

2 Literaturübersicht

2.1 Hintergrund: Biomedizinische Relevanz von Anionenkanälen

Anionenkanäle stellen eine strukturell heterogene Gruppe von Proteinen dar, die lediglich eine allgemeine funktionelle Eigenschaft teilen. Sie formen innerhalb von biologischen Membranen mit Hilfe von Transmembrandomänen eine Pore, durch die negativ geladene Ionen entlang eines elektrochemischen Gradienten diffundieren können. Da das Chloridion das häufigste Anion im Organismus ist, vermitteln diese Kanäle meistens eine Chloridleitfähigkeit (Eggermont 2004; Jentsch et al. 2002). Chloridkanäle spielen eine große physiologische Rolle bei verschiedenen Zellfunktionen wie der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase, der Regulation des Zellvolumens, transepithelialen Transportvorgängen und der Regulation der elektrischen Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen. Intrazellulär sind sie an der Volumenregulation von Zellorganellen und an der Aufrechterhaltung der Elektronenneutralität von Zellkompartimenten beteiligt (Jentsch et al. 2002). Ihre große biomedizinische Bedeutung spiegelt sich in Erkrankungen wie zum Beispiel der zystischen Fibrose und der Dentschen Erkrankung wieder, die auf einem Defekt von einzelnen Anionenkanälen beruhen (sogenannte „*channelopathies*“, Jentsch et al. 2002). Aufgrund ihres Öffnungsmechanismus lassen sich Chloridkanäle in fünf Untergruppen unterteilen:

- 1) Liganden-gesteuerte Kanäle, wie die GABA- und Glycin-Rezeptoren, öffnen sich nach Bindung von extrazellulären Liganden.
- 2) Die Chloridkanäle der ClC-Familie zeigen einen spannungsabhängigen Öffnungsmechanismus.
- 3) Die cAMP-aktivierten Chloridkanäle (z.B. der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) werden durch intrazelluläre Phosphorylierung reguliert.
- 4) Durch Zellschwellung wird eine charakteristische Chloridleitfähigkeit induziert, dessen verantwortlicher Kanal als volumenregulierter Anionkanal (engl. *volume-regulated anion channel*, VRAC) bezeichnet wird.
- 5) Außerdem wird eine typische Chloridleitfähigkeit durch intrazelluläres Kalzium als Botenstoff induziert, welches Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeiten (engl. *calcium-activated chloride conductance*, CaCC) reguliert.

Die ersten drei Chloridkanaltypen sind auf molekularer Ebene bekannt. Forschergruppen identifizierten die Transmembrandomänen innerhalb der Proteine und untersuchten

ausführlich ihre Kanaleigenschaften und ihre physiologischen Funktionen (Jentsch et al. 2002). Die molekulare Identität der beiden anderen Chloridleitfähigkeiten ist jedoch bislang noch weitgehend ungeklärt (Eggermont 2004). Die vorliegende Arbeit nimmt deshalb bewusst das Beispiel der fünften Untergruppe, CaCC, in den Blick. Im Folgenden werden potentielle Kandidatenproteine der CaCC vorgestellt und diskutiert. Derzeit werden vier mögliche molekulare Kandidaten für die Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit diskutiert. Neben einem Mitglied der Chloridkanalfamilie CIC, CLC-3, der Bestrophin-Familie und den Tweety-Proteinen sind die CLCA-Proteine mögliche Kandidaten für diese CaCC (Hartzell et al. 2005).

2.2 Die Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit (CaCC)

Eine endogene, Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit (CaCC) wird in vielen verschiedenen Zelltypen gefunden. In epithelialen Zellen spielen sie beim transepithelialen Transport, insbesondere bei der Sekretion von Chlorid und Wasser, eine große Rolle. In Nerven- und Muskelzellen liegt ihre physiologische Bedeutung in der Vermittlung der Erregbarkeit dieser Zellen und in olfaktorischen Zellen in der Signaltransduktion (Hartzell et al. 2005). Die CaCC ist charakterisiert durch folgende Eigenschaften: Sie wird aktiviert durch zytosolisches Kalzium und sie stellt eine zeit- und spannungsabhängige Leitfähigkeit dar. Ihr Stromstärke/Spannungsverhältnis (I/V) ist nach außen gerichtet. Das bedeutet, dass sich der Anionenstrom vom Inneren der Zelle nach außen bewegt. Des Weiteren kann die Leitfähigkeit unter anderem durch 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonsäure (DIDS), durch 5-Nitro-2-(3-Phenyl-Propyl-Amino)-Benzoessäure (NPPB) und durch Tamoxifen blockiert werden. Die Leitfähigkeit ist jedoch nicht sensitiv gegenüber Dithiothreitol (DTT, Eggermont 2004). Auf der Basis von elektrophysiologischen Charakteristika kann die Leitfähigkeit in vier große Gruppen unterteilt werden: Es handelt sich um CaCCs mit einer niedrigen Leitfähigkeit von 1-3 pS (Takahashi et al. 1987), mit einer mittleren Leitfähigkeit von 8 pS (Koumi et al. 1994; Nilius et al. 1997), mit einer mittleren Leitfähigkeit von 15 pS (Morris und Frizzell 1993; Schlenker und Fitz 1996) und mit einer hohen Leitfähigkeit von 40-50 pS (Nishimoto et al. 1991).

Neben Kalzium als Regulator werden einige CaCCs durch Phosphorylierung durch die Kalzium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMK II) reguliert (Worrell und Frizzell 1991). Dies trifft aber nicht für alle CaCC zu (Wang und Kotlikoff 1997).

2.3 CIC-3 als Kandidat für die CaCC

Ein Mitglied der CIC-Anionenkanäle, CIC-3, ist zuerst als ein Chloridkanal identifiziert worden, der durch Zellschwellung reguliert wird (Duan et al. 1997). In einem CIC-3-Knock-out Mausmodell (Stobrawa et al. 2001) konnte jedoch gezeigt werden, dass die durch Zellschwellung induzierte Leitfähigkeit unverändert bleibt, während hingegen die Ansäuerung von synaptischen Vesikeln, die ebenfalls eine Chloridleitfähigkeit erfordert, gestört ist.

Jüngere Untersuchungen zeigten, dass CIC-3 ein Kalzium-abhängiger Chloridkanal zu sein scheint, der durch CaMK II aktiviert wird (Huang et al. 2001; Robinson et al. 2004). Diese Beobachtung konnte allerdings nicht in CIC-3-Knock-out Mäusen bestätigt werden, da die CaCC darin nicht reduziert war (Jentsch et al. 2002).

2.4 Die Bestrophin-Familie als Kandidat für die CaCC

Die Bestrophin-Proteine stellen eine weitere Familie von Chloridkanälen dar (Sun et al. 2002). Diese Proteine rufen in transfizierten HEK293 Zellen eine Chloridleitfähigkeit hervor, die durch physiologische Kalziumkonzentrationen stimuliert wird (Qu et al. 2003; Tsunenari et al. 2003). Außerdem konnten durch gezielte Mutagenese in der zweiten Transmembrandomäne die Anionenselektivität und die Leitfähigkeit des Kanals verändert werden (Qu et al. 2004; Qu und Hartzell 2004). Jedoch gibt es zwischen der klassischen CaCC und der durch die Bestrophin-Proteine hervorgerufenen Leitfähigkeit Unterschiede: Bestrophine zeigen nicht die typische spannungsabhängige und nach außen gerichtete Leitfähigkeit (Hartzell et al. 2005).

2.5 Tweety als Kandidat für die CaCC

Zwei menschliche Gene (hTTYH2 und hTTYH3), die eine hohe Homologie zu den „tweety“ genannten Genen im *Drosophila* Flugunfähigkeitsloкус aufweisen, zeigen eine Kalzium-regulierte Chloridleitfähigkeit von 260 pS. Ein verwandtes Gen, hTTYH1, kodiert jedoch für einen Kanal, der nicht durch Kalzium reguliert ist (Suzuki und Mizuno 2004).

2.6 Die Familie der CLCA-Proteine: Kandidaten für die CaCC?

Die seit etwa zehn Jahren bekannten CLCA-Proteine bilden eine funktionell und strukturell sehr komplexe Gruppe, die in verschiedenen Epithelzellen, Endothelzellen und anderen Zelltypen exprimiert wird. Der Name Kalzium-aktivierter Chloridkanal (engl. *chloride channel, calcium-activated*; CLCA) leitet sich von ihrer Eigenschaft ab, nach heterologer Expression eine Kalzium-abhängige Chloridleitfähigkeit zu induzieren.

