

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Abschnitte in der Aminosäuresequenz von Ionenkanälen untersucht, die an der Zielsteuerung der Proteine in der Zelle beteiligt sind. Dies wurde an ausgewählten Mitgliedern der KCNQ- und der CIC-Proteinfamilie durchgeführt. Im einzelnen waren dies KCNQ2, KCNQ3 und CIC-5. Diese Ionenkanäle sind vom großen Interesse, da Mutationen in den zugehörigen Genen erbliche Krankheiten hervorrufen können. Eine Möglichkeit zur Erklärung der pathogenen Effekte, dieser Mutationen ist, daß die mutierten Kanäle in der Zelle fehlgesteuert werden und nicht mehr das Kompartiment erreichen, in denen sie ihre physiologische Rolle erfüllen. Es ist daher von Bedeutung, Sequenzbereiche innerhalb dieser Proteine zu identifizieren, die für die Zielsteuerung wichtig sind. Als Expressionsmodell diente dabei vornehmlich das *Xenopus* Oozyten System, das den großen Vorteil hat, direkt die Funktion der Ionenkanäle als solche überprüfen zu können.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit für KCNQ2 und KCNQ3 gezeigt werden, daß die Vergrößerung des Stroms bei Koexpression der beiden Untereinheiten hauptsächlich durch eine drastische Erhöhung der Anzahl von heteromeren Kanälen in der Plasmamembran verursacht wird. Die Bildung von homomeren und heteromeren Kanälen hängt von einem intakten C-Terminus ab. Dieser enthält eine zwischen den Mitgliedern der Proteinfamilie konservierte Aminosäuresequenz, die hier als A-Domäne (A von Assoziation) bezeichnet wird.

Für CIC-5 wurde ein PY Motiv identifiziert und dessen Funktion auf die Kanalaktivität und Zielsteuerung analysiert. Für diesen Ionenkanal ist dies von besonderer Bedeutung, da er hauptsächlich intrazellulär in Endosomen exprimiert wird. Zumindest in den Zellen des proximalen Tubulus der Niere ist er an der Ansäuerung endozytotischer Vesikel beteiligt. Diese Funktion kann der Kanal nicht erfüllen, wenn durch Mutationen die Pore des Kanals und damit seine

Leitfähigkeit oder die Ionenselektivität betroffen ist, oder wenn der Kanal nicht mehr richtig zielgesteuert wird.

5.1 Diskussion der Ergebnisse zu den Untersuchungen an KCNQ2 und KCNQ3

Von der KCNQ-Kanalfamilie war zu Beginn dieser Arbeit nur ein Mitglied bekannt (KCNQ1). Inzwischen wurden vier weitere Homologe (KCNQ2-5) kloniert (Biervert *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Kubisch *et al.*, 1999; Lerche *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000). Schnell entwickelten sich deutliche Hinweise, die für eine Bildung von heteromultimeren Kanälen aus KCNQ2- und KCNQ3-Untereinheiten sprachen (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Erstens wurden bei Koexpression der beiden Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten viel größere Ströme gemessen als für die jeweiligen Homomere (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Zweitens wurden diese Ströme drastisch reduziert, wenn eine der Untereinheiten eine in KCNQ1 Studien identifizierte dominant-negative Mutation an korrespondierender Stelle trug (Schroeder *et al.*, 1998). Drittens wiesen sie in *Northern-Blot* Analysen und *in-situ* Hybridisierungen gleiche Expressionsmuster auf (Biervert *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 1998) und viertens besitzen die heteromeren Kanäle pharmakologische und elektrophysiologische Eigenschaften, die dem physiologisch sehr wichtigen M-Strom sehr ähnlich sind (Wang *et al.*, 1998). Ferner konnte in Koimmunpräzipitationsexperimenten eine biochemische Interaktion nachgewiesen werden (Schroeder *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000). Es konnte aber bislang nicht gezeigt werden, worauf der Anstieg der Stromamplituden beruht.

Der makroskopisch messbare Strom ist gegeben durch: $I = U * 1/R * N * p_{\text{open}}$, wobei der inverse Widerstand $1/R$ im Falle von Ionenkanälen durch die Einzelkanalleitfähigkeit γ ersetzt werden kann. N gibt die Anzahl der Kanäle an, die zum Strom beitragen und p_{open} die Offenwahrscheinlichkeit. Um zu untersuchen, worauf der Anstieg des Stroms bei Koexpression der beiden Untereinheiten beruht, wurden die Einzelkanalleitfähigkeiten, die Offenwahrscheinlichkeiten und die Oberflächenexpression der homomeren und heteromeren KCNQ2 und KCNQ3 Kanäle bestimmt. Die durchschnittliche Einzelkanal-

leitfähigkeit und die Offenwahrscheinlichkeit heteromerer KCNQ2/KCNQ3 Kanäle wiesen keine signifikante Unterschiede zu homomeren KCNQ2 Kanälen auf. Dies deutet darauf hin, daß diese beiden Parameter nicht die Ursache für den Anstieg des Stroms sind, wenn cRNAs für die beiden KCNQ-Untereinheiten koinjiziert werden. Aus Einzelkanalaufnahmen von KCNQ2 und KCNQ3 koinjizierten *Xenopus* Oozyten waren mehrere Einzelkanalleitfähigkeiten erkennbar, die in Abb. 4.3 als „groß“, „mittel“ und „klein“ bezeichnet wurden. Diese unterschiedlichen Aufnahmen repräsentieren vermutlich homomere KCNQ2 und KCNQ3 Kanäle und heteromere KCNQ2/KCNQ3 Kanäle mit variabler Stöchiometrie. Die Auswertung der möglichen Zusammensetzungen der heteromeren Kanäle in Kapitel 4.1.3 ergibt fünf verschiedene Anordnungen, wenn davon ausgegangen wird, daß ein funktionaler Kaliumkanal aus vier Untereinheiten gebildet wird. Da nur drei Einzelkanalleitfähigkeiten bestimmt wurden, kann darüber spekuliert werden, ob eine der Untereinheitenanordnungen die gleiche Einzelkanalleitfähigkeit besitzt wie eine andere, oder ob aufgrund der geringen Anzahl der Einzelkanalaufnahmen Einzelkanäle mit einer bestimmten Untereinheitenanordnung nicht gemessen wurden. Die hier durchgeführten Experimente erlauben es nicht, die Einzelkanalaufnahmen der heteromeren Kanäle mit der Stöchiometrie der Untereinheiten in Verbindung zu setzen.

Aus den Messungen der Oberflächenexpression epitop-markierter homo- und heteromerer KCNQ-Kanäle ging hervor, daß sowohl KCNQ2 als auch KCNQ3 Kanäle als Homomere an die Oberfläche gelangten. Dies geschah jedoch in Koexpressionsexperimenten mit der korrespondierenden Untereinheit wesentlich effizienter. Damit ist also die Vergrößerung der Oberflächenexpression die Hauptursache für den beobachteten Anstieg des makroskopischen Stroms bei Koexpression der beiden Untereinheiten. Der Anstieg der Oberflächenexpression von KCNQ2HA um einen Faktor von (ungefähr) fünf, der bei Koexpression mit KCNQ3 beobachtet wurde, wird theoretisch um einen Faktor von 2 unterschätzt, weil die homomeren KCNQ2HA Kanäle vier HA-markierte Untereinheiten besitzen. Der durchschnittliche heteromere KCNQ2HA/KCNQ3 Kanal weist jedoch nur zwei markierte Untereinheiten auf. Diese Annahme wird durch den Befund unterstützt, daß sowohl KCNQ2HA als auch KCNQ3HA bei der Koexpression mit dem jeweiligen nicht-markierten Partner gleichgroße Ober-

flächenexpressionen ergeben. Dies ist vereinbar mit einer 1:1 Stöchiometrie zwischen epitop-markierten und nicht-markierten KCNQ-Untereinheiten in heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanälen (siehe Kapitel 1.3.1.1). Da bekannt ist, daß spannungsabhängige Kaliumkanäle aus vier Untereinheiten bestehen und Tetramere bilden, ergibt sich im Mittel eine 2:2 Verteilung der beiden Untereinheiten im heteromeren Kanal (siehe Kapitel 4.1.3).

Der somit eigentlich 10-fache Anstieg der Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran erreicht fast die gleiche Größenordnung des Stromanstieges (10- bis 15-fach), der unter den gleichen experimentellen Bedingungen gemessen wurde (Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Unterschiede in den cRNA-Mengen, die in die *Xenopus* Oozyten injiziert wurden, können für die verbleibende Differenz nicht verantwortlich sein, da sie konstant gehalten wurden, um für jedes Konstrukt die gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen. Eine plausible Erklärung für den Unterschied zwischen dem Anstieg des Stroms und der Oberflächenexpression könnte sein, daß das Einfügen des HA-Epitopes in die Untereinheiten selbst zu einer Reduktion des Stroms um 30-50% führt, wenn man ihn mit dem nicht-markierter Untereinheiten vergleicht.

Die Einzelkanalleitfähigkeiten von Kaliumkanälen, die den M-Strom vermitteln wurden in sympathischen Neuronen des Rattenhirns und kultivierten CA1-CA3 pyramidalen Neuronen zu 7-11pS bestimmt (Selyanko *et al.*, 1992; Selyanko *et al.*, 1993; Selyanko *et al.*, 1996; Selyanko *et al.*, 1998). Diese Werte stimmen gut mit den in dieser Arbeit für heteromere KCNQ2/KCNQ3 und homomere KCNQ2 Kanäle bestimmten überein, wenn man berücksichtigt, daß die Aufnahmen der nativen Kanäle unter asymmetrischen (geringe extrazelluläre Kaliumkonzentration) Bedingungen durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen ist die Leitfähigkeit aufgrund der Goldman-Rektifizierung (Goldman, 1943) erwartungsgemäß, um einen Faktor von 1,5 kleiner, als unter symmetrischen Bedingungen bei 0mV. Ferner zeigten die heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierten Kanäle einen kleinen einwärtsgerichteten Strom, sogar bei den gewählten symmetrischen Kaliumkonzentrationen. Diese beiden Faktoren tragen dazu bei, daß die in dieser Arbeit bestimmten Werte für die Leitfähigkeiten homomerer KCNQ2 und heteromerer KCNQ2/KCNQ3 Kanäle, verglichen mit

der von anderen Arbeitsgruppen bestimmten Leitfähigkeit für M-Kanäle, zu hoch erscheinen.

Die mit dem Oberflächenexpressionsassay erhaltenen Ergebnisse zeigen, das KCNQ2 ohne intakten C-Terminus nicht die Plasmamembran erreicht. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse mit *Missense*-Mutationen im Bereich der Transmembrandomänen S1-S6, daß diese mutierten KCNQ2 und KCNQ3 Kanäle homo- und heteromere Kanäle bilden können und fast ebenso effizient in die Plasmamembran gelangen, wie die Wildtyp Kanäle. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten der elektrophysiologischen Analyse der Mutanten überein. Die Ströme von homomeren KCNQ2(Y284C) Kanälen erreichten etwa 30-60% der Amplitude der Wildtyp Ströme (Schroeder *et al.*, 1998). Da bei der Analyse der Oberflächenexpression kein Unterschied zwischen homomeren KCNQ2 und homomeren KCNQ2(Y284C) gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, daß die Leitfähigkeit und/oder die Offenwahrscheinlichkeit durch die Mutation verändert wird. Dieses wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da hier die Zielsteuerung der KCNQ-Kanäle im Vordergrund stand. Deswegen war die Mutation KCNQ2(Ins5bp1600), die zu einem C-terminal verkürzten Kanal führt, interessant. Für diese Mutante waren keine Ströme (Biervert *et al.*, 1998) und auch keine Oberflächenexpressionen meßbar. Weder war dieses Konstrukt in der Lage, die Oberflächenexpression von HA-markierten KCNQ3 zu stimulieren, noch gelangte HA-markierter KCNQ2(Ins5bp1600) durch Koexpression mit KCNQ3 in die Plasmamembran. Dies deutet darauf hin, daß der Carboxy-Terminus notwendig für die Assoziation der Untereinheiten ist, und daß die Bildung intakter homo- bzw. heteromerer Kanäle die Voraussetzung für den Einbau in die Plasmamembran ist. Ein Vergleich der Carboxy-Termini der Mitglieder der KCNQ-Proteinfamilie enthüllt eine hochkonservierte Region, die in dieser Arbeit als A-Domäne (von Assoziation) bezeichnet wird (Abb.5.1).

		A-Domäne
KCNQ1	526	KKK FQQARKPYDVRDVIEQYSQGH LNL MVRIKELQRRLDQ SIGKPSLFISVS
KCNQ2	524	KRK FKESLRPYDVM DVIEQYSAGH LDMLSRIKSLQSRVDQ IVGRGPAITDKD
KCNQ3	531	KKK FKETLRPYDVKDVIEQYSAGH LDMLSRIKYLQTRIDM IFTPGPPSTPKH
KCNQ4	546	KRK FKETLRPYDVKDVIEQYSAGH LDMLGRIKSLQTRVDQ IVGRGPGDRKAR
KCNQ5	499	KRK FKETLRPYDVKDVIRQYSAGH LDMLCRIKSLQTRVDQ IILGKGQITSDKK

Abbildung 5.1: Vergleich der KCNQ-Proteinsequenzen im Bereich der A-Domäne. Gezeigt sind die humanen KCNQ-Proteinsequenzen aus dem C-Terminus. In allen Kanälen identische Aminosäuren sind grau unterlegt. Die A-Domäne ist schematisch eingezeichnet und umfaßt ca. 40 Aminosäuren.

Fehlt diese Domäne, wie bei der KCNQ2(Ins5bp1600) Mutante, gelangt kein Protein mehr in die Plasmamembran. Das legt den Schluß nahe, daß die A-Domäne wichtig für die Assemblierung der Untereinheiten ist. Unterstützung findet diese Annahme auch in Untersuchungen an KCNQ1, die parallel zu dieser Arbeit stattfanden (Schmitt *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde allerdings eine Assoziationsdomäne (*cad*; *c-terminal assembly domain*) identifiziert, die erheblich hinter der A-Domäne liegt (ca. 30 Aminosäuren). Die Ergebnisse dieser Untersuchung und dieser Doktorarbeit zeigen deutlich, daß der C-Terminale Bereich der KCNQ-Kanäle zwischen den Aminosäuren 520-620 wichtig ist für die Bildung homomerer und heteromerer Kanäle. Damit unterscheiden sich die KCNQ-Kanäle von den anderen Mitgliedern der Kv-Familie, für die eine N-terminale Tetramerisierungsdomäne (T1_{A,B}) beschrieben werden konnte. Ergebnisse aus jüngster Zeit zeigen, daß die T1-Domäne ebenfalls eine Funktion beim Schalten der Kv-Kanäle besitzt (Minor *et al.*, 2000). Ferner konnte gezeigt werden, daß die T1-Domänen die Interaktion der α -Untereinheiten mit den β -Untereinheiten der Kv-Kanäle vermittelt (Gulbis *et al.*, 2000). In Bezug auf die KCNQ-Kanäle werden weitergehende Untersuchungen notwendig sein, um die C-terminale(n) Interaktionsdomäne(n) genau zu charakterisieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen an der T1-Domäne anderer Mitglieder der Kv-Familie macht es wahrscheinlich, daß diese Domäne(n) nicht nur die Interaktion der Kanal- α -Untereinheiten vermitteln.

5.2 Diskussion der Ergebnisse zu den Untersuchungen an CIC-5

Der nierenspezifische Chloridkanal CIC-5 besitzt als einziger innerhalb der CIC-Proteinfamilie ein PY Motiv zwischen den beiden CBS-Domänen im C-Terminus. Es wurde gezeigt, daß die WW-Domänen der Proteine WWP1-3 an dieses Prolinreiche Motiv binden (Pirozzi *et al.*, 1997). Von diesen Proteinen gehört zumindest WWP2 zu der Proteinfamilie der mit Nedd4 verwandten Ubiquitin-Protein Ligasen, die alle die gleiche Domänen-Struktur aufweisen: eine N-terminale C2-Domäne, vier WW-Domänen und eine C-terminale HECT-Domäne (siehe Abb.4.23) (Harvey *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde die Funktion des PY Motivs in CIC-5 untersucht. Mutationen, die das Motiv zerstören, vergrößern den CIC-5 vermittelten Strom etwa zweifach. Innerhalb des PY Motivs ist das Y672 die Aminosäure, deren Austausch gegen andere Aminosäuren den größten Effekt auf den CIC-5 Strom ergibt. Für die Erhöhung des Stroms war es unerheblich, ob das Tyrosin durch ein negativ geladenes Glutamat oder durch ein neutrales Alanin ersetzt wurde. Dies deutet darauf hin, daß nicht die Phosphorylierung des Tyrosins für die Erhöhung des Stroms verantwortlich ist, zumindest nicht im Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten.

Mit Hilfe eines Oberflächenexpressionsessays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß der Anstieg des Stroms, der für die PY Motiv Mutanten gemessen wurde, von der Anzahl HA-markierter Kanäle in der Plasmamembran abhängt. Die Oberflächenexpression und der Strom der PY Motiv Mutanten ist etwa doppelt so groß wie die des Wildtyps. Es ist deswegen wahrscheinlich, daß der Anstieg des CIC-5 vermittelten Stroms aufgrund von Mutationen innerhalb des PY Motivs ausschließlich durch eine erhöhte Zahl von Kanälen in der Plasmamembran erklärt werden kann, und daß diese Mutationen keinen Einfluß auf die Offenwahrscheinlichkeit oder die Einzelkanalleitfähigkeit des Kanals haben. Dies konnte aber nicht, wie im Falle der homomeren KCNQ2 und KCNQ3 und heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanäle, experimentell belegt werden, da die Spannungsabhängigkeit von CIC-5 diese Analysen erschwert. So werden zur nicht-stationären Rauschanalyse Ströme benötigt, die möglichst langsam

aktivieren oder inaktivieren. Bei der nicht-stationären Rauschanalyse (vergleiche dazu Kapitel 4.1.1) wird die Varianz, d.h. die Fluktuation des gemittelten Stroms zu jedem Zeitpunkt des Aufnahmeintervalls berechnet (siehe Abb.4.2, linke Spalte) und gegen den zugehörigen mittleren Strom aufgetragen. Die so erhaltene Kurve wird an eine Parabel angepaßt (siehe Abb.4.2, rechte Spalte). Um diese Parabel gut zu reproduzieren, wird ein großer Bereich sich ändernder Stromamplituden benötigt. Da CIC-5 sehr schnell aktiviert und inaktiviert, ist diese Methode zur Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit und Einzelkanalleitfähigkeit von CIC-5 nicht geeignet.

Dieses Verhalten erschwert auch die Aufnahme von Einzelkanalereignissen nach der hier angewandten Methode (Kapitel 4.1.1). Üblicherweise werden relativ große Membranbereiche der Plasmamembran, die eine Vielzahl von Kanälen enthalten, auf eine Spannung geklemmt, bei der die Kanäle nur noch eine geringe Offenwahrscheinlichkeit besitzen, und die überwiegende Zahl der Kanäle geschlossen vorliegen. Einzelkanalereignisse können dann aufgenommen werden, wenn nur noch ein Kanal pro Zeiteinheit innerhalb des Membranbereiches aktiv ist und Ionen leitet. CIC-5 kann nach dieser Methode ebenfalls nicht elektrophysiologisch analysiert werden, da alle Kanäle nach Hyperpolarisation sofort geschlossen wären. Die einzige Möglichkeit wäre, Pipetten mit kleinen Öffnungen zu verwenden, um *patches* zu isolieren, die tatsächlich nur einen CIC-5 Kanal enthalten. Dieser Ansatz wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Bei den Experimenten zur Oberflächenexpression wurde der nicht-markierte CIC-5 Kanal als Negativkontrolle verwendet, um die Größenordnung des Hintergrundsignals, das durch die unspezifische Bindung des Antikörpers an die Plasmamembran entsteht, zu bestimmen. Wie in Abb.4.15.A gezeigt werden konnte, war dieses Signal sehr gering. HA-markierter CIC-3 ergab ein Signal, das nicht von dem Hintergrundsignal zu unterscheiden war. Durch die Analyse des gesamten HA-markierten Proteins, der für dieses Experiment verwandten *Xenopus* Oozyten mittels *Western-Blot* kann ausgeschlossen werden, daß CIC-3 HA nicht exprimiert wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den elektrophysiologischen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, daß CIC-3 in Oozyten nicht funktionell als Chloridkanal in der Plasmamembran nachgewiesen werden kann. Dieser Befund stellt wiederum die Hypothese in Frage, daß es sich bei CIC-3 um

den schwellungsaktivierten Chloridionenkanal handelt (Duan *et al.*, 1997), da ein solcher ja hauptsächlich in der Plasmamembran exprimiert sein sollte.

Neben CIC-3 wurde auch CIC-4 HA-markiert und analysiert. Die Parameter der Oberflächenexpression korrelierten auch in diesem Fall mit dem Verhältnis der Stromamplituden zwischen CIC-4 und CIC-5 (Friedrich *et al.*, 1999). Besonders interessant hierbei ist die *Western-Blot* Analyse des HA-markierten CIC-4. Diese zeigt nur eine einzige Bande für CIC-4, während CIC-5 und CIC-3 eine Doppelbandenstruktur aufweisen. Bei CIC-4 handelt es sich wahrscheinlich nur um eine Bande, die den im endoplasmatischen Retikulum kern-glykosylierten Protein entspricht. Eine zweite obere Bande, die dem vollständig glykolysierten Ionenkanal entspräche, fehlt jedoch. Dies deutet darauf hin, daß CIC-4 in den *Xenopus* Oozyten hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum vorkommt, wie bereits an COS7 Zellen gezeigt wurde (S. Schaffer, persönliche Mitteilung). Ob es sich bei dieser Bande tatsächlich um die im ER glykolysierte Form des Ionenkanals handelt, könnte eindeutig mit einem Verdau des Proteins mit Endoglykosidase H bewiesen werden. Zusätzlich müßte gezeigt werden, daß es sich bei der Lokalisation von CIC-4 nicht um ein Überexpressionsphänomen handelt, oder ob die Lokalisation den Bedingungen in nativen Zellen entspricht. Auch diese Fragestellung lag außerhalb des Bereiches der vorliegenden Untersuchungen.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis des *Western-Blots* für die Untersuchungen des PY Motivs in CIC-5 ist, daß die Intensität des Signales von CIC-5 HA und CIC-5 AAE_A HA gleich groß ist. Dies schließt aus, daß die AAE_A Mutante nur einer effektiveren Translation unterliegt und dadurch der Anstieg des Stroms verursacht wird.

Die Ursache des Anstiegs des Stroms der CIC-5 PY Motiv Mutante wird durch eine verlängerte Halbwertszeit in der Plasmamembran hervorgerufen, wie durch die BFA Experimente in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die Bestimmung der Halbwertszeit der CIC-5 AAE_A Mutante stellte sich als sehr problematisch heraus, da im Rahmen der Meßzeit von 22h keine signifikante Abnahme der Stromamplitude nachgewiesen werden konnte. Deswegen wurde nur für CIC-5 die Halbwertszeit auf 23 ± 3 h bestimmt. Die Abbildung 4.18 verdeutlicht aber eine Verlängerung der Halbwertszeit von CIC-5 in der Plasmamembran, wenn das PY Motiv durch Mutationen zerstört wurde. Von der Angabe eines Zahlenwertes für die AAE_A Mutante wurde aus den oben beschriebenen Gründen abgesehen.

Die lange Halbwertszeit von ClC-5 in der Plasmamembran kann damit erklärt werden, daß ClC-5 hauptsächlich intrazellulär vorliegt ($\approx 95\%$ des Gesamtproteins in einer *Xenopus* Oozyte liegen intrazellulär vor, wie anhand von Biotinylierungsexperimenten abgeschätzt werden konnte (Daten nicht gezeigt)) und über die Plasmamembran zirkuliert. Dieser Zirkulationsprozeß könnte die Halbwertszeit verlängern, da Kanäle, die endozytotisch internalisiert wurden wieder in der Plasmamembran erscheinen und dort erneut zum Strom beitragen. Die Abnahme des Stroms, die in den BFA Experimenten gemessen wurde, geht also nur auf die Proteinmoleküle zurück, die diesem Prozeß, wahrscheinlich durch Degradation entzogen worden waren. Danach handelt es sich bei dem PY Motiv in ClC-5 um ein Motiv, das die Degradation des Kanals vermittelt.

Im stationären Zustand unterscheidet sich die Proteinexpression von ClC-5 und der PY Motiv Mutante in *Xenopus* Oozyten nicht. Dies spricht gegen ein Degradationssignal, da die Gesamtproteinmenge zunehmen sollte, wenn das Protein nicht mehr abgebaut wird. Vermutlich wird in diesem Fall nur ein kleiner Prozentsatz des Gesamtproteins, das sich in der Plasmamembran befindet, vermittelt durch das PY Motiv degradiert. Dieser geringe Anteil ist vermutlich durch eine *Western-Blot* Analyse des Gesamtproteins nicht nachzuweisen.

Eine andere häufig verwandte Methode zur Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen, sogenannte *pulse-chase* Experimente, wurden in dieser Arbeit auch angewandt und bestätigen die Ergebnisse aus den BFA Experimenten. Allerdings wurde in diesem Fall von einer Quantifizierung abgesehen, da diese mit zu vielen Unsicherheitsfaktoren behaftet ist. Diese Unsicherheiten sind hauptsächlich durch das verwandte Expressionssystem (CHO K1 Zellen) begründet, in dem eine Normierung der Proteinmengen zur wechselseitigen Vergleichbarkeit praktisch unmöglich ist (vergleiche dazu Kapitel 4.2.4). Dennoch geben diese Experimente einen wichtigen Einblick in den Reifungsprozeß von ClC-5. Der Kanal wird offensichtlich stark glykosyliert, womit die Doppelbande in den *Western-Blots*, deren Substrukturen um etwa 10-20 kDa apparentes Molekulargewicht auseinanderliegen, zu erklären ist. Ferner scheint die Glykosylierung wichtig für die Zielsteuerung des Kanals zu sein, da die glykosylierungsdefiziente Mutante (N408Q) nur einen halb so großen Strom in *Xenopus* Oozyten liefert wie der Wildtyp Kanal.

Durch Koexpressionsexperimente mit der dominant-negativen Dynamin Mutante K44E wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht den Prozeß der Endozytose von CIC-5 weitergehend zu untersuchen. Diese Dynamin Mutante war in früheren Untersuchungen an Ionenkanälen oder Hormonrezeptoren genutzt worden, um zu untersuchen, ob deren Endozytose über *Clathrin coated-pits* erfolgt (Shimkets *et al.*, 1997). CIC-5 hingegen scheint in Koexpressionsexperimenten mit der Dynamin Mutante K44E überhaupt nicht mehr in die Plasmamembran zu gelangen, da kein CIC-5 vermittelter Strom mehr nachzuweisen ist. *Clathrin* veranlaßt aber auch die Generierung von Vesikeln am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), die von dort Transmembran- und luminal Proteine zu den Endosomen bzw. zur Plasmamembran transportieren. Auch am TGN kann die Generierung neuer Vesikel durch die dominant-negative Dynamin Mutante inhibiert werden (Jones *et al.*, 1998). Diese Inhibierung würde bewirken, daß neu-synthetisierter CIC-5 nicht mehr in die Plasmamembran gelangt und statt dessen im TGN akkumuliert, wodurch keine Ströme mehr meßbar sind. CIC-5 scheint nach diesen Ergebnissen einen anderen intrazellulären Weg an die Plasmamembran zu nehmen als der ENaC Kanal (Shimkets *et al.*, 1997).

Dennoch kann als wahrscheinlich gelten, daß die Endozytose von CIC-5 in *Clathrin coated-pits* stattfindet. Wenn zum einen die Generierung der CIC-5 enthaltenen Vesikel am TGN Dynamin abhängig ist (und damit *Clathrin*-vermittelt), sollten sich die endozytotischen Vesikel nicht anders verhalten, da bei beiden Prozeßen die gleiche Proteinmaschinerie die Generierung der Vesikel bewirkt. Zum anderen wurde durch Koexpression von Dynamin Wildtyp mit CIC-5 oder der CIC-5 E211A Mutanten eine geringere Stromamplitude gemessen, als für CIC-5 alleine. Da Dynamin die *Clathrin*-vermittelte Endozytose an *Xenopus* Oozyten verstärkt (Shimkets *et al.*, 1997), ist dieses Ergebnis damit zu erklären, daß CIC-5 durch gleichzeitige Überexpression von Dynamin schneller aus der Plasmamembran entfernt wird. Diese Frage könnte aber nur durch Koexpressionsstudien von CIC-5 mit der temperatur-sensitiven Dynamin Mutante G273D (oder mit anderen Proteinen, die selektiv die *Clathrin*-vermittelte Endozytose an der Plasmamembran inhibieren), geklärt werden. Für Untersuchungen mit der temperatur-sensitiven Dynamin Mutante müsste allerdings ein anderes Expressionssystem als das der *Xenopus* Oozyten gewählt werden, da diese bei einer Temperatur von 37°C lebensfähig sind.

Eine andere Möglichkeit die Endozytose in *Xenopus* Oozyten zu verstärken, ist die Expression von rab5 und rab5 Q79L. Diese führten in anderen Studien dazu, daß vermehrt HRP endozytotisch aufgenommen wurde, welches als ein Markerprotein für die Endozytose aus der Flüssigphase gilt (Mukhopadhyay *et al.*, 1997). Rab5 und rab5 Q79L reduzieren in den vorliegenden Koexpressionsexperimenten mit CIC-5 dessen Strom, was durch eine vermehrte Endozytose von CIC-5 erklärt werden kann. Wird die Endozytoserate durch rab5 S34N vermindert (Mukhopadhyay *et al.*, 1997), erhöht sich der durch CIC-5 vermittelte Strom. Dies deutet darauf hin, daß die Plasmamembranexpression von CIC-5 selbst durch die Änderung der Endozytoserate moduliert wird.

Im Lichte dieser Resultate würde CIC-5 endozytotisch aus der Plasmamembran entfernt. Die AAE_A Mutante hingegen ist von diesen Koexpressionsexperimenten unbeeinflusst. Das bedeutet, daß das PY Motiv im Sinne eines Endozytosesignals fungiert, das CIC-5 in die endozytotischen Vesikel drängt. Diese transportieren CIC-5 vermutlich z.T zur Degradation in die Lysosomen. Unterstützung findet diese Hypothese durch die Koexpressionsexperimente mit WWP2 und dessen defizienten Konstrukten. Die AAE_A Mutante wird nicht durch WWP2 Koexpressionen beeinflusst, was mit der schwächeren Wechselwirkung zwischen dem mutierten PY Motiv und den WW-Domänen erklärt werden kann. Da aber die CIC-5 vermittelten Ströme sich durch die Koexpression mit den nicht funktionalen WWP2 Konstrukten erhöhten, kann davon ausgegangen werden, daß die Interaktion zwischen den beiden Domänen, wie sie biochemisch nachgewiesen wurde (Pirozzi *et al.*, 1997), auch in diesem elektrophysiologischen Ansatz relevant ist.

Da die Punktmutation C838A in der HECT-Domäne der putativen Ubiquitin-Protein Ligase WWP2 ebenfalls zur einer Erhöhung des CIC-5 Stroms und der Oberflächenexpression führt, kann darüber spekuliert werden, daß CIC-5 der Ubiquitinierung unterliegt. Diese Ubiquitinierung würde den Ionenkanal für die Degradation markieren. Dazu müßte er zuerst mittels Endozytose aus der Plasmamembran verschwinden. Leider schlugen im Rahmen dieser Arbeit alle Versuche zum Nachweis der Ubiquitinierung von CIC-5 fehl. Das kann bedeuten, daß der Ionenkanal nicht poly-, sondern nur einfach ubiquitiniert wird. Ein solcher Umstand würde die Detektion sehr erschweren. Außerdem könnte der

ubiquitinierte Ionenkanal sehr kurzlebig sein und deswegen der Detektion entgehen.

Dieser Hypothese widersprechen allerdings die Ergebnisse von Versuchen mit Lactacystin. Dabei handelt es sich um einen sehr wirkungsvollen Proteasom-Inhibitor, mit dem z.B. die Halbwertszeit von ubiquitiniertem ENaC verlängert werden konnte (Staub *et al.*, 1997). Im Fall von ClC-5 konnte aber auch mit dieser Substanz keine Ubiquitinierung nachgewiesen werden.

Es gibt noch weitere Erklärungsmöglichkeiten, die aber hier nicht ausführlich diskutiert werden sollen. Die Ubiquitin-Protein Ligase WWP2 könnte zwar an das PY Motiv im C-Terminus von ClC-5 binden, aber ein anderes Protein ubiquitinieren, z.B. eine mögliche zusätzliche Untereinheit. Ferner ist nichts über die subzelluläre Lokalisation dieser putativen Ubiquitin-Protein Ligase bekannt, so daß sie vielleicht gar nicht an der Plasmamembran aktiv ist, sondern z.B. am endoplasmatischen Retikulum, wo nicht korrekt gefalteter ClC-5 ubiquitiniert und durch das Proteasom sehr schnell abgebaut wird.

Nichtsdestotrotz kann die Interaktion zwischen der Ubiquitin-Protein Ligase WWP2 und dem spannungsabhängigen Chloridionenkanal ClC-5 aber physiologische Bedeutung haben, da sie beide in der Niere exprimiert werden. Allerdings ist auch hier die genaue Lokalisation des WWP2 Proteins nicht bekannt.

Der Anstieg des Stroms durch Mutationen innerhalb des PY Motivs von ClC-5 ist gering (≈ 2 fach) verglichen mit den am ENaC gewonnenen Erkenntnissen, wenn Mutationen innerhalb des PY Motivs einer ENaC-Untereinheit vorliegen (≈ 5 fach) (Schild *et al.*, 1995; Schild *et al.*, 1996). Möglicherweise ist also das PY Motiv in ClC-5 nur eines von mehreren Motiven, die die Internalisierung des Kanals vermitteln. Bei der Suche nach einem weiteren Signal wurde nach weiteren bekannten Konsensussequenzen in der Primärstruktur von ClC-5 Ausschau gehalten: NPxY, LL, YxxF/Y, wie in der Einleitung vorgestellt. Es wurden dabei zwei aromatische Reste (YF) im C-Terminus an der Position 661 und 662 gefunden, die bei einem Austausch gegen Alanine den Strom wirkungsvoller erhöhen, als die AAE_A Mutante. Diese sogenannte AA Mutante erhöhte den Strom um einen Faktor von ≈ 3 , und die AA+AAE_A kombinierte Mutante sogar

um einen Faktor von ≈ 4 . Die Stromamplitude dieser kombinierten Mutante erwies sich als genauso groß, wie die eines chimären ClC-Chloridkanals, der im wesentlichen aus ClC-5 besteht und nur den C-Terminus von ClC-3 trägt. Auf diesem wiederum findet sich weder ein PY Motiv noch ein vollständiges YF Motiv. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß zumindest das komplette Internalisierungssignal identifiziert wurde, das ClC-5 und ClC-3 im C-Terminus voneinander unterscheidet. Besonders interessant wurde dieses YF Motiv durch eine kürzlich erschienene Veröffentlichung, in der der kationenabhängige Mannoserezeptor untersucht wurde. Dieser trägt ebenfalls ein YF Motiv im Bereich des C-Terminus welches die Internalisierung steuert. Es verhindert aber auch, daß dieser Rezeptor in die Lysosomen gelangt, wo er degradiert werden würde (Schweizer *et al.*, 2000). Eine weitere wichtige Aminosäure innerhalb dieses Motivs ist ein Threonin, das neun Aminosäurereste in Richtung des N-Terminus liegt. ClC-5 trägt an dieser Stelle ebenfalls ein Threonin, welches in einer jüngst identifizierten und in dieser Arbeit analysierten Mutation verändert ist, die zur Ausbildung der Dent'schen Krankheit führte. Ein Austausch gegen ein Serin in dieser Position (657) ergibt in *Xenopus* Oozyten einen etwas erhöhten Strom verglichen mit ClC-5 Wildtyp. Diese Erhöhung der Stromamplitude ist sehr ungewöhnlich, da die große Mehrzahl der bislang identifizierten Mutationen bei der Dent'schen Krankheit einen Funktionsverlust des Kanals verursachen, während die elektrophysiologische Analyse in diesem Fall sogar ein Funktionszugewinn nahelegen würde. Es ist daher plausibler anzunehmen, daß diese Mutation T657S einen Defekt in der Zielsteuerung von ClC-5 in den Zellen des proximalen Tubulus hervorruft.

Weitere Untersuchungen mit dieser natürlich vorkommenden Mutante und der AA Mutante werden notwendig sein, um deren Einfluß auf die Zielsteuerung des Kanals zu untersuchen. Jedoch sind die am Ende dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ein vielversprechender Ansatz, weitere physiologisch wichtige Motive zu finden, die die korrekte Lokalisation von ClC-5 und anderen Mitgliedern der ClC-Chloridkanalfamilie steuern.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Motive untersucht, die für die Zielsteuerung der Ionenkanäle CIC-5, KCNQ2 und KCNQ3 notwendig sind, bzw. die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln.

In Bezug auf KCNQ2 und KCNQ3 wurden erste Hinweise erhalten, daß der C-Terminus von KCNQ2 für die Bildung von homo- und heteromeren KCNQ-Kanälen notwendig ist. Der C-Terminus trägt einen in KCNQ-Kanälen hochkonservierten Bereich, der für diese Kanäle einzigartig ist und in dieser Arbeit als A-Domäne bezeichnet wurde. Zukünftige Arbeiten sollten diesen Bereich durch Mutagenese weiter eingrenzen und so die für die Interaktion der Kanaluntereinheiten wichtigen Aminosäuren identifizieren. Der Vergleich der Stromamplituden und der Oberflächenexpressionen der veränderten KCNQ2 und KCNQ3 Kanäle in *Xenopus* Oozyten sollten schnell einen Aufschluß darüber geben. An diese Experimente sollten sich für die vielversprechenden Aminosäuren biochemische Analysen der Interaktion anschließen. Die über diesen experimentellen Weg genau zu lokalisierende Interaktionsdomäne zwischen den homomeren und heteromeren Kanälen aus KCNQ2 bzw. KCNQ3 könnte in den darauffolgenden Experimenten auch in anderen Mitgliedern der KCNQ-Familie ausfindig gemacht werden, um zu verstehen, warum z.B. KCNQ1 nicht (wie KCNQ3) mit KCNQ2, -4 und -5 interagiert.

CIC-5 spielt bei den apikalen endozytotischen Prozessen im proximalen Tubulus der Niere eine wichtige Rolle. Sehr wenig ist bisher über die Zielsteuerung dieses Ionenkanals in die endozytotischen Vesikel bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein PY Motiv als Internalisierungsmotiv identifiziert. Die ersten Schritte für die weitere Charakterisierung von Internalisierungs- oder Zielsteuerungsmotiven in der Aminosäuresequenz von CIC-5 sind getan. Die folgenden Analysen sollten zellbiologische Methoden anwenden, um die genaue intrazelluläre Lokalisation von CIC-5 Mutanten zu untersuchen, deren Zielsteuerungsmotive deletiert wurden. In diese Untersuchungen sollten CIC-5 Mutationen einbezogen werden, die bei Patienten mit der Dent'schen Krankheit identifiziert wurden. Besonders interessant sind dabei Mutationen, die laut Expressionsstudien in *Xenopus* Oozyten eine dem Wildtyp entsprechende

Kanalaktivität besitzen. Diese Mutationen rufen sehr wahrscheinlich einen Defekt in der Zielsteuerung des Proteins hervor, wodurch die Ursachen der Dent'schen Erkrankung auf molekularer Ebene noch besser verstanden werden könnten.