

## 5 Diskussion

Der Name der CLCA-Proteinfamilie beruht auf der Eigenschaft ihrer Mitglieder, nach Transfektion in ein heterologes Zellsystem eine Chloridleitfähigkeit zu induzieren, die durch intrazelluläres Kalzium aktivierbar ist. Daher nannte man die Proteine Kalzium-aktivierte Chloridkanäle (engl. *chloride channel, calcium-activated*, Gruber et al. 2000). Um einen Kanal zu formen, muss ein Protein Domänen besitzen, mit deren Hilfe die Plasmamembran durchspannt werden kann. Mit Hilfe dieser Transmembrandomänen kann so eine Pore innerhalb der Plasmamembran geformt werden, durch die Ionen hindurchfließen können (Eggermont 2004).

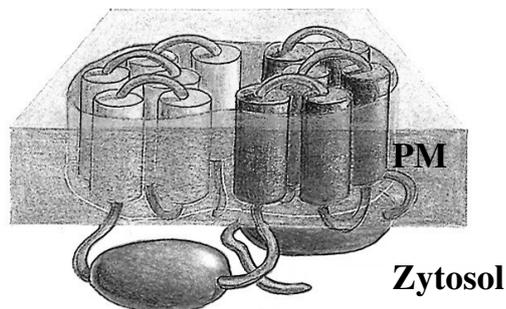


Abbildung 22: Beispiel einer schematischen Darstellung eines Ionenkanals (CFTR-Kanals, Abb. modifiziert nach Alberts et al. 2004a). Kanalproteine durchspannen mit Transmembrandomänen die Plasmamembran. Mit Hilfe dieser Transmembrandomänen bilden die Kanäle eine Pore in der Membran oder beteiligen sich mit anderen Proteinen an einer Porenformung. PM: Plasmamembran

Erste biochemische Experimente zeigten für die Mehrzahl der CLCA-Mitglieder, dass ein Vorläuferprotein in eine größere, amino-terminale und eine kleinere, carboxy-terminale Untereinheit gespalten wird. Diese Untereinheiten sollten nach dem ursprünglichen Modell vier oder fünf Transmembrandomänen besitzen, mit deren Hilfe ein verankertes Transmembranprotein gebildet wird (Gruber et al. 2000). Ein CLCA-Protein mit solch einer Struktur könnte durchaus eine Pore in der Plasmamembran formen und die vermutete Funktion eines Ionenkanals erfüllen. Jedoch zeigten erstmals immunhistochemische und immuntransmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen (Leverkoehne und Gruber 2002), dass im Fall von mCLCA3 zumindest ein Teil des Proteins mit dem Mukus abgegeben wird.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde daher die Frage gestellt, ob mCLCA3 bei der Maus (Modellspezies) und sein orthologer Vertreter beim Pferd eCLCA1 (Relevanz für chronisch-obstruktive Bronchiolitis) sezernierte Proteine sind oder ob sie echte Transmembranproteine darstellen, die eine Öffnung für den Durchtritt von Chloridionen formen können. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden nacheinander vier Gruppen von Untersuchungen durchgeführt:

1. Als erstes erfolgte eine *in silico*-Analyse mit Hilfe von computergestützten Programmen, um die Aminosäuresequenzen der CLCA-Proteine nach potentiellen Transmembrandomänen und Glykosylierungsstellen abzusuchen.
2. Anschließend wurden die Proteine nach ihrer heterologen Expression in Säugerzelllinien untersucht. Die Transportkinetik der CLCA-Proteine in der Zelle und im extrazellulären Raum wurde anschließend in *pulse chase*-Experimenten bestimmt und schließlich wurden die Proteine mittels Westernblotanalyse näher charakterisiert.
3. Des Weiteren wurden unter Anwendung von lichtmikroskopischen, konfokalen Fluoreszenz-Analysen die CLCA-Proteine in transfizierten Zellen intrazellulär lokalisiert, insbesondere sollte ihre Lokalisation an der Plasmamembran bestimmt werden.
4. Schließlich erfolgte eine proteinbiochemische Charakterisierung des Glykosylierungsmusters der CLCA-Proteine, um festzustellen, welches Kompartiment des zellulären Synthesepfades die Proteinformen, die in der Zelle und im extrazellulären Raum entdeckt wurden, erreicht haben.