In den frühen Neunzigern wurden zwei Proteine unabhängig von einander in zwei unterschiedlichen Laboren entdeckt, die die Gründungsmitglieder dieser komplexen Familie bilden. Die unterschiedlichen Forschungsschwerpunkte der beiden Labore verdeutlicht die Komplexität dieser Proteinfamilie: Während die eine Forschergruppe nach einem Anionenkanal suchte, wollte die andere einen Adhäsionsrezeptor für metastasierende Tumorzellen identifizieren (Cunningham et al. 1995; Elble et al. 1997).

Beide Forschergruppen isolierten nahezu zeitgleich jeweils ein Protein beim Rind. Das bCLCA1-Protein wurde von der Kanalforschergruppe aus luminalen Vesikeln von Rinder-Trachealepithelzellen mit Hilfe von klassischen biochemischen Techniken isoliert. Das aufgereinigte Protein zeigte eine neue Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit (Ran und Benos 1992, 1991; Ran et al. 1992). Mit Hilfe von gegen das Protein generierten polyklonalen Antikörpern wurde eine Rinder-Tracheal cDNA-Expressions-Bibliothek durchgemustert und die dazugehörige cDNA isoliert (Cunningham et al. 1995). Die andere Forschergruppe isolierte das bCLCA2-Protein alias Lungen-Endothelzelladhäsionsmolekül-1 (engl. *lung endothelial cell adhesion molecule-1*, Lu-ECAM-1) aus Aorten-Endothelzellen eines Rindes mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers und klonierte die cDNA (Elble et al. 1997; Zhu und Pauli 1991). Der Antikörper verhinderte im Blockierungsversuch die Adhäsion von metastasierenden Melanomzellen an Endothelzellen (Zhu und Pauli 1991). Bemerkenswerterweise zeigten diese vermeintlich unterschiedlichen Proteine eine enge Verwandtschaft von 92% cDNA-Identität und 88% Aminosäuren-Identität. Eine neue Genfamilie war entdeckt.

Nach der Entdeckung der ersten Mitglieder beim Rind sind im Laufe der Zeit bei diversen Spezies (darunter Mensch, Maus, Schwein, Pferd und Ratte) eng verwandte Proteine identifiziert, kloniert und zum Teil charakterisiert worden. Zurzeit sind 16 Mitglieder bekannt. Die CLCA-Familienmitglieder werden nach der Spezies, aus der sie kloniert wurden, benannt (engl. b, bovine; m, murine; h, human; p, porcine; e, equine und r, rat) und in chronologischer Reihenfolge ihrer Entdeckung beziffert; so ist mCLCA3 der dritte entdeckte Vertreter der

Spezies Maus. Der phylogenetische Baum (Abb. 1) zeigt, dass die Vertreter eCLCA1, pCLCA1, hCLCA1 und mCLCA3 einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen und in einem phylogenetischen Cluster lokalisiert sind. Jedoch gibt es innerhalb der CLCA-Familie im Speziesvergleich insbesondere zwischen Mensch und Maus auffallende Unterschiede. So zeigen einige Homologe keinen orthologen Vertreter in einer anderen Spezies (z.B. sechs Vertreter bei der Maus, aber nur vier Vertreter beim Menschen; Ritzka et al. 2003). Dies deutet auf eine zum Teil intra-speziesspezifische Evolution der CLCA-Familie, die möglicherweise auch mit strukturellen und funktionellen Unterschieden zwischen den Orthologen der Spezies einhergehen könnte.

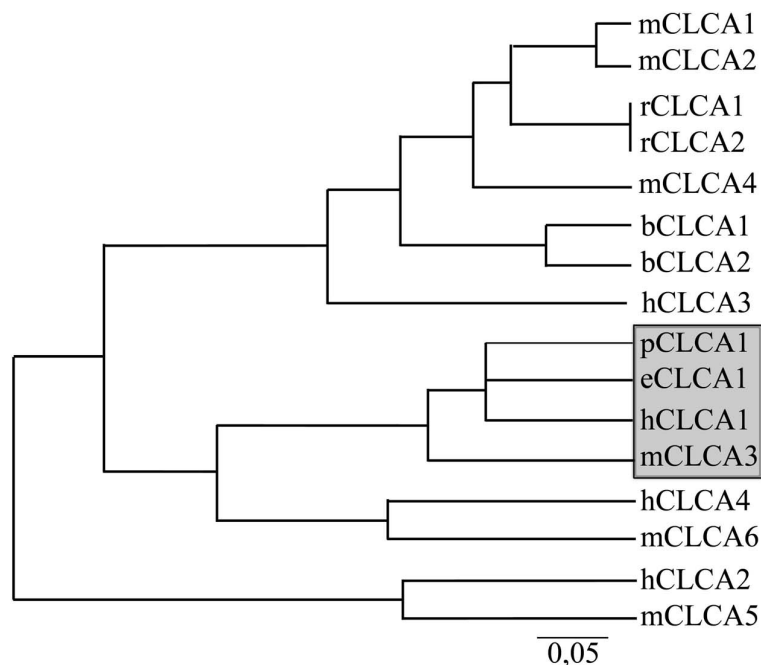


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der bislang bekannten Mitglieder der CLCA-Familie. Die in dieser Arbeit untersuchten eCLCA1- und mCLCA3-Proteine bilden zusammen mit ihren Orthologen des Schweins, pCLCA1, und des Menschen, hCLCA1, ein phylogenetisches Cluster (grau unterlegt). Der Maßstab zeigt eine Aminosäuresequenzdiversität von 5%.

Während die CLCA-Vertreter durchaus viele Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz und in der intrazellulären Prozessierung aufweisen, scheinen hingegen wichtige strukturelle Unterschiede zwischen einzelnen CLCA-Vertretern zu bestehen. Außerdem zeigen sie ein unterschiedliches Expressionsmuster im Gewebe. Bisherige Erkenntnisse zu ihrer biomedizinischen Bedeutung bei Krankheiten mit gestörter sekretorischer Funktion, ihrer

funktionellen Eigenschaften, ihrer Proteinstruktur und Prozessierung und ihrer Gewebeexpression werden im Folgenden dargestellt.

2.7 Biomedizinische Bedeutung

Einige CLCA-Vertreter scheinen eine große biomedizinische Relevanz bei verschiedenen Krankheitsprozessen mit sekretorischen Dysfunktionen zu haben. Zu diesen Erkrankungen zählen die zystische Fibrose (Mukoviszidose), Asthma und die chronisch-obstruktive Bronchiolitis (COB) des Pferdes.

2.7.1 CLCA und zystische Fibrose

Die zystische Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) ist eine letale, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die auf einem genetischen Defekt des CFTR-Chloridkanals beruht (Riordan et al. 1989). Das defekte oder zu gering exprimierte CFTR-Protein nimmt seine Aufgabe als apikaler Chloridkanal nicht mehr wahr und dies führt zu einer gestörten Flüssigkeitssekretion und zu einer erhöhten Natriumabsorption. Die Folge ist eine systemische Exokrinopathie, die besonders den Atmungstrakt und den Darm betrifft. Der sezernierte Schleim ist sehr viskös und sammelt sich in den Hohlorganen an. Es kommt zu einer unzureichenden mukoziliären Reinigung (*clearance*) und zu einer erleichterten bakteriellen Kolonisierung des Atmungstraktes. Die massiven Lungenveränderungen führen bei den meisten jungen Erwachsenen, die an CF leiden, schließlich zum Tod (Schwiebert et al. 1998). Bei fünf bis zehn Prozent der erkrankten Neugeborenen findet man einen Mekonium-Ileus im Darm (Welsh et al. 1995). Im Gegensatz zu den pathologischen Veränderungen beim Menschen stehen in den meisten Mausmodellen, in denen das CFTR-Gen ausgeknockt oder verändert wurde, Darmveränderungen im Vordergrund, während die Lungenpathologie keine oder nur eine geringe Rolle spielt. Im Darm finden sich eine Becherzellhyperplasie und eine starke Akkumulation von zähem Schleim, welche zu schweren Ileum-Obstruktionen führt (Grubb und Boucher 1999). Interessanterweise scheint eine Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit ein Modulator der CF zu sein, in dem sie die defekte Chloridleitfähigkeit zum Teil kompensieren kann und als modulierender Faktor das Krankheitsbild mitbestimmt. Dies zeigt sich in einem milderem Phänotyp und in einer verlängerten Lebensdauer bei CF-Modellen mit einer stärkeren CaCC-Aktivität (Clarke et al. 1994; Grubb und Boucher 1999; Rozmahel et al. 1996). Die Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit ist sowohl bei einem Teil der CF-Patienten als auch in einigen

