwierig sein, ihn zu untersuchen. Dennoch könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß der C-Terminus neben seiner Rolle bei der Zielsteuerung von CIC-5 eine Rolle bei der Aktivierung des Kanals besitzt.

4.2.9 Elektrophysiologische Analyse neu identifizierter CIC-5 Mutationen, die die Dent'sche Krankheit verursachen.

Im Labor von Steven Scheinman (Toronto) wurden vor kurzem zwei neue CIC-5 Mutationen identifiziert, die die Dent'sche Krankheit hervorrufen. Bei diesen Mutationen handelte es sich um Punktmutationen, die Aminosäureaustausche zur Folge haben. Die Mutation G462D befindet sich in D10, die andere (T657S) liegt am Ende der CBS 1 Domäne (vergleiche Abb.4.11). Die Mutationen wurden in die CIC-5 cDNA durch rekombinante PCR eingefügt und in *Xenopus* Oozyten analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb.4.27 zusammengefaßt. Nach dieser Analyse war die CIC-5 G462D Mutante nicht funktionsfähig. Der von ihr vermittelte Strom unterscheidet sich nicht von dem an Wasser-injizierten Oozyten gemessenen. Im Gegensatz dazu wurde für die CIC-5 T657S Mutante sogar eine etwas größere Stromamplitude als für CIC-5 Wildtyp gemessen. Die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals blieben dabei unverändert.

Die meisten bisher elektrophysiologisch charakterisierten CIC-5 Mutationen bei der Dent'schen Krankheit wiesen einen Funktionsverlust auf. In seltenen Fällen waren die Ströme gegenüber dem Wildtyp allerdings unverändert (Cox *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2000).

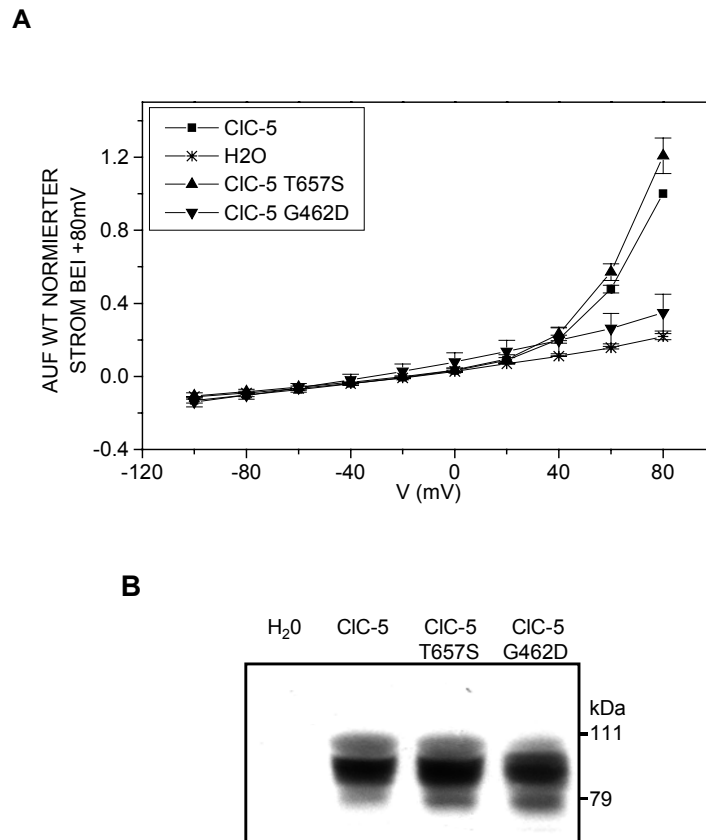


Abbildung 4.27: Elektrophysiologische Analyse neu identifizierter Mutationen in CIC-5, die die Dent'sche Krankheit verursachen. In Teil (A) dieser Abbildung sind wiederum drei unabhängige Oozyten und cRNA Präparationen zusammengefaßt. Die Ströme wurden auf die Stromamplitude von CIC-5 bei +80mV normiert. (B) zeigt die *Western-Blot* Analyse einer *Xenopus* Oozyten Präparation aus (A).

Da die Rolle der CIC-5 Expression in der Plasmamembran noch nicht endgültig geklärt ist, kann auch nicht entschieden werden, wie im Falle der letztgenannten Mutanten das Krankheitsbild der Dent'schen Krankheit hervorgerufen wird. Möglicherweise beeinflussen diese Mutationen die Zielsteuerung der Kanäle in der Zelle, so daß die Funktion des Kompartiments (Endosomen) gestört ist, in denen CIC-5 normalerweise seine physiologische Rolle erfüllt.

Um zu zeigen, daß im Falle der CIC-5 G462D Mutante Protein gebildet wurde, wurden die elektrophysiologisch analysierten *Xenopus* Oozyten mittels *Western-Blot* auf die Expression von CIC-5 untersucht. Wie in Abb.4.23 zu sehen ist, ist CIC-5 Protein in den *Xenopus* Oozyten gebildet worden, die mit der cRNA mutierter CIC-5 Kanäle injiziert wurden. Offensichtlich beeinflußt die G462D Mutation die biophysikalischen Eigenschaften oder die Oberflächenexpression des Kanals, weswegen kein Strom gemessen werden konnte.