Da in der Arbeitsgruppe in den letzten Jahren vermehrt mit mCLCA3 der Maus als Modellspezies gearbeitet wurde und dafür die besseren Nachweisreagenzien zur Verfügung standen (insbesondere Antikörper), wurden zunächst alle Experimente mit mCLCA3 durchgeführt. Anschließend wurden einige der Schlüsselexperimente mit eCLCA1 wiederholt, um die Übertragbarkeit auf den direkten Homologen des Pferdes zu prüfen. Durch die Bestätigung der Ergebnisse an einem direkten Orthologen in einer zweiten Spezies konnten so die Daten, die für die Interpretation der CLCA-Funktionsweisen von erheblicher Relevanz sind, doppelt bestätigt werden.

Zusammengefasst ergaben alle Ergebnisse ein klares, einheitliches Bild für beide untersuchten Proteine. Die Computerprogramme Kyte-Doolittle, SOSUI, HMMTOP, DAS und PSORT II konnten keine  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen für das mCLCA3-Protein vorhersagen. Als die hydrophobste Region innerhalb der Aminosäuresequenz wurde die

zuvor mittels Computeranalyse festgestellte Signalpeptidsequenz angegeben. Diese Sequenz ist für den Import ins ER verantwortlich und wird in der Regel im ER abgespalten. Dass die Familie der CLCA-Proteine tatsächlich eine solche Signalsequenz besitzt, konnte experimentell im Fall für bCLCA2 (alias Lu-ECAM-1) durch amino-terminale Ansequenzierung (Edman-Abbau) gezeigt werden (Elble et al. 1997). Die Computervorhersage mittels TMPred ermittelte für mCLCA3 zwei mögliche Transmembrandomänen. Somit variierten die Ergebnisse der Vorhersagen, je nachdem mit welchem Programm die Analyse durchgeführt wurde. Computerprogramme geben jedoch nur eine grobe Einschätzung über die Struktur der Proteine als Grundlage für weitere Experimente. Die Mehrzahl der Computeranalysen sagte aber keine Transmembrandomäne für das mCLCA3-Protein voraus. Die in dieser Arbeit durchgeführte Computeranalyse des Glykosylierungsmusters der mCLCA3-Aminosäuresequenz zeigte, dass die Mehrzahl der Glykosylierungsstellen (fünf von sechs) im carboxy-terminalen Spaltprodukt lokalisiert ist. Von diesen werden laut der Computervorhersage zwei potentiell in der Zelle glykosyliert. Im amino-terminalen Spaltprodukt ist eine Glykosylierungsstelle beheimatet, die wahrscheinlich auch in der Zelle glykosyliert wird. Eine Glykosylierung von Proteinen führt zu einer Größenzunahme der Proteine, da Zuckerketten an die Aminosäuresequenz geknüpft werden. Sowohl Transmembranproteine, die an der Plasmamembran gefunden werden, als auch sekretorische Proteine, die in den extrazellulären Raum abgegeben werden, nehmen in der Regel einen ähnlichen Weg durch die Zelle (Alberts et al. 2004). Beide Proteintypen werden in das ER mit Hilfe einer Signalsequenz importiert. Dort erfahren die Proteine die erste Glykosylierungsstufe. An ihre Aminosäuresequenz knüpfen bestimmte Enzyme Zuckerreste an bestimmte Asparagine (Mannose reiche Glykosylierung). Die Proteine werden vom ER über den Golgi-Apparat an ihren Zielort transportiert. Im Fall von Transmembranproteinen kann dies die Plasmamembran sein, im Fall von sekretorischen Proteinen ist dies der extrazelluläre Raum. Im Golgi-Apparat reifen beide Proteinarten und erfahren die nächste Glykosylierungsstufe. Die Mannose reiche Glykosylierung wird dabei in eine komplexe Glykosylierung umgewandelt. An seinem Zielort liegt dann das Protein in seiner reifen, komplex glykosylierten Form vor. Da in der hier durchgeführten computergestützten Analyse die Proteine potentiell eine Glykosylierung erfahren, wurde auch das tatsächliche Glykosylierungsmuster der Proteine zum Schluss dieser Studie experimentell bestimmt, um Rückschlüsse ziehen zu können, welches Kompartiment die einzelnen Proteinformen erreicht haben.