Mausmodellen erhöht und scheint sensitiv gegenüber DIDS zu sein (Berschneider et al. 1988; Bronsveld et al. 2000; Taylor et al. 1988; Willumsen und Boucher 1989). Die molekulare Identität dieses sogenannten „alternativen“ Chloridkanals ist bislang unbekannt. Aufgrund ihrer Eigenschaft, eine Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit zu induzieren, und ihres überlappenden Expressionsmusters im Organismus mit dem des CFTR-Kanals sind einige Vertreter der CLCA-Genfamilie gute Kandidaten für diese Kalzium-aktivierte, „alternative“ Chloridleitfähigkeit (Gruber et al. 1998a; Gruber et al. 1998b; Leverkoehne und Gruber 2002; Leverkoehne et al. 2006). Verschiedene Studien unterstützen diese Hypothese. So ist hCLCA1 im Atmungstrakt von CF-Patienten verstärkt exprimiert (Hauber et al. 2004). Außerdem zeigte eine Studie, dass der menschliche CLCA-Genlocus als genetischer Modulator der residuellen, nicht-CFTR abhängigen Chloridleitfähigkeit im Darm von CF-Patienten eine Hauptrolle spielt (Ritzka et al. 2004). Untersuchungen an CF-Mausmodellen belegen, dass auch die murinen CLCA Vertreter als Modulatoren des CF-Phänotyps dienen könnten. CF-Mäuse mit bestimmtem genetischen Hintergrund (BALB/c), die mehr mCLCA3 exprimieren, zeigen keine Lungenpathologie, während andere Stämme (C57BL/6), die eine geringere mCLCA3-Expression aufweisen eine spontane Lungenpathologie entwickeln (Chung et al. 2001). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen konnten mCLCA3 und mCLCA2 im Dünndarm in verschiedenen CF-Modellen bei der Maus mittels *real time* RT-PCR deutlich überexprimiert nachgewiesen werden (Leverkoehne et al. 2006). Die Autoren schlussfolgerten, dass mCLCA3 und mCLCA2 als Modulatoren des interstinalen CF-Phänotyps agieren könnten. Studien an anderen Geweben wie Dickdarm und Lunge von CF-Modellen bei der Maus konnten auf Proteinebene zeigen, dass das mCLCA3-Protein mittels *blue native-SDS PAGE* weniger nachweisbar ist (Brouillard et al. 2005). Es liegen bislang keine vergleichenden Untersuchungen vor, ob möglicherweise durch eine negative Rückkopplung weniger Protein synthetisiert wird.

Zusammenfassend scheinen einige CLCA Proteine, insbesondere hCLCA1 beim Mensch und mCLCA3 bei der Maus aussichtsreiche Kandidaten für die modulierende, „alternative“ Chloridleitfähigkeit bei CF-Patienten zu sein. Derzeit liegen jedoch keine funktionellen Studien vor, wie dies durch die Proteine bewirkt wird.

2.7.2 CLCA und Asthma

Asthma ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, die auf einer komplexen Hypersensitivitätsreaktion des Atemwegsepithels beruht (McFadden und Gilbert 1992). Die

charakteristischen Eigenschaften sind neben der Atemwegshypersensitivität (engl. *airway hyperresponsiveness*, AHR) eine Becherzellmetaplasie und eine Schleimüberproduktion.

Bei der Suche nach Genen, die bevorzugt in Lungen mit bronchialer Hyperreaktivität exprimiert werden, identifizierten Wissenschaftler hCLCA1 und mCLCA3 (Hoshino et al. 2002; Nakanishi et al. 2001). So ist mCLCA3 in Lungengeweben von AHR-Mausmodellen signifikant hochreguliert. Außerdem konnte die Mukusüberproduktion durch Unterdrückung der mCLCA3 Expression mittels adenoviraler *antisense* Strategie reduziert werden. Analog dazu zeigten die Mäuse eine erhebliche Verschlimmerung der Asthmasymptomatik einschließlich einer verstärkten Schleimproduktion nach Infektion mit adenoviralen Vektoren, die den mCLCA3 *sense* Strang überexprimierten. Der stimulierende Effekt von mCLCA3 auf die Mukusproduktion wurde ebenfalls im *in vitro*-Modell nachgewiesen. Nach Transfektion der mukoepidermoiden Zelllinie NCI-H292 mit mCLCA3 oder seinem Orthologen beim Menschen, hCLCA1, zeigten die Zellen eine verstärkte Mukusproduktion (Nakanishi et al. 2001). Eine Hochregulation von mCLCA3 wurde auch in transgenen Mäusen, die Interleukin 9 (IL-9) überexprimieren, gefunden (Zhou et al. 2001). Diese Mäuse entwickeln einen Asthma-ähnlichen Phänotyp. Als die Forscher Wildtyp Mäuse mit IL-9, -13, oder -4, also T-Helferzell (Th) 2 Zytokinen, behandelten, erhöhte sich die mCLCA3 mRNA-Expression. Somit konnte belegt werden, dass die mCLCA3 Genexpression stark assoziiert ist mit Th2 T Zell Zytokinsignalen. Die Schleiminduktion in NCI-H292 Zellen, die mit hCLCA1 transfiziert wurden, konnte von dieser Arbeitsgruppe bestätigt werden (Zhou et al. 2002). Außerdem blockierte Nifluminsäure (engl. *niflumic acid*, NFA), ein Anionenkanalblocker, diese Schleimproduktion. Diese Ergebnisse wurden durch *in vivo*-Versuche am Asthma-Mausmodell ergänzt. Nach der Behandlung mit NFA zeigten die Mäuse neben einer reduzierten Entzündungsreaktion eine signifikante Reduktion der Becherzellmetaplasie und der Schleimproduktion. Diese Daten sprechen dafür, dass mCLCA3 und hCLCA1 eine Schlüsselrolle in der Mukusüberproduktion beim Asthma spielen. Komplexe Lungenkrankungen wie Asthma zeigen stets zwei Krankheitsmerkmale, die AHR und die Becherzellmetaplasie. Letztere ist bei betroffenen Patienten unterschiedlich ausgeprägt. Um die den beiden Merkmalen zugrunde liegenden Mechanismen besser untersuchen zu können, ist es einer Forschergruppe gelungen, die beiden charakteristischen Krankheitsmerkmale in einem Mausmodell voneinander zu trennen (Patel et al. 2006). Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die mCLCA3-Expression ausschließlich mit der Becherzellmetaplasie, nicht aber mit der AHR assoziiert war. Außerdem reichte ein mCLCA3-Gentransfer in Lungenepithelien aus, um eine Becherzellmetaplasie, aber keine AHR

hervorzurufen (Patel et al. 2006). Diese Studie zeigte eindrucksvoll, dass dem mCLCA3-Protein eine entscheidende Bedeutung bei der Becherzellmetaplasie des Asthmas zukommt. In verschiedenen mCLCA3-Knock-out Mausmodellen wurde die Rolle von mCLCA3 im Hinblick auf die Becherzellmetaplasie und die Schleimüberproduktion untersucht. In mCLCA3-Knock-out Mäusen mit dem genetischen Hintergrund 129/C57BL/6 wurde sowohl ohne allergische Stimulierung als auch nach allergischer Stimulierung der Mäuse keine Reduktion der Anzahl der Becherzellen und der Schleimproduktion gefunden (Robichaud et al. 2005). Die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass mCLCA3 nicht essentiell für die Schleimüberproduktion im Mausmodell für allergisches Asthma ist. Es fand sich eine erhöhte Muc5AC Produktion (ein Proteinmarker für die Schleimproduktion, Nakanishi et al. 2001) in den Knock-out Tieren. Ob mCLCA3 möglicherweise eine Rolle im Ab- und Umbau des Schleims spielt, ist noch nicht geklärt (siehe auch Kapitel **2.8.4**). Untersuchungen einer zweiten Arbeitsgruppe an mCLCA3-Knock-out Mäusen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J zeigten ebenfalls keine phänotypischen Unterschiede im Hinblick auf die Becherzellmetaplasie (Patel et al. 2006). In dieser Studie konnte aufschlussreich ein weiteres Mitglied der CLCA-Familie bei der Maus, namentlich mCLCA5, identifiziert werden, welches ebenfalls eine Becherzellmetaplasie induzieren konnte. Somit kann möglicherweise die Funktion einzelner CLCA-Mitglieder durch andere Mitglieder ersetzt werden. In einer dritten Studie an mCLCA3-Knock-out Mäusen mit dem genetischen Hintergrund 129SvEvBrd zeigten die Tiere, die das Protein nicht mehr exprimierten, eine weniger ausgeprägte Becherzellvermehrung und eine niedrigere Schleimproduktion nach allergischer Stimulierung (Long et al. 2006). Der Unterschied in den Studien liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Antwort der verschiedenen Mausstämme auf eine allergische Stimulierung (Whitehead et al. 2003) und begründet damit die Annahme der Existenz weiterer genetischer Modulatoren.

In den letzten Jahren kristallisierte sich immer stärker heraus, dass mCLCA3 eine Schlüsselrolle beim Asthma, insbesondere bei der Becherzellmetaplasie und der Schleimüberproduktion, spielt. Jedoch ist auch bei dieser Erkrankung nicht geklärt, wie das Protein seine Funktion erfüllt und welche Rolle dabei die induzierte Chloridleitfähigkeit spielt.

2.7.3 CLCA und chronisch-obstruktive Bronchiolitis des Pferdes

Die chronisch-obstruktive Bronchiolitis (COB) des Pferdes ist die einzige spontan auftretende Erkrankung bei Tieren, die große klinische, funktionelle und pathologische Ähnlichkeiten zum menschlichen Asthma und der chronischen, obstruktiven Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) aufweist (Bice et al. 2000; Snapper 1986). Die Ursache der Erkrankung liegt wahrscheinlich in einer Überempfindlichkeitsreaktion auf inhalierte Antigene (Davis und Rush 2002; Leguillette 2003). Die charakteristischen pathologischen Merkmale sind neben einer peribronchiolären, lymphozytären Infiltration und eines Bronchospasmus eine Becherzellmetaplasie mit einer massiven Mukusüberproduktion in den Bronchiolen. Der erste CLCA-Vertreter beim Pferd (eCLCA1) ist bei COB-kranken Tieren stark überexprimiert (Anton et al. 2005). Das eCLCA1-Protein scheint die gleiche Rolle beim COB-kranken Pferd einzunehmen wie hCLCA1 beim asthmakranken Menschen und mCLCA3 im Mausmodell für diese Erkrankung (Nakanishi et al. 2001). Das Pferd wird als ein passendes Forschungsmodell für das humane Asthma und die COPD diskutiert (Bice et al. 2000; Snapper 1986), insbesondere für die Untersuchung der Rolle der CLCA-Mitglieder bei diesen Erkrankungen (Anton et al. 2005). Auch bei COB fehlen funktionelle und strukturelle Daten, wie das Protein eCLCA1 seine Rolle erfüllt.

2.8 Funktionelle Eigenschaften der CLCA-Proteine

2.8.1 CLCA- Proteine und Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit

Eine bedeutende Eigenschaft der CLCA-Proteine, die dieser Familie auch ihren Namen gegeben hat, ist die Induktion einer Chloridleitfähigkeit, die durch Kalzium als intrazellulären Botenstoff aktiviert wird.

Die ersten elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit bCLCA1 durchgeführt (Ran und Benos 1992, 1991; Ran et al. 1992). Als natives Protein wurde bCLCA1 aus Trachealepithelzellen des Rindes isoliert und zeigte eine Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit nach Inkorporation in künstliche Liposomen, fusioniert zu einer Phospholipid-Doppelschicht. Das Protein zeigte eine Leitfähigkeit von 25 bis 30 pS, ein Anion-Selektionsprofil von $\Gamma > \text{Cl}^-$ und eine Hemmung durch DIDS und DTT. Das aufgereinigte Protein konnte *in vitro* durch CaMKII phosphoryliert werden. Neben einer Erhöhung der Kanalaktivität durch Kalzium wurde die Leitfähigkeit auch durch CaMKII gesteigert. Nach

der Klonierung des offenen Leserahmens (engl. *open reading frame*, ORF) von bCLCA1 wurde in *Xenopus* Oozyten eine zeitunabhängige und nach außen gerichtete Leitfähigkeit ohne Zugabe von Kalzium beobachtet. Diese wurde durch DIDS und DTT teilweise gehemmt, jedoch war sie nicht sensitiv gegenüber Nifluminsäure. In COS-7 Zellen war die Leitfähigkeit linear und wurde nur nach Zugabe von Kalzium beobachtet (Cunningham et al. 1995). Auch nach heterologer Expression von verschiedenen CLCA-Vertretern in Säugertierzellen (HEK 293) wurde mittels Patch-Clamp-Technik ein nach außen gerichteter Chlorid-Ionenstrom gemessen. Die Membranleitfähigkeit konnte sowohl durch Zugabe des Kalzium-Ionophors Ionomycin als auch durch Zugabe von Kalzium aktiviert werden. Der Ionenstrom wurde durch einige bekannte Chloridkanalblocker (DIDS, Tamoxifen, Nifluminsäure) gehemmt. Außerdem erfolgte eine Hemmung durch DTT (Gruber et al. 2000). Die elektrophysiologischen Eigenschaften der CLCA-Proteine zeigen viele Übereinstimmungen mit der endogen vorkommenden CaCC (Eggermont 2004). Beide Leitfähigkeiten werden durch Kalzium reguliert. Sie zeigen eine Anion-Selektivität und eine nach außen gerichtete Leitfähigkeit. Beide Leitfähigkeiten werden durch DIDS gehemmt. Jedoch gibt es einige phänotypische Unterschiede zwischen der CaCC, die in zahlreichen Geweben gemessen wird, und der durch die CLCA-Proteine induzierten Leitfähigkeit in heterolog transfizierten Säugertierzellen. Die Kalziumkonzentration, die in den CLCA-Experimenten eingesetzt wurde, liegt weit über den physiologischen, intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Fast alle Untersuchungen zeigten ein zeit- und spannungsunabhängiges Verhalten der mittels CLCA-Expression hervorgerufenen Chloridleitfähigkeit, während die endogene Leitfähigkeit ein zeit- und spannungsabhängiges Verhalten aufweist. Die endogen vorkommende Leitfähigkeit wird nicht durch DTT gehemmt. In *Ehrlich ascites tumor cells* der Maus wurde eine endogene CaCC gemessen. Jedoch konnte kein bekannter Vertreter der murinen CLCA mittels RT-PCR amplifiziert werden (Papassotiriou et al. 2001).

Das pCLCA1-Protein ist der bislang erste Vertreter, dessen Ionenleitfähigkeitsverhalten in der epithelialen Zelllinie Caco-2 untersucht wurde. Er induziert neben einer Kalzium-aktivierten Chloridleitfähigkeit auch eine cAMP-abhängige Chloridleitfähigkeit (Loewen et al. 2002).

Sowohl die endogene CaCC als auch die pCLCA1-induzierte Kalzium-sensitive Chloridleitfähigkeit gehen in reifen Caco-2-Zellen verloren. Die pCLCA1 mRNA- und Proteinexpression bleibt aber erhalten. Außerdem bleibt während der Differenzierung der Caco-2-Zellen die durch pCLCA1 modulierte cAMP-abhängige Chloridleitfähigkeit erhalten (Loewen et al. 2004). Diese elektrophysiologischen Daten sprechen eher für einen regulatorischen

Effekt des pCLCA1-Proteins auf andere Chloridkanäle als für eine eigenständige Kanal-funktion.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die CLCA-Proteine zu den aussichtsreichsten molekularen Kandidaten für die CaCC zählen. Jedoch wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob die CLCA einen eigenständigen Kanal bilden, ein Teilprotein eines Chloridkanals oder einen Regulator eines anderen Chloridkanals darstellen (Eggermont 2004).

2.8.2 CLCA- Proteine als Adhäsionsmoleküle

Bestimmte Tumorzellarten neigen dazu, selektiv in bestimmte Organe zu metastasieren. Eine von vielen möglichen Erklärungen für diese organspezifische Metastasierung ist die Interaktion von Oberflächenmolekülen der Tumorzellen mit Adhäsionspartnern, die auf Endothelien exprimiert werden. Einige Mitglieder der CLCA-Familie können offenbar als solche Adhäsionspartner agieren. Zu diesen Vertretern zählen unter anderem bCLCA2 alias Lu-ECAM-1, mCLCA1 und hCLCA2. Das zweite CLCA-Mitglied beim Rind, bCLCA2 alias Lu-ECAM-1, wurde mit Hilfe eines Antikörpers kloniert, der das Adhäsions-rezeptor/Ligandenpaar, welches die Bindung von in die Lunge metastasierenden Melanom-zellen an Aortenendothelzellen des Rindes vermittelt, blockiert (Elble et al. 1997; Zhu et al. 1991). Das rekombinante Protein vermittelt eine Kalzium-abhängige Zelladhäsion von Melanomzellen, genau wie das immunaffinitätsaufgereinigte, native Protein. Die Adhäsion der Tumorzellen konnte durch einen Antikörper gegen bCLCA2 blockiert werden. Aufgrund dieser Funktion wurde das Protein zunächst *lung endothelial cell adhesion molecule-1* (Lu-ECAM-1) genannt (Elble et al. 1997).

Auch der zweite humane CLCA-Vertreter (hCLCA2) vermittelt eine Adhäsion von menschlichen Brustkrebszellen an das Lungenendothel. Der Interaktionspartner, welcher die Adhäsion an hCLCA2 vermittelt, konnte auf Seiten der Tumorzellen als β 4-Integrin identifiziert werden (Abdel-Ghany et al. 2001). Antikörper sowohl gegen das β 4-Integrin als auch gegen hCLCA2 verhindern die Bindung von hCLCA2-exprimierenden HEK 293 Zellen an Tumorzellen. Außerdem wird die Zelladhäsion nach spezifischer Spaltung des Ober-flächenmoleküls β 4-Integrin mit Matrilysin dramatisch reduziert. Das β 4-Bindungsmotiv der CLCA-Proteine gehört zu den Addressinen. Dieses Motiv findet sich sowohl in der amino-terminalen als auch in der carboxy-terminalen Untereinheit der CLCA-Proteine und besteht aus folgender Konsensussequenz: Phenylalanin, Serin oder Asparagin, Arginin, Isoleucin oder

Leucin oder Valin, Serin oder Threonin, Serin. Diese Sequenz findet sich bei hCLCA2, bCLCA2, mCLCA1 und mCLCA5. Bei den CLCA-Mitgliedern pCLCA1, mCLCA3 und mCLCA6 ist diese Sequenz in beiden Untereinheiten unterbrochen. Das korrespondierende Motiv des β 4-Integrins ist an einer Stelle des Proteins lokalisiert, die mit der Ligandenbindung von β -Integrinen, den sogenannten *specific determinating loop* (SDL), assoziiert ist (Abdel-Ghany et al. 2003). Die Interaktion der beiden Bindungspartner führt zu der Aktivierung einer intrazellulären Kaskade in den Tumorzellen. Nach erfolgter Bindung kommt es über die Aggregation der Fokaladhäsions-Kinase (FAK) zur Aktivierung der extrazellulär Signal regulierten Kinase (ERK). Die Aktivierung dieses intrazellulären Signalweges führt zu einer mitogenen Stimulation mit Zellproliferation (Abdel-Ghany et al. 2002).

Einige CLCA-Proteine sind somit in der Lage, zum einen mit anderen Proteinen zu interagieren, zum anderen intrazelluläre Signalwege zu aktivieren. Diese Eigenschaften könnten einen Erklärungsansatz für die Induktion der oben diskutierten Becherzellmetaplasie darstellen (siehe Kapitel 2.7.2), nämlich über die Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen.

2.8.3 CLCA- Proteine und Apoptose

Auf der Suche nach Genen, die für die Regulation der Milchdrüseninvolution verantwortlich sind, wurde das CLCA-Mitglied mCLCA2 identifiziert (Lee et al. 1999). Dieser zweite CLCA-Vertreter der Maus wird in der Involutionsphase der Milchdrüse induziert. Die Milchdrüsenzelllinie HC11 zeigt eine DNA-Degradierung und eine Induktion der mCLCA2-Expression, wenn die Zellen ausgehungert werden (Elble und Pauli 2001; Lee et al. 1999). Außerdem wird mCLCA2 in Organen stark exprimiert, die physiologisch eine hohe Apoptoserate aufweisen (Thymus, involvierende Milchdrüse; Leverkoehne et al. 2002). Übereinstimmend damit zeigten Zellen, die mit mCLCA2 transfiziert wurden, eine erhöhte Apoptoserate und eine geringere Zellüberlebensrate (Elble und Pauli 2001). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass einige Vertreter der CLCA-Familie an dem Mechanismus der Apoptoseregulation beteiligt sind.

Milchdrüsenepitheltumorzelllinien, die das zweite CLCA-Mitglied des Menschen, hCLCA2, nach Transfektion exprimieren, zeigen ein reduziertes Invasionsvermögen *in vitro* und ein reduziertes metastatisches Potential in Nacktmäusen (Gruber und Pauli 1999b). Für hCLCA2

wurde daher eine Funktion als Tumorsuppressor postuliert. Auch sein orthologer Vertreter bei der Maus, mCLCA5, zeigt Eigenschaften eines Tumorsuppressors (Beckley et al. 2004).

Der Mechanismus, der der Apoptoseinduktion oder der Tumorsuppression zu Grunde liegt, ist noch nicht geklärt. Ein typisches Kennzeichen der Apoptose ist eine intrazelluläre Ansäuerung (Gottlieb et al. 1995). Diese pH-Wert-Änderung führt zur Aktivierung der pH-sensitiven Endonuklease und schließlich zur DNA-Degradierung. Die Anionenkanäle CFTR und ORCC können die intrazelluläre pH-Wert-Erniedrigung mit nachfolgender Apoptose vermitteln (Gottlieb und Dosanjh 1996; Szabo et al. 1998). Möglicherweise liegt ein ähnlicher Mechanismus bei den CLCA-Proteinen zu Grunde.

2.8.4 CLCA- Proteine als mögliche Proteasen

Bioinformatische Analysen der CLCA-Familie identifizierten eine Metall-abhängige Hydrolasedomäne in Form des HExxH-Motiv (Pawlowski et al. 2006). Diese Hydrolasedomäne hat eine große Ähnlichkeit mit Zink-Metalloproteasen, besonders mit den Matrixinen. Dies sind proteolytische Enzyme, die Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen. Ein Aminosäureaustausch in der Hydrolasedomäne führte zu einer veränderten proteolytischen Prozessierung: Es erfolgte keine für die CLCA-Proteine charakteristische Spaltung des Vorläuferproteins in seine zwei Untereinheiten.

Bislang gibt es keine funktionellen Daten, die eine mögliche Rolle der CLCA-Proteine als Proteasen untermauern. Insbesondere liegen keine Enzym-Substrat Untersuchungen vor, die entscheidend für die Identifikation der CLCA-Proteine als Proteasen wären.

2.9 CLCA-Proteinstruktur und Prozessierung

Die Proteine der CLCA-Familie bestehen aus 900 bis 940 Aminosäuren. Die einzelnen Vertreter zeigen Gemeinsamkeiten in ihrer Primärstruktur und ihrer posttranslationalen Prozessierung (Gruber et al. 2000). Alle Vertreter besitzen eine stark hydrophobe, aminoterminal Signalsequenz als „Eintrittskarte“ in das endoplasmatische Retikulum (ER). Die CLCA-Vertreter besitzen zwischen fünf und acht Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen. Mittels *in vitro*-Translation konnte für nahezu alle Vertreter gezeigt werden, dass die CLCA-Proteine zu einem 120 bis 130 kDa Glykoprotein glykosyliert werden (Anton et al. 2005; Cunningham et al. 1995; Elble et al. 1997; Evans et al. 2004; Gandhi et al. 1998; Gruber et al. 1998a; Gruber und Pauli 1999a; Gruber et al. 1999; Leverkoehne und Gruber

2002). Ein besonderes, gemeinsames Merkmal ist die posttranslationale Spaltung des 120 bis 130 kDa großen Vorläuferproteins in zwei Spaltprodukte: eine größere, 80 bis 90 kDa große, amino-terminale und eine kleinere, 30 bis 40 kDa große, carboxy-terminale Untereinheit. Diese charakteristische Spaltung wurde zuerst für bCLCA1 beschrieben (Cunningham et al. 1995). Umfangreiche, biochemische Analysen an bCLCA2, alias Lu-ECAM-1, konnten dieses Phänomen bestätigen und die Spaltungsstelle mittels Edman-Analyse an der Aminosäure 681 lokalisieren (Elble et al. 1997). Für das dritte CLCA-Mitglied der Maus, mCLCA3, konnte die Spaltungsstelle an der Aminosäure 686 identifiziert werden (Brouillard et al. 2005). Die Aminosäuresequenz an der Spaltungsstelle ist keine konservierte Sequenz innerhalb der CLCA-Familie, so dass die Spaltung wahrscheinlich durch die Struktur des Vorläuferproteins bestimmt wird. Diese charakteristische Spaltung konnte für nahezu alle CLCA-Vertreter der verschiedenen Spezies sowohl in verschiedenen Zellsystemen (HEK293, CHO, COS-7, tsA201, Caco-2) als auch zum Teil *in vivo* bestätigt werden (Anton et al. 2005; Brouillard et al. 2005; Elble et al. 2002; Elble und Pauli 2001; Elble et al. 1997; Evans et al. 2004; Gabriel et al. 1992; Gandhi et al. 1998; Gruber et al. 1998a; Gruber et al. 1999; Leverkoehne und Gruber 2002; Loewen et al. 2002; Racette et al. 1996; Ran et al. 1992; Yamazaki et al. 2005). Da die Spaltung in den verschiedensten Zellsystemen erfolgt, scheint sie ein ubiquitäres Phänomen zu sein. Bemerkenswert war, dass beide Spaltprodukte im Fall von hCLCA1 ko-immunpräzipitiert werden konnten und somit miteinander assoziiert blieben (Gruber et al. 1998a). Jedoch konnte diese enge Assoziation der gespaltenen Untereinheiten nicht beim zweiten CLCA-Mitglied des Menschen gezeigt werden (Gruber et al. 1999). Die Natur und die Bedeutung der Assoziation der Spaltprodukte bei hCLCA1 sind noch unklar. Die Ursache und die Bedeutung dieser posttranslationalen Spaltung sind bislang weitgehend unbekannt. Gezielte Mutagenese in der HEXxH Domäne, welche eine große Ähnlichkeit mit Metalloproteasen aufweist (siehe auch Kapitel 2.8.4), führten zu einer veränderten Prozessierung des hCLCA1-Vorläuferproteins. Das 100 kDa große Vorläuferprotein wird dabei nicht in seine Untereinheiten gespalten (Pawlowski et al. 2006). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die proteolytische Spaltung ein autoproteolytischer Prozess sein könnte. Interessanterweise konnte in zwei unabhängigen Untersuchungen für mCLCA3 ein zweites, amino-terminales Spaltprodukt von circa 45 kDa im Kolon der Maus nachgewiesen werden (Brouillard et al. 2005; Leverkoehne und Gruber 2002). Ob eine zweite Spaltungsstelle innerhalb des Proteins existiert oder ob diese Spaltung ein spezifisches Phänomen im Darmabschnitt Kolon darstellt, ist bislang nicht eindeutig bekannt.

Ein weiteres, besonderes Merkmal aller CLCA-Proteine ist eine um Aminosäure 200 konservierte cysteinreiche Region, die einem Zinkfingermotiv ähnelt: Cys-x₁₂-Cys-x₄-Cys-x₄-Cys-x₁₂-Cys (Cys, Cystein; x, beliebige Aminosäure). Eine Ausnahme im Muster dieses Motivs zeigt jedoch hCLCA2: Cys-x₉-Cys-x₄-Cys-x₄-Cys-x₉-Cys (Gruber et al. 2000). Die funktionelle und strukturelle Signifikanz dieser Sequenz ist bislang nicht bekannt. Ein weiteres Motiv, welches in der CLCA-Familie hoch konserviert ist, ist das HExxH-Motiv, welches bei der Bindung von Metallionen, besonders von Zink, eine bedeutende Rolle spielt (Agnel et al. 1999). Erste Analysen deuten daraufhin, dass die CLCA-Proteine mit Hilfe dieses Motivs die Funktion von Metalloproteinasen erfüllen könnten (Pawlowski et al. 2006). Weitere Sequenzmotive innerhalb der CLCA-Primärstruktur sind Phosphorylierungsstellen und Erkennungsmotive für die Kalzium/Kalmodulin-abhängige Kinase II. Die Wissenschaftler postulieren, dass diese Stellen zum Teil intrazellulär lokalisiert sind und an der Regulation der Kanalfunktion beteiligt sind (Gruber et al. 2000). Die Aminosäuresequenz der meisten CLCA-Proteine wurde mit Hilfe des Kyte-Doolittle Algorithmus (Kyte und Doolittle 1982) nach potentiellen hydrophoben Transmembrandomänen durchgemustert. So wurden neben einer stark hydrophoben, amino-terminalen Region vier weitere hydrophobe Regionen innerhalb der meisten CLCA-Proteine identifiziert (Cunningham et al. 1995; Elble et al. 1997; Gandhi et al. 1998; Gruber et al. 1998a; Jeong et al. 2005). Bei hCLCA2 wurde eine fünfte, stark hydrophobe, carboxy-terminale Sequenz lokalisiert (Gruber et al. 1999). Die erste, hydrophobe, amino-terminale Region zeigt Übereinstimmungen mit einer abspaltbaren Signalsequenz zum Import ins endoplasmatische Retikulum (Elble et al. 1997). Die anderen vier oder fünf hydrophoben Domänen wurden als potentielle Transmembrananker interpretiert. Jedoch zeigten andere computergestützte Analysen für mCLCA1 nur zwei mögliche Transmembrandomänen (TMPRED Software) oder sogar nur eine carboxy-terminale Transmembrandomäne (PSORT II und SOSUI) auf (Romio et al. 1999). Basierend auf Sequenzhomologien zur α_2 -Integrin Kollagen Rezeptordomäne wurde mit Hilfe der SMART-Vorhersage ein alternatives Ein-Transmembranmodell aufgestellt. Es wird vermutet, dass hCLCA1 eine zentrale, extrazelluläre von-Willebrandt Faktordomäne besitzt. Die einzige Transmembrandomäne ist am carboxy-terminalen Ende des amino-terminalen Spaltprodukts lokalisiert. Das carboxy-terminale Spaltprodukt bleibt extrazellulär mit der Plasmamembran assoziiert (Whittaker und Hynes 2002). Jüngere, umfangreiche computergestützte Analysen an hCLCA1 zeigten jedoch, dass keine Transmembrandomäne innerhalb des gesamten Proteins vorliegt (Gibson et al. 2005), während bei hCLCA2 nur ein carboxy-terminaler Membrananker vorhanden ist (Elble et al. 2006). Die Daten aus der Literatur zeigen also, dass

die Ergebnisse von computergestützten Analysen stark variieren und ein Transmembranmodell nicht allein auf Computervorhersagen aufgebaut werden kann.

Das mittels Kyte-Doolittle interpretierte integrale Transmembranmodell wurde mit Hilfe von ersten strukturellen, biochemischen Untersuchungen an hCLCA1 unterstützt (Gruber et al. 1998a). Die Autoren nahmen an, dass das Protein mit Hilfe von vier Transmembrandomänen innerhalb der amino-terminalen Untereinheit in der Plasmamembran verankert ist und die kleinere, carboxy-terminale Einheit außen damit assoziiert bleibt (Abb. 2). Das amino-terminale Ende mit seiner cysteinreichen Region wäre dann extrazellulär lokalisiert.

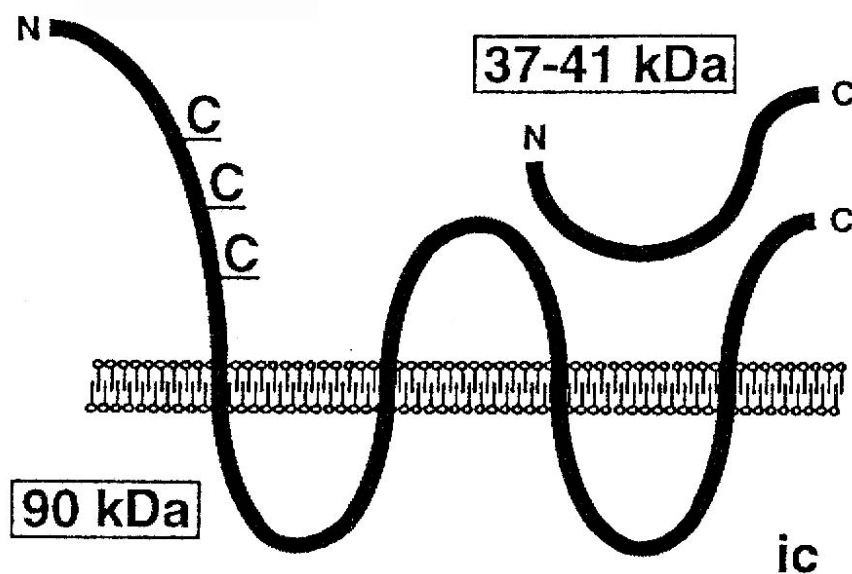


Abbildung 2: Erstes Vier-Transmembranproteinmodell von hCLCA1 (Gruber et al. 1998a).
ic : intrazellulär; C : Cysteinreste; N : aminoterminales Ende; C : carboxyterminales Ende;
kDa : Kilodalton

Auch für hCLCA2 wurde zuerst anhand von biochemischen Daten ein integrales Transmembranmodell entworfen, wonach das Protein mit Hilfe von fünf Transmembrandomänen innerhalb der Plasmamembran verankert ist (Abb. 3). In diesem Modell zeigt die cysteinreiche, amino-terminale Region ebenfalls nach extrazellulär. Ebenso sind die Asparagin-verknüpften Glykosylierungsstellen nach außen gerichtet. Die charakteristische Spaltungsstelle ist intrazellulär gelegen.

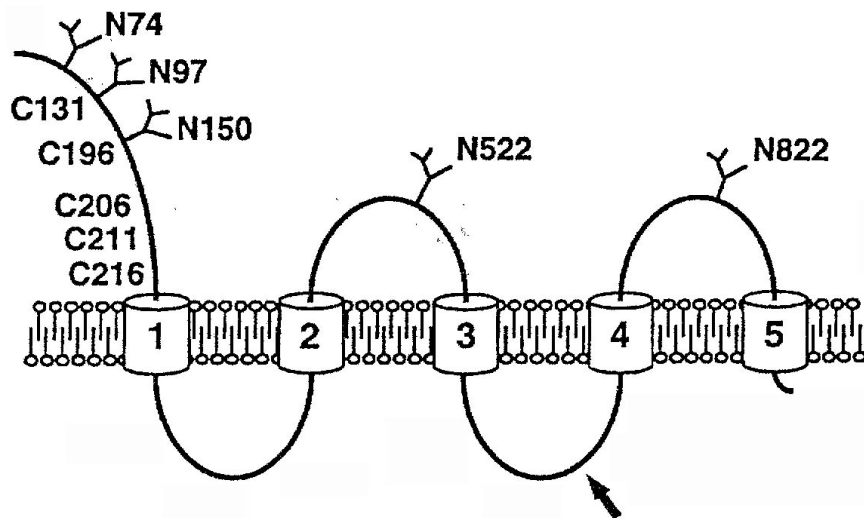


Abbildung 3: Erstes Fünf-Transmembranmodell für hCLCA2 (Gruber et al. 1999).

C131, C196, C206, C211, C216 : Cysteinreste; N74, N97, N150, N522, N822 : Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen; 1,2,3,4,5 : Transmembrandomäne; Pfeil : Spaltungsstelle

Für weitere CLCA-Vertreter wurde anlehnend an die oben dargestellten Modelle ein ähnliches Transmembranmodell angenommen, ohne dass aber umfangreiche, biochemische Untersuchungen durchgeführt wurden (Anton et al. 2005; Cunningham et al. 1995; Elble et al. 2002; Elble und Pauli 2001; Elble et al. 1997; Evans et al. 2004; Gandhi et al. 1998; Jeong et al. 2005; Leverkusöhne und Gruber 2002). Eine abweichende Struktur wurde für hCLCA3 beschrieben (Gruber und Pauli 1999a). Danach handelt es sich um ein sezerniertes, lösliches Protein. Jedoch kann es sich bei diesem Mitglied durchaus um ein Pseudogen ohne biologische Funktion handeln. Es liegen auch keine elektrophysiologischen Untersuchungen über dieses Mitglied vor. Ein Protein mit vier oder fünf Transmembrandomänen wäre durchaus in der Lage, eine Pore in der Plasmamembran zu formen, durch die Ionen die an sich semipermeable Membran passieren könnten. Somit wurde angenommen, dass die CLCA-Proteine die ihnen zugesprochene Chloridleitfähigkeit als echte Chloridkanäle erfüllen könnten (Gruber et al. 2000).

Jedoch konnten jüngere Untersuchungen dieses Transmembranmodell bei hCLCA1 grundlegend widerlegen (Gibson et al. 2005). Das amino-terminale Spaltprodukt ist zwar mit der Plasmamembran assoziiert, kann aber durch milde Säurebehandlung von der Zelloberfläche abgelöst werden. Die Autoren folgerten daraus, dass hCLCA1 kein integrales Membranprotein ist, stattdessen kann die amino-terminale Untereinheit sezerniert werden. Da

die carboxy-terminale Untereinheit kaum detektiert wurde, folgerte man, dass es nach der Spaltung instabil ist. Ohne umfangreiche, proteinbiochemische Untersuchungen durchzuführen, schlussfolgerten die Autoren dieser Studie, dass der orthologe Vertreter von hCLCA1 bei der Maus, mCLCA3, ebenfalls kein integrales Membranprotein sei.

Auch das Proteinmodell von hCLCA2 erfuhr eine grundlegende Änderung und ein neues Modell wurde entworfen (Elble et al. 2006). Danach gelangt das hCLCA2-Vorläuferprotein als komplex glykosylierte Form an die Zelloberfläche und wird erst dort in das amino-terminale und das carboxy-terminale Spaltprodukt gespalten. Die amino-terminale Untereinheit kann sezerniert werden, während die carboxy-terminale Untereinheit mit einer Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert bleibt (Abb. 4).

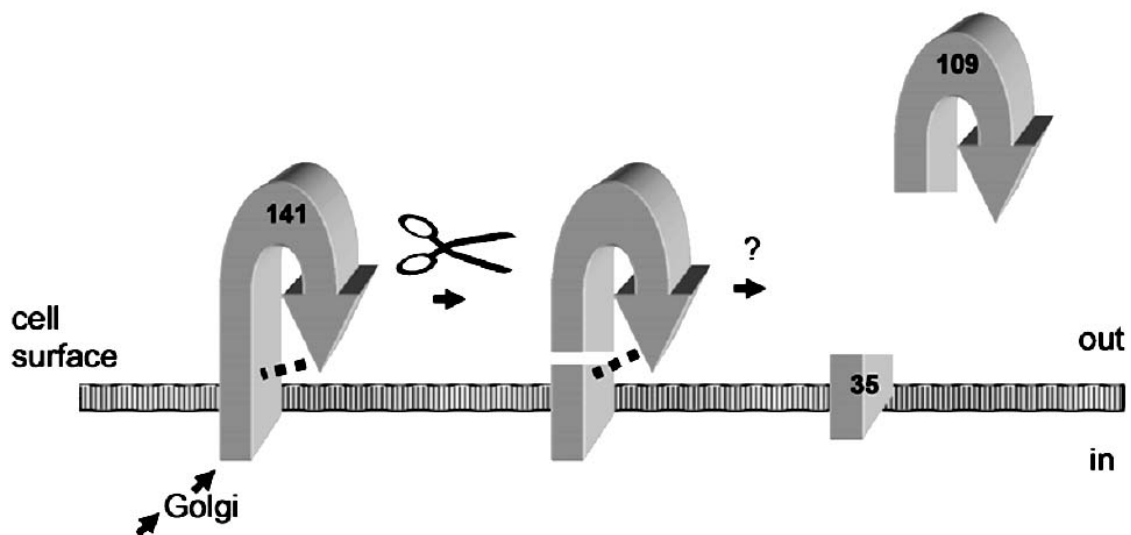


Abbildung 4: Schematische Darstellung der hCLCA2-Prozessierung und Struktur (Elble et al. 2006). cell surface : Zelloberfläche; in : intrazellulär; out : extrazellulär; Schere : Spaltung; 141, 109, 35 : Proteingrößen in Kilodalton; Pfeile : Transport vom Golgi-Apparat

Diese proteinbiochemischen Untersuchungen zeigen, dass es wahrscheinlich große Unterschiede in der Proteinstruktur der verschiedenen CLCA-Vertreter gibt und kein allgemeingültiges Proteinmodell für die CLCA-Proteine existiert. Außerdem sprechen besonders die jüngsten, strukturellen Untersuchungen an hCLCA1 (Gibson et al. 2005) gegen ein Kanalprotein. Als sezerniertes Protein ohne Transmembrandomäne kann ein Protein keine Pore in der Plasmamembran formen.

2.10 Gewebeexpression, zelluläre und subzelluläre Lokalisation von CLCA-Proteinen

Informationen über die zelluläre Gewebeexpression kombiniert mit der Struktur verwandter CLCA-Proteine könnten bei der Klärung der Proteinfunktion und der Unterschiede in der Funktion von strukturellen Gruppen innerhalb der CLCA-Familie helfen. Außerdem gibt das zelluläre Verteilungsmuster Hinweise auf die Signifikanz der Proteine in erkrankten Geweben. Bislang wurden die meisten Expressionsdaten der CLCA-Mitglieder auf mRNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierung, Northernblotanalysen und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) erhoben. Bei einigen Mitgliedern liegen ebenfalls Daten auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Methoden und Westernblotanalysen vor:

Auf mRNA-Ebene konnte hCLCA1 im Dünndarm und in der Kolonmukosa nachgewiesen werden. Zelluläre Lokalisationsstudien identifizierten hauptsächlich Becherzellen und basale Kryptepithelzellen als die hCLCA1-exprimierenden Zelltypen im Darm (Gruber et al. 1998a). Eine signifikant geringere Expression wurde im Uterus, im Magen, im Hoden und in der Niere gefunden, jedoch ohne nähere Information über den exprimierenden Zelltyp (Agnel et al. 1999). Unter pathophysiologischen Bedingungen konnte die Expression von hCLCA1 auch im Atmungstrakt gezeigt werden (Hoshino et al. 2002). Außerdem wurde das aminoterminal Spaltprodukt des Proteins in der bronchioalveolären Lavage (BAL) von an Asthma erkrankten Patienten gefunden (Gibson et al. 2005). Ein ähnliches Expressionsmuster zeigt der orthologe Vertreter zu hCLCA1 bei der Maus, mCLCA3. Das Protein wird in Muzin-sezernierenden Zellen exprimiert (Komiya et al. 1999; Leverkoehne und Gruber 2002). Man fand es immunhistochemisch in den Becherzellen des Verdauungs- und Atmungstraktes sowie des Uterus. Auf subzellulärer Ebene schien mCLCA3 sehr stark mit der Membran der Muzin-granula assoziiert zu sein, außerdem wurde das Protein gelegentlich in der Muzinschicht im Darmlumen lokalisiert (Leverkoehne und Gruber 2002). Ähnlich wie bei Asthma kranken Menschen konnte das mCLCA3-Protein im Asthmamausmodell in der BAL nachgewiesen werden (Gibson et al. 2005). Auch der orthologe Vertreter beim Pferd, eCLCA1, konnte in Muzin produzierenden Zellen des Atmungs- und Verdauungstraktes, außerdem in den Schweißdrüsen der Haut und in den Nierenschleimdrüsen nachgewiesen werden (Anton et al. 2005). Auch pCLCA1, das ebenfalls zu dem phylogenetischen Cluster hCLCA1, mCLCA3 und eCLCA1 gehört (siehe Abb. 1), wurde im Darm nachgewiesen (Gaspar et al. 2000; Racette et al. 1996). Es wird vermutet, dass das Protein ebenfalls in Becherzellen lokalisiert

ist. Weiterhin wurde pCLCA1 im Trachealepithel und in den darunterliegenden Submukosa-Drüsen gefunden. Ferner zeigten die Speicheldrüsen (Parotis-, Sublingual- und Submandibulardrüsen) ein positives Signal in der RT-PCR (Gaspar et al. 2000).

Somit weisen diese eng verwandten Mitglieder ein nahezu identisches Expressionsmuster auf. Sie besitzen auch eine besondere Bedeutung bei Krankheiten mit gestörter sekretorischer Funktion (siehe Kapitel 2.7). Dass sowohl das hCLCA1- als auch das mCLCA3-Protein in der BAL gefunden wurde, deutet daraufhin, dass diese Proteine wenigstens zum Teil sezerniert werden (siehe Kapitel 2.9). Ob die beiden anderen orthologen Mitglieder ebenfalls im extrazellulären Raum vorkommen, ist bislang nicht geklärt.

Die beiden Vertreter beim Rind, bCLCA1 und bCLCA2, alias Lu-ECAM-1, wurden vorrangig im oberen Atmungstrakt und in der Trachea gefunden (Cunningham et al. 1995; Elble et al. 1997). Darüber hinaus wurde bCLCA2 im Endothel von Venulen der Lunge nachgewiesen (Elble et al. 1997; Zhu und Pauli 1991).

Die anderen Mitglieder der CLCA-Familie zeigen ein davon zum Teil erheblich abweichendes und zumeist sehr weites Expressionspektrum. So wurde der zweite humane CLCA-Vertreter auf mRNA-Ebene mittels Northernblotanalyse und RT-PCR besonders in der Trachea, in der Lunge, in der Milchdrüse (Gruber et al. 1999), im geringeren Maße im Uterus sowie in der Prostata und im Hoden nachgewiesen (Agnel et al. 1999). Die exprimierenden Zelltypen wurden in diesen Studien jedoch nicht näher analysiert. Weiterhin wurde hCLCA2 im Nasenepithel gefunden (Mall et al. 2003). Auf Proteinebene konnte das hCLCA2-Protein mit Hilfe der Immunhistochemie in den basalen Epithelzellen der Cornea, der Haut, des Larynx, der Vagina und des Ösophagus lokalisiert werden (Connon et al. 2004). Immunelektronmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass das Protein ausschließlich auf der zytosolischen Seite der basalen Zellen in der Nähe von Hemidesmosomen lokalisiert ist. Die mRNA des dritten Vertreters der humanen CLCA wurde in der Lunge, in der Trachea, in der Milchdrüse, im Thymus und in der Milz nachgewiesen. Jedoch konnte die mRNA nur mit Hilfe der RT-PCR und nicht durch Northernblotanalysen detektiert werden (Gruber und Pauli 1999a), was auf eine sehr geringe Expressionsrate schließen lässt. Auch wurde hCLCA3 im Nasenepithel nachgewiesen (Mall et al. 2003).

Ein einzigartiges Expressionsmuster zeigt hCLCA4. Neben einer sehr starken Expression im Kolon konnte hCLCA4 durch Northernblotanalyse besonders im Gehirn identifiziert werden. Außerdem konnte es in der Harnblase, im Uterus, in der Prostata, im Magen, im Hoden, in der Ohrspeicheldrüse, in der Milchdrüse, im Dünndarm und in der Trachea nachgewiesen werden (Agnel et al. 1999). Auch bei diesem Vertreter erfolgte bislang nur eine Gewebeexpressions-

analyse und keine zellspezifische Lokalisationsstudie, so dass noch nicht geklärt ist, ob hCLCA4 anstatt in Darmschleimhautzellen nicht auch in anderen Zelltypen wie z.B. dem enterischen Nervensystem lokalisiert ist.

Auch der erste Vertreter der Maus zeigt ein sehr weites Expressionsspektrum (Gruber et al. 1998b; Leverkoehne et al. 2002). Mittels real-time RT-PCR wurde der erste murine Vertreter besonders stark in der Lunge, in der Aorta, in der Milz und im Knochenmark nachgewiesen (Leverkoehne et al. 2002). In einer anderen Studie wurde auch eine hohe Expression in der Niere und in der Haut festgestellt (Romio et al. 1999). Eine interessante Beobachtung wurde in dem Expressionsverhalten während der Säugephase beobachtet: Während der Milchdrüseninvolution wird mCLCA1 herunterreguliert (Elble und Pauli 2001; Leverkoehne et al. 2002). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass mCLCA1 eine funktionelle Rolle in der Zellreifung und Gewebedifferenzierung spielt (siehe Kapitel **2.8.3**). Außerdem wurde mCLCA1 im Kleinhirn und Hirnstamm detektiert (Leverkoehne et al. 2002).

Der zweite murine Vertreter ist besonders stark in der Milchdrüse exprimiert (Elble und Pauli 2001; Leverkoehne et al. 2002), mit der höchsten Expressionsrate in der involierenden Milchdrüse (Lee et al. 1999; Leverkoehne et al. 2002). Geringere mCLCA2-Expressionen wurden mittels real-time RT-PCR in zahlreichen anderen Geweben gemessen. Bemerkenswert ist, dass die höchsten Expressionsraten in den Geweben festgestellt wurden, die eine hohe Zellteilungsrate aufweisen (Leverkoehne et al. 2002). Die letzten beiden Vertreter zeigen ein großes überlappendes Expressionsmuster, mit zum Teil gegenläufigen Expressionsraten in der involierenden Milchdrüse. Die Bedeutung und die biologische Signifikanz dieser Beobachtung sind noch nicht weiter erforscht.

Mittels RT-PCR und *in situ*-Hybridisierungstechniken wurde mCLCA4 in der glatten Muskulatur der Gallenblase und des Magens, in der Vena pulmonalis, in der Aorta und in den Atrioventrikulärbündeln nachgewiesen. Außerdem wurde mCLCA4 in den Bronchiolen, in den Blutgefäßen der Lunge und in der Mukosa des Darms nachgewiesen. Das Signal im Darm war an den Zottenspitzen besonders stark (Elble et al. 2002). Das murine CLCA-Mitglied mCLCA5 zeigte mit Hilfe der RT-PCR ein weites Expressionsspektrum in diversen Organen, mit einem hohen Expressionssignal im Auge und in der Milz (Evans et al. 2004). Außerdem wird mCLCA5 besonders stark in der laktierenden und involierenden Milchdrüse gefunden (Beckley et al. 2004). Der sechste murine Vertreter wurde mit der RT-PCR Technik im Darm und im Magen nachgewiesen (Evans et al. 2004).

Mittels RT-PCR konnte der CLCA-Vertreter der Ratte im Großhirn, im Kleinhirn, in der Niere, im Dünndarm und im Magen nachgewiesen werden (Jeong et al. 2005). Weiterhin

wurde der Vertreter im Ileum, im Gangepithel der Submandibulardrüse (Yamazaki et al. 2005) und in den Zymogengranula des Pankreas (Thevenod et al. 2003) nachgewiesen.

Zusammenfassend kann bei der Gewebeexpression der CLCA-Proteine festgestellt werden, dass diese Familie zum einen ein sehr heterogenes Verteilungsmuster aufweist. Dieses deutet daraufhin, dass es Unterschiede in der jeweiligen physiologischen Rolle der verschiedenen CLCA-Mitglieder gibt. Zum anderen zeigen jedoch eng verwandte CLCA-Vertreter in verschiedenen Spezies ein nahezu identisches zelluläres Verteilungsmuster (hCLCA1, mCLCA3, eCLCA1 und pCLCA1). Daraus lässt sich schließen, dass zumindest die Proteine dieses Clusters in ihrer jeweiligen Spezies eine ähnliche, vergleichende Funktion ausüben könnten. Da diese Proteine bevorzugt in Becherzellen exprimiert werden, könnte ihre Funktion in der Muzinsekretion und/oder Muzinmodulation liegen.