

## 8 Anhang

### 8.1 Zusammenfassung

Mutationen in den Genen für die Kaliumkanäle KCNQ2 und KCNQ3 führen zu einem vererbbaeren epileptischen Syndrom mit der englischen Bezeichnung *benign familial neonatal convulsions* (BFNC). Diese beiden spannungsabhängigen Kaliumkanäle kommen fast ausschließlich im ZNS vor und ihre Expressionsmuster stimmen im Gehirn sehr stark überein. KCNQ2 und KCNQ3 bilden Heteromere mit neuen biophysikalischen Eigenschaften und vermitteln wahrscheinlich den physiologisch sehr wichtigen M-Strom, der die neuronale Erregbarkeit moduliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ursachen für den Anstieg des Stroms untersucht, den man bei Koexpression von KCNQ2 und KCNQ3 in *Xenopus* Oozyten im Vergleich zu den jeweiligen homomeren Kanälen beobachten kann. Dazu wurden die Einzelkanalleitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten ( $p_{\text{open}}$ ) von homomeren KCNQ2 und KCNQ3 und heteromeren KCNQ2/KCNQ3 Kanälen bestimmt. Die Einzelkanalleitfähigkeiten und  $p_{\text{open}}$  von homomeren KCNQ2 ( $i \approx 18 \text{ pS}$ ,  $p_{\text{open}} \approx 0,61$ ) und heteromeren KCNQ2/KCNQ3 ( $i \approx 16 \text{ pS}$ ,  $p_{\text{open}} \approx 0,72$ ) sind annähernd gleich. Die Einzelkanalleitfähigkeit von KCNQ3 ( $i \approx 7,3$ ) ist im Vergleich ungefähr nur halb so groß und die Offenwahrscheinlichkeit ( $p_{\text{open}} \approx 0,42$ ) etwas kleiner. Die Zunahme des Stroms bei Koexpression der beiden KCNQ-Kanäle konnte somit nicht mit diesen Parametern erklärt werden.

Koexpression von KCNQ3 mit KCNQ2 erhöhte die Oberflächenexpression von KCNQ2 um einen Faktor von ungefähr fünf. Umgekehrt wurde die Oberflächenexpression von KCNQ3 durch KCNQ2 um einen Faktor von ungefähr zehn stimuliert. Eine KCNQ2 Mutante, die den C-Terminus des Kanals verkürzt, erreichte nicht die Zelloberfläche und konnte auch nicht die Oberflächenexpression von KCNQ3 erhöhen. Hingegen verhielten sich *Missense*-Mutationen in der Porenregion und in der Transmembrandomäne S6 von KCNQ2 und

KCNQ3 in ihrer Oberflächenexpression annähernd wie die jeweiligen Wildtyp Kanäle.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß der Anstieg des Stroms bei Koexpression von KCNQ2 und KCNQ3 vorwiegend durch eine erhöhte Anzahl aktiver Kanäle in der Plasmamembran verursacht wird. Die Interaktion und damit die Zielsteuerung der homo- und heteromeren Kanäle ist abhängig von einem intakten C-Terminus.

Clc-5 kommt hauptsächlich in den endozytotischen Vesikeln des proximalen Tubulus der Niere vor, für deren effiziente Ansäuerung er maßgeblich verantwortlich ist. Clc-5 defiziente Mäuse weisen eine stark verminderte Endozytose (sowohl rezeptorvermittelt als auch aus der Flüssigphase) in der apikalen Region des proximalen Tubulus auf. Mutationen innerhalb des *CLCN5* Gens sind die Ursache der Dent'schen Erkrankung, deren Hauptsymptome das Ausscheiden von Proteinen niederen Molekulargewichtes mit dem Urin und die Bildung von Nierensteinen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Endozytosemotiven innerhalb der Aminosäuresequenz von Clc-5 gesucht, um deren Einfluß auf die Zielsteuerung des Proteins zu bestimmen. Dabei wurden zwei Internalisierungsmotive identifiziert, ein PY Motiv und ein YF Motiv. Das PY Motiv konnte mit verschiedenen Methoden charakterisiert werden, für das YF Motiv steht eine derartige Analyse noch aus.

Mutationen innerhalb des PY Motivs erhöhten den Clc-5 vermittelten Strom und die Oberflächenexpression um einen Faktor von ungefähr zwei. Die Analyse der Halbwertszeit des Wildtyps und des Kanals ohne funktionelles PY Motiv in der Plasmamembran zeigte, daß die Halbwertszeit der Mutante gegenüber dem Wildtyp verlängert ist. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß es sich bei dem PY Motiv um ein Signal handelt, daß die Degradation des Kanalproteins vermittelt. Unterstützung findet diese Schlußfolgerung durch Koexpressionsexperimente mit WWP2 und nicht-funktionellen Konstrukten dieses Proteins. Dominant-negative Mutanten des WWP2 Proteins erhöhen den Clc-5 vermittelten Strom zweifach, allerdings nur, solange das PY Motiv intakt ist. Da es sich bei dem WWP2 Protein um eine Ubiquitin-Protein Ligase handelt, ist es wahrscheinlich, daß entweder Clc-5 oder ein drittes, noch unbekanntes Protein

ubiquitiniert wird. Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß CIC-5 vermittelte Ströme abnehmen, wenn die Endozytose durch rab5 oder rab5 Q79L in *Xenopus* Oozyten stimuliert wird. Umgekehrt nahmen diese Ströme bei Inhibition der Endozytose durch rab5 S34N zu. Die Zerstörung des PY Motivs hatte zur Folge, daß die Ströme nicht mehr von der Endozytoserate beeinflusst werden konnten.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß sich ein Endozytosemotiv im C-Terminus von CIC-5 befindet, das die Degradation des Proteins vermittelt bzw. beeinflusst.

Die vorliegenden Studien führen also zu einer Erweiterung unserer Kenntnisse über Zielsteuerung und Protein-Protein-Interaktionen von physiologisch sehr wichtigen Mitgliedern der CLC- und der KCNQ-Ionenkanalfamilie.

## 8.2 Abstract

Mutations in either KCNQ2 or KCNQ3 cause benign familial neonatal convulsions (BFNC), an inherited epilepsy of newborns. Both proteins are co-expressed in the brain and associate to form heteromeric potassium channels. They are thought to give rise to the so called M-currents, which are important regulators of neuronal excitability.

In this work the basis for the current increase seen upon co-expression of both KCNQ subunits in *Xenopus* oocytes was investigated. Therefore the single-channel conductances and open-probabilities of homo- and heteromeric KCNQ2 and KCNQ3 channels were determined ((KCNQ2:  $i \approx 18 \text{ pS}$ ,  $p_{\text{open}} \approx 0,61$ ) (KCNQ2/KCNQ3:  $i \approx 16 \text{ pS}$ ,  $p_{\text{open}} \approx 0,72$ ) (KCNQ3:  $i \approx 7,3$ ,  $p_{\text{open}} \approx 0,42$ )). The mean single channel conductance and  $p_{\text{open}}$  of heteromeric channels were not significantly different from those of homomeric KCNQ2 channels, whereas the conductance of KCNQ3 was about half that value. This indicates that the increase of currents observed upon co-expressing both subunits in *Xenopus* oocytes cannot be explained by an increase in these parameters.

Co-expression with KCNQ3 increased the surface expression of KCNQ2 by a factor of 5, and co-expression of KCNQ3 with KCNQ2 led to a >10fold increase of KCNQ3 surface expression. A KCNQ2 mutant associated with BFNC that

truncates the cytoplasmic carboxyterminus neither reached the surface nor stimulated KCNQ3 surface expression. By contrast, BFNC missense mutations in the transmembrane regions of KCNQ2 or KCNQ3 left surface expression unchanged. Thus, the increase in currents seen upon co-expressing KCNQ2 and KCNQ3 is predominantly due to an increase in surface expression, which is dependent on an intact carboxyterminus.

In the kidney ClC-5 chloride channel resides mainly in vesicles of the endocytotic pathway and contributes to their acidification. Its disruption in mice entails a broad defect in renal endocytosis and causes secondary changes in calciotropic hormone levels. Inactivating mutations in Dent's disease lead to proteinuria and kidney stones. Possibly by recycling, a small fraction of ClC-5 also reaches the plasma membrane. We identified a carboxy-terminal internalization motif in ClC-5. It resembles the so called PY motif which is crucial for the endocytosis and degradation of epithelial Na<sup>+</sup>-channels (ENaC). Disrupting this motif increases surface expression and currents about 2-fold. This is likely due to interactions with WW-domains as dominant negative mutants of the ubiquitin-protein ligase WWP2 increased surface expression and currents of ClC-5 only when its PY motif was intact. Stimulating endocytosis by expressing rab5 or its GTPase-deficient Q79L mutant decreased WT ClC-5 currents, but did not affect channels with mutated motifs. Similarly, decreasing endocytosis by expressing the inactive S34N mutant of rab5 increased ClC-5 currents only if its PY motif was intact. Thus, the endocytosis of ClC-5, which itself is crucial for the endocytosis of other proteins, depends on the interaction of a carboxy-terminal internalization signal with ubiquitin-protein ligases containing WW-domains.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Thomas Jentsch für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit in seinem Labor, den methodischen Entfaltungsmöglichkeiten, der wissenschaftlichen Freiheit und der Überlassung des Themas bedanken.

Bei Herrn Hucho möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich, für seine Unterstützung und Motivation während der Doktorarbeit und des Studiums bedanken.

Allen (Ex)-Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jentsch bin ich zu großem Dank verpflichtet, für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt:

Thomas Friedrich für die geduldige Einarbeitung in die Elektrophysiologie und die aufopferungsvolle Hilfe beim Verfassen dieser Arbeit.

Sven Schaffer und Tilman Breiderhoff für die gemeinsame Arbeit an den Versuchen zur zellbiologischen Charakterisierung der CIC-3, -4 und -5 Chloridkanäle und manchen kurzweiligen Zeitvertreib zwischen den Inkubationspausen.

Dagmar Kaspar und Frank Weinreich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für manche methodischen Ratschläge.

Siegfried Waldegger für seine Motivierungsversuche, fachliche Unterstützung und die Einführung in die „Welt der Physiologen“. Michael Pusch für die Überlassung der elektrophysiologischen Daten zur nicht-stationären Rauschanalyse und den Einzelkanalmessungen.

Ferner möchte ich mich bei Gabriela Boia, Ellen Orthey, Barbara Merz, Bettina Dierkes, Patricia Hausmann und Gudrun Weets für die Präparation der *Xenopus* Oozyten bedanken.

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung meiner Mutter, meinen Schwestern und meinen Freunden nicht möglich gewesen. Deswegen geht ein riesiger Dank an: Erika, Gudrun, Christine, Beate, Imke, den „Detmoldern“ (ich hoffe, daß Ihr nicht auf die Erwähnung Eurer Namen besteht), Tobi, Sonja, Karin und Sven. All die, die ich an dieser Stelle vergessen habe zu erwähnen, bitte ich dies zu entschuldigen !

**Lebenslauf**

Name: Michael Schwake  
Geburtsdatum: 18. April 1970  
Geburtsort: Hameln  
Familienstand: ledig  
Wohnort: Langenfelder Damm 21A, 20257 Hamburg

**Schulbildung**

1976-1980 Grundschule in Detmold/Pivitsheide V.H.  
1980-1982 Hauptschule in Detmold/Heidenoldendorf  
1982-1987 Heinrich-Drake-Realschule in Detmold  
1987-1990 Gymnasium Leopoldinum in Detmold

**Wehr-/ Zivildienst**

07/90-11/90 Grundausbildung in Munster  
12/90-09/91 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Detmold

**Studium**

10/91-07/97 Studium der Biochemie an der Freien Universität  
Berlin: Abschluß als Diplom-Biochemiker  
  
10/96-07/97 Diplomarbeit an der Freien Universität Berlin im  
Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von  
Prof. Dr. F. Hucho. Thema: Herstellung zytoplasmatischer  
Domänen des nikotinischen Acetylcholinrezeptors.

Seit 10/97 Promotionsarbeit am Zentrum für Molekulare  
Neurobiologie Hamburg in der Arbeitsgruppe von  
Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch. Thema: Untersuchungen zur  
Zielsteuerung von Ionenkanälen anhand ausgewählter  
Mitglieder der CLC- und KCNQ-Familien

Hamburg, den 11. Januar 2001

**Veröffentlichungen**

Teile der vorliegenden Dissertation wurden im Einverständnis mit den Betreuern veröffentlicht.

Schwake M., Friedrich T. und Jentsch T.J.

An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl<sup>-</sup>-channel mutated in Dent's disease. J. Biol. Chem. 2000 Dec. 14 (elektronische Vorveröffentlichung)

Schwake M., Pusch M., Kharkovets T. und Jentsch T.J.

Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K<sup>+</sup> channels involved in epilepsy. J. Biol. Chem. 2000 May 5;275(18):13343-8.

Piwon N., Günther W., Schwake M., Bösl MR. und Jentsch T.J.

ClC-5 Cl<sup>-</sup>-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. Nature. 2000 Nov 16;408(6810):369-73.