Da andere Autoren das mCLCA3-Protein sowohl an der Membran von Schleimvesikeln der Becherzelle als auch im Darmlumen nachgewiesen haben (Leverkoehne und Gruber 2002),

wurde in dieser Arbeit die Prozessierung von mCLCA3 sowohl in der Zelle als auch im extrazellulären Raum untersucht. Eine für alle Vertreter der CLCA-Proteinfamilie beobachtete Eigenschaft ist die posttranslationale Spaltung eines Vorläuferproteins (Elble et al. 1997; Gruber et al. 2000) in eine größere, amino-terminale und eine kleinere, carboxy-terminale Untereinheit, die in ersten Untersuchungen auch für mCLCA3 bestätigt wurde (Leverkoehne und Gruber 2002). Aus diesem Grund wurde im Fall von mCLCA3 hier die Prozessierung der amino-terminalen und der carboxy-terminalen Untereinheit untersucht. Da bislang keine Antikörper gegen Epitope im carboxy-terminalen Teil des Proteins erhältlich sind, wurde das mCLCA3-Protein am carboxy-terminalen Ende mit einem fluoreszierenden Protein markiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass aufgrund der Autofluoreszenz des Proteins die markierten Proteine im Hinblick auf ihre Lokalisation in lebenden Zellen untersucht werden können. Im Fall des unmarkierten mCLCA3-Proteins wurden zwei Vorläuferproteinstufen von 110 kDa und 100 kDa entdeckt, im Fall des markierten Fusionsproteins mCLCA3-YFP wurden ebenfalls zwei Vorläuferproteinstufen von 140 kDa und 130 kDa gefunden. Diese Größe entspricht genau der erwarteten Größenzunahme des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins (+ 30 kDa). Die beiden größeren Vorläuferproteinstufen (110 bzw. 140 kDa) wurden in den Analysen des Glykosylierungsmusters als Mannose reich glykosylierte Proteine identifiziert und somit stammt das Vorläuferprotein aus dem ER. Die beiden kleineren Vorläuferproteinstufen (100 kDa bzw. 130 kDa) sind offenbar unglykosylierte Vorläuferproteine. Möglicherweise läuft der Glykosylierungsmechanismus oder der Importmechanismus in das ER in den heterolog transfizierten Zellsystemen mit starker Überexpression nicht ganz effektiv ab, so dass diese Formen auftreten können. Die durch die Glykosylierung bedingte Zunahme von 10 kDa entspricht in etwa der erwarteten Größenzunahme durch die in der *in silico*-Analyse identifizierten Asparagin-verknüpften Glykosylierungsstellen. In den *pulse chase*-Experimenten sowohl mit dem mCLCA3-Protein als auch mit dem mCLCA3-YFP-Fusionsprotein wurden in dieser Arbeit kleinere Spaltprodukte nachgewiesen. Das 110 kDa Mannose reich glykosylierte mCLCA3-Protein wurde in eine 75 kDa große, amino-terminale, Mannose reiche Untereinheit gespalten. Neben diesem glykosylierten Spaltungsprodukt fanden sich auch eine unglykosylierte Abspaltung von 73 kDa, welches möglicherweise einen Artefakt im übertransfizierten Zellsystem darstellt. Das mCLCA3-YFP-Fusionsprotein wurde als Mannose reiches Vorläuferprotein in eine 75 kDa große und eine 65 kDa große Untereinheit gespalten. In Westernblotanalysen konnten das 75 kDa große Spaltprodukt als amino-terminale Untereinheit und das 65 kDa große Spaltprodukt als YFP-markierte, carboxy-terminale Untereinheit identifiziert werden. Da sowohl das unmarkierte als auch das YFP-

markierte mCLCA3-Protein das gleiche Spaltungsmuster zeigten, beeinflusst das angehängte YFP-Protein im mCLCA3-YFP-Fusionsprotein offenbar nicht die intrazelluläre Proteinprozessierung. Die Größe des amino-terminalen Spaltproduktes stimmt überein mit der Untersuchung von Brouillard und Mitarbeiter, die die Spaltungsstelle des nativen mCLCA3-Proteins auf Aminosäure 686 lokalisieren konnten (Brouillard et al. 2005). Eine Spaltung des Polypeptids an dieser Aminosäure resultiert in einer errechneten Größe der unglykosylierten, amino-terminalen Untereinheit von 75,3 kDa oder von 73,3 kDa nach Abspaltung der amino-terminalen Signalsequenz.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eindeutig, dass das mCLCA3-Vorläuferprotein in eine größere, amino-terminale und kleinere, carboxy-terminale Untereinheit gespalten wird. Somit kann die für die CLCA-Familie charakteristische Spaltung (Gruber et al. 2000) bestätigt werden. Diese Spaltungsprodukte konnten in den Versuchen zur Bestimmung des Glykosylierungsmusters als Mannose reiche Formen identifiziert werden. Da die Spaltungsprodukte in frühen Zeitpunkten der *pulse chase*-Versuche als Mannose reich glykosylierte Form auftreten, findet die Spaltung des mCLCA3-Vorläuferproteins zu einem frühen Zeitpunkt des sekretorischen Weges vor Eintritt in den Golgi-Apparat statt, höchstwahrscheinlich im ER. Diese Entdeckung unterscheidet mCLCA3 von dem zweiten humanen Vertreter hCLCA2 in Bezug auf die posttranslationale Prozessierung (Elble et al. 2006). Für hCLCA2 konnte gezeigt werden, dass das Vorläuferprotein als komplex glykosylierte Form erst an der Zelloberfläche gespalten wird (Elble et al. 2006). In der hier durchgeführten Arbeit waren keine komplex glykosylierten, reifen Proteine im Zelllysate und somit auch nicht an der Plasmamembran nachweisbar. In dem extrazellulären Raum (Medium) traten jedoch in den hier durchgeführten *pulse chase*-Experimenten nach 1 h sowohl das amino-terminale als auch das carboxy-terminale Spaltprodukt auf. Beide Spaltprodukte wurden als komplex glykosylierte Proteinformen identifiziert. Somit wurden reife Proteinformen aus dem Golgi-Apparat von der Zelle in den extrazellulären Raum sezerniert. Interessanterweise fand sich im Hinblick auf die Spaltung im Zelllysate mit dem mCLCA3-YFP-Fusionsprotein eine 105 kDa große, unglykosylierte Proteinbande. Diese Abspaltung wurde sowohl vom anti-YFP Antikörper als auch vom anti-mCLCA3 Antikörper  $\alpha$ -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002), der ein Epitop um Aminosäure 260 erkennt, nachgewiesen. Der anti-mCLCA3 Antikörper  $\alpha$ -p3a (Leverkoehne und Gruber 2002), der ein Epitop um Aminosäure 90 erkennt, konnte dieses Abspaltungsprodukt jedoch nicht detektieren. Somit gibt es offensichtlich eine zweite Spaltungsstelle vor der Aminosäure 260. Ob für eine erfolgreiche Spaltung an der Aminosäure

686 das Protein in glykosylierter Form vorliegen muss, sollten spätere Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass nach der für die CLCA-Familie charakteristischen Spaltung des Vorläuferproteins beide Untereinheiten von mCLCA3 in den extrazellulären Raum als komplex glykosylierte Proteinformen sezerniert werden. Sowohl die amino-terminalen als auch die carboxy-terminalen Spaltprodukte liegen dagegen innerhalb der Zelle nur als Mannose reiche Proteinform vor. Im Medium finden sich jeweils beide Untereinheiten als komplex glykosylierte Form. Somit hatten diese Proteine den Golgi-Apparat passiert und wurden von der Zelle über den sekretorischen Weg sezerniert. Hingegen konnten keine reifen Proteinformen innerhalb des Zellsates und damit auch nicht an der Plasmamembran gefunden werden, wie es sich typischerweise bei Transmembranproteinen verhält.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Immunpräzipitation des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins zeigte, dass das amino-terminale Spaltprodukt mit dem carboxy-terminalen Spaltprodukt ko-präzipitiert werden konnte. Diese Ko-Immunpräzipitation fand sowohl intrazellulär als auch extrazellulär statt. Die enge Assoziation beider mCLCA3 Untereinheiten findet sich auch bei seinem orthologen Vertreter beim Menschen, hCLCA1, wieder (Gruber et al. 1998a). Hier konnte gezeigt werden, dass das myc-markierte amino-terminale Spaltprodukt von hCLCA1 ko-präzipitiert mit der unmarkierten carboxy-terminalen Untereinheit. Im Fall von hCLCA2 wurde diese Ko-Immunpräzipitation jedoch nicht beobachtet (Gruber et al. 1999). Warum dies bei einigen Vertretern beobachtet wird und bei anderen nicht, ist noch nicht geklärt. Außerdem ist die Natur dieser Bindung aneinander und deren strukturelle und funktionelle Relevanz bislang unerforscht.

Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie konnten die biochemischen Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden. Das mCLCA3-YFP-Protein erreicht sowohl das ER als auch den Golgi-Apparat, da es mit den spezifischen Markern dieser zellulären Kompartimente ko-lokalisiert werden konnte. Außerdem zeigten diese Untersuchungen, dass sowohl das unmarkierte mCLCA3-Protein als auch das mCLCA3-YFP-Fusionsprotein in Vesikeln lokalisiert waren, jedoch nicht an der Plasmamembran nachgewiesen wurden. Auch diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen die biochemischen Daten, die klar gezeigt hatten, dass keine reife Proteinform in der Zelle und damit an der Plasmamembran gefunden werden konnte. Im Gegensatz zu mCLCA3 konnte ein Kontrollprotein (Saccharase-Isomaltase) sehr wohl in der Plasmamembran immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden, wodurch die negative Aussage für mCLCA3 validiert werden konnte.

Neben den im Hinblick auf die Ko-Immünpräzipitation diskutierten Gemeinsamkeiten des mCLCA3-Proteins mit seinem orthologen Vertreter beim Menschen hCLCA1 zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit auch zwei beachtliche Unterschiede zwischen den beiden verwandten Vertretern. Gibson und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das carboxy-terminale Spaltprodukt von hCLCA1 nicht im Zelllysats und nur in kleinsten Mengen im Medium nachweisbar war (Gibson et al. 2005). Die Gruppe schloss daraus, dass die kleinere Untereinheit instabil ist, wenn die posttranslationale Spaltung stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu lag in dieser Studie die carboxy-terminale Untereinheit des gespaltenen mCLCA3-Proteins in großen Mengen sowohl im Zelllysats als auch im Medium vor. Das carboxy-terminale Spaltprodukt konnte im gesamten Verlauf des *pulse chase*-Versuches zusammen mit dem amino-terminalen Spaltprodukt in sichtbar gleichem, wahrscheinlich equimolarem Verhältnis detektiert werden. Somit zeigt die carboxy-terminale Untereinheit im Fall von mCLCA3 nach der erfolgten Spaltung keine Instabilität. Außerdem konnten Gibson und Mitarbeiter zeigen, dass das amino-terminale Spaltprodukt des hCLCA1-Proteins eng mit der Plasmamembran assoziiert blieb und von der Zelloberfläche mit Hilfe von Säure- oder Laugenbehandlung entfernt werden konnte. Die Autoren diskutierten daraufhin, dass hCLCA1 an der Zelloberfläche mit einem bislang unidentifizierten Protein assoziiert bleibt. In der hier durchgeführten Studie konnte jedoch keine Assoziation des mCLCA3-Proteins mit der Plasmamembran gefunden werden. Möglicherweise werden in den hier benutzten Zelllinien (Affennierzellen, COS-1; menschliche Nierenzellen, HEK293) keine Proteine exprimiert, die eine optimale Bindungsaffinität zu dem Mäuseprotein mCLCA3 aufweisen. Vergleichende Versuche in Mäusezelllinien, wie z.B. 3T3 Zellen, könnten aufschlussreiche Informationen über mögliche, optimale Bindungspartner an der Zelloberfläche für mCLCA3 ergeben.

Die *in vivo*-Untersuchungen an mCLCA3 hatten früher das Protein sowohl im Darmschleim als auch in enger Assoziation mit der Membran von Muzin-haltigen Vesikeln lokalisiert (Leverkoehne und Gruber 2002). Diese Autoren postulierten, dass mCLCA3 unter anderem eventuell eine Rolle bei der Sekretion von Muzinen spielen könnte. Vielleicht liegt für mCLCA3 nur eine Assoziation mit Proteinen, die in Vesikelmembranen verankert sind, vor. Diese Bindung könnte nach dem Verschmelzen der Vesikel mit der Plasmamembran gelöst werden. Zur Untersuchung dieser These müsste eine fraktionierte Analyse der Vesikel, insbesondere des Vesikelinhaltes und der Vesikelmembran, auf das Vorhandensein des mCLCA3-Proteins erfolgen.

In dieser Studie wurde neben mCLCA3 in wesentlichen Schlüsselpunkten auch sein orthologer Vertreter beim Pferd eCLCA1 untersucht. Das eCLCA1-Protein kommt phylo-

genetisch in dem gleichen Cluster wie mCLCA3, hCLCA1 und pCLCA1 vor (siehe Abb. 1). Dieses Protein zeigte in früheren immunhistochemischen Untersuchungen ein nahezu identisches zelluläres Verteilungsmuster wie mCLCA3 (Anton et al. 2005). Es ist ebenfalls in Becherzellen lokalisiert. Jedoch lagen für eCLCA1 bislang keine Informationen über seine subzelluläre Lokalisation innerhalb oder außerhalb der Zelle vor. Bei der hier durchgeführten *in silico*-Analyse konnten für die meisten benutzten Softwareprogramme ähnlich wie für mCLCA3 keine Transmembrandomänen bei eCLCA1 vorhergesagt werden. Auch hier war die hydrophobste Region in der Region lokalisiert, die der Sequenz nach einer abspaltbaren Signalsequenz entspricht. Das Programm TMPred hingegen favorisierte neben der eben erwähnten Signalsequenz zwei Transmembranregionen innerhalb des eCLCA1-Proteins. So ergaben auch bei diesem Protein nicht alle *in silico*-Analysen ein gleiches Bild über mögliche Transmembrandomänen. Jedoch weisen die *in silico*-Untersuchungen der orthologen Vertreter mCLCA3 und eCLCA1 praktisch identische Daten auf. Auch bei der Bestimmung potentieller Asparagin-verknüpfter Glykosylierungsstellen wies das eCLCA1-Protein ein ähnliches Zuckermuster wie mCLCA3 auf. Im carboxy-terminalen Spaltprodukt besitzt eCLCA1 fünf potentiellen Glykosylierungsstellen, von denen zwei vermutlich tatsächlich glykosyliert werden. In der amino-terminalen Untereinheit sind zwei Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen lokalisiert, die auch beide für die Anheftung von Zuckerresten genutzt werden könnten. Beispielhaft wurde in dieser Arbeit die amino-terminale Untereinheit des eCLCA1-Proteins biochemisch näher charakterisiert. Das biochemische Experiment zur Bestimmung des Glykosylierungsmusters von eCLCA1 zeigte eindeutig, dass das 120 kDa große Vorläuferprotein und das 80 kDa große, amino-terminale Spaltprodukt innerhalb der Zelle Mannose reich glykosyliert waren. Im extrazellulären Raum wurde dagegen die amino-terminale Untereinheit in ihrer reifen, komplex glykosylierten Form entdeckt, während kein reifes Protein im Zelllysat nachgewiesen werden konnte. Somit wird auch bei eCLCA1 das Vorläuferprotein als Mannose reiche Form im ER gespalten. Die Spaltprodukte werden vermutlich über den Golgi-Apparat direkt in den extrazellulären Raum sezerniert. Zusammengefasst zeigten die beiden orthologen Vertreter eCLCA1 und mCLCA3 demnach ein identisches Bild im Hinblick auf ihre Struktur und Prozessierung.

Die Untersuchungen dieser Arbeit im Vergleich zu bisherigen Arbeiten über hCLCA1 zeigen, dass die direkten orthologen CLCA-Proteine eCLCA1 und mCLCA3 zum einen eine ähnliche Prozessierung aufweisen. Zumindest die größere, amino-terminale Untereinheit wird bei den drei Vertretern in den extrazellulären Raum sezerniert. Zum anderen gibt es aber auch

deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Lokalisation der Proteine. Nur das hCLCA1-Protein konnte an der Plasmamembran gefunden werden (Gibson et al. 2005). Weitere Untersuchungen in Spezies-gleichen Zellkulturen sollten jedoch zeigen, ob dies wirklich ein struktureller Unterschied innerhalb der Proteine ist oder aber auf das Vorhandensein oder das Fehlen von Interaktionsproteinen an der Plasmamembran mit einer optimalen Bindungsaffinität zu den jeweiligen CLCA-Orthologen zurückzuführen ist (siehe oben, eventuell Expression in geeigneten Zelllinien der Maus). Weiterhin konnte diese Arbeit im Vergleich mit Literaturdaten demonstrieren, dass es anscheinend substantielle Unterschiede zwischen nicht-orthologen CLCA-Vertretern gibt. Während hCLCA2 eine echte carboxy-terminale Transmembrandomäne besitzt (Elble et al. 2006), haben, wie die hier vorliegende Arbeit zeigt, mCLCA3 und eCLCA1 keine Transmembrandomänen. Innerhalb der CLCA-Familie gibt es anscheinend strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern innerhalb einer Spezies und wahrscheinlich auch zwischen den direkten Orthologen zweier Spezies. Diese Beobachtung würde übereinstimmen mit einer bereits hypothetisierten unabhängigen Entwicklung der Mitglieder der CLCA-Genfamilie innerhalb verschiedener Spezies (Gruber et al. 2000; Ritzka et al. 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen als zentrale Hauptaussage, dass nach der für die CLCA-Familie charakteristischen Spaltung des Vorläuferproteins beide Untereinheiten des mCLCA3-Proteins in den extrazellulären Raum als komplex glykosylierte Proteinformen sezerniert werden. Daher kann keine der beiden Untereinheiten eine Transmembrandomäne enthalten.

### Extrazellulärer Raum

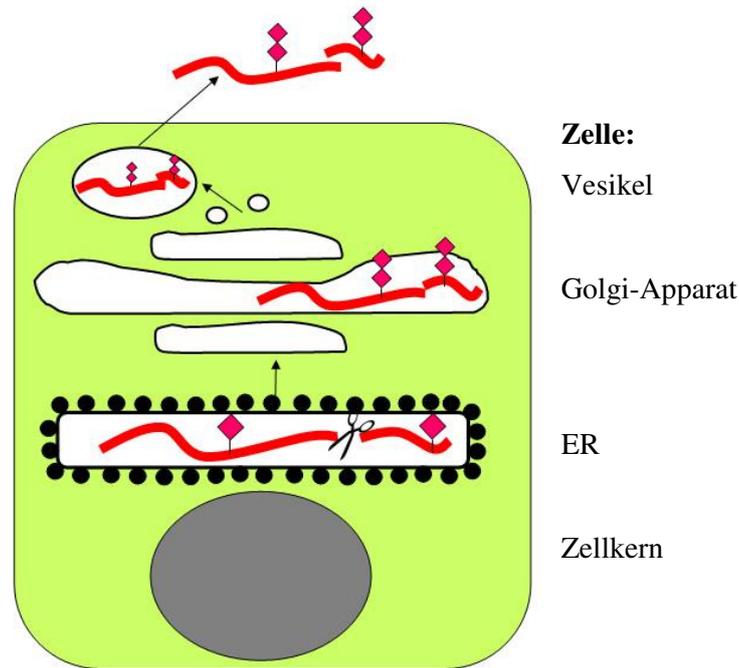


Abbildung 23: Schematische Darstellung der mCLCA3- und eCLCA1-Prozessierung innerhalb einer Zelle. Das Vorläuferprotein wird im ER als Mannose reich glykosylierte Form (einfache Raute) gespalten (Schere), im Golgi-Apparat in seine reife Form (doppelte Raute) glykosyliert und in den extrazellulären Raum sezerniert.

Das Protein kann somit auch keinen eigenständigen Kanal bilden. Jedoch zeigten heterolog mCLCA3-transfizierte HEK293 Zellen eine neue, bisher unbekannte Chloridleitfähigkeit (Winpenny 2002). Da die Struktur des Proteins die eines echten Kanalproteins nicht erfüllen kann, liegt der Mechanismus dieser für die CLCA-Familie charakteristischen Leitfähigkeitsinduktion offenbar in einer indirekten Aktivierung eines Chloridstroms, vielleicht über eine Signalfunktion des mCLCA3-Proteins für andere, bislang unidentifizierte Moleküle.

Neben diesen strukturellen, biochemischen Ergebnissen sprechen auch erste elektrophysiologische Daten aus der Literatur gegen die Theorie, dass alle CLCA-Proteine einen eigenständigen Kanal formen. Der erste CLCA-Vertreter des Schweins pCLCA1, der zu dem gleichen phylogenetischen Cluster gehört wie mCLCA3, hCLCA1 und eCLCA1, induziert neben einer Kalzium-aktivierten Chloridleitfähigkeit auch eine cAMP-abhängige Chloridleitfähigkeit (Gaspar et al. 2000; Loewen et al. 2002; Loewen et al. 2003). Wenn pCLCA1 in Caco-2-Zellen - einer polaren, epithelialen Zelllinie - exprimiert wird, verschwindet die

Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit während der Differenzierung dieser Zellen. 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 vielmehr für einen regulatorischen Effekt des pCLCA1-Proteins auf andere Chloridkanäle als für eine eigenständige Kanalfunktion.

Polypeptide oder ihre Fragmente sind durchaus in der Lage, die Öffnung von Kanälen zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass das carboxy-terminale Fragment des Parathyreoidhormons den Kalziumstrom über einen spannungsabhängigen Kalziumkanal beeinflussen kann (Selim et al. 2006). Auch der CFTR-Chloridkanal kann durch extrazelluläre, sekretorische Moleküle beeinflusst werden (Liu et al. 2005). Für eine Regulation eines Chloridkanals müsste auch das mCLCA3-Protein mit einem Kanalprotein interagieren können. Die CLCA-Proteine besitzen in ihrer Aminosäuresequenz eine von Willebrand Faktor-Domäne (Gibson et al. 2005; Whittaker und Hynes 2002). Über solch eine Domäne können Proteine Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige CLCA-Vertreter in der Lage sind, über ein  $\beta$ 4-Bindungsmotiv mit  $\beta$ 4-Integrinen zu interagieren, um über die Fokaladhäsions-Kinase (FAK) eine extrazelluläre Signal regulierte Kinase (ERK) zu aktivieren (Abdel-Ghany et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2002). Ferner kann der mCLCA1-Vertreter mit einer Kanaluntereinheit (*large conductance potassium channel  $\beta$  subunit*) direkt in Verbindung treten (Greenwood et al. 2002). Somit sind die CLCA-Proteine offenbar durchaus in der Lage, über eine Protein-Protein-Interaktion selbst mit Bestandteilen von Kanälen einen Effekt herbeizuführen und als Signalmoleküle zu agieren.

Die in dieser Studie durchgeführten Analysen für eCLCA1, den orthologen Vertreter des Pferdes von mCLCA3 (Maus), hCLCA1 (Mensch) und pCLCA1 (Schwein), sprechen ebenfalls gegen das Vorliegen von Transmembrandomänen innerhalb seiner Aminosäuresequenz. Das Protein zeigte ein ähnliches Prozessierungsmuster wie mCLCA3. Auch das eCLCA1-Protein kann also aufgrund seiner Struktur keinen echten Kanal innerhalb der Plasmamembran bilden. Jedoch zeigte auch dieses CLCA-Mitglied nach heterologer Expression die Induktion einer Kalzium-aktivierten Chloridleitfähigkeit (Anton et al. 2005). Die Induktion dieser Chloridleitfähigkeit kann das Protein offenbar ebenfalls nur über eine direkte oder indirekte Signalwirkung auf andere, bislang unbekannt Kanäle hervorrufen.

Das frühere Modell, das die CLCA-Proteine als Transmembranproteine darstellte (Gruber et al. 2000), muss demnach zumindest für das mCLCA3-Protein und für das eCLCA1-Protein korrigiert werden. Anscheinend stellt die CLCA-Proteinfamilie eine strukturell heterogene Gruppe dar, wonach einige Vertreter mit einer carboxy-terminalen Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert sind (Elble et al. 2006), wohingegen andere Vertreter wie mCLCA3 und eCLCA1 keine Transmembrandomäne besitzen und vollständig sezerniert werden. Dass eine Proteinfamilie kein einheitliches strukturelles Muster aufweist, ist für einige Proteingruppen bekannt. So besteht die große Glykoproteinfamilie der Muzine aus löslichen und aus membrangebundenen Mitgliedern (Offner und Troxler 2000). Muzine sind der Hauptbestandteil des Mukus, der unter anderem von Becherzellen gebildet wird. Auch mCLCA3 und eCLCA1 werden ausschließlich in Becherzellen und anderen Muzin-produzierenden Zellen exprimiert (Anton et al. 2005; Komiya et al. 1999; Leverkoehne und Gruber 2002). Becherzellen sind hochspezialisierte, sekretorische Zellen, deren Hauptfunktion darin besteht, eine Muzinschicht zu produzieren, die das Gewebe vor pathogenen Mikroorganismen, vor Toxinen und vor Austrocknung schützt (Rogers 2003). Die Becherzelle sezerniert Muzinproteine wie die MUC5AC, MUC5B und MUC2 Muzine (Rogers 2003) und eine große Anzahl weiterer, sekretorischer Proteine wie die Proteine der *trefoil factor family* (TFF; Hoffmann et al. 2001). Interessanterweise im Hinblick auf ihre Struktur als lösliche Proteine können auch einige TFF-Proteine eine Chloridsekretion hervorrufen (Chinery und Cox 1995), jedoch sind weder der Mechanismus, wie das sezernierte Protein die Chloridsekretion hervorruft, noch ein potentieller Bindungspartner bekannt. Die Proteine mCLCA3 und eCLCA1 müssen also zu den sekretorischen Proteinen der Becherzellen hinzugezählt werden, bei denen der Mechanismus zur Erfüllung ihrer Funktionen noch unbekannt ist. Die beiden CLCA-Mitglieder mCLCA3 und eCLCA1 könnten möglicherweise einen bislang unbekanntem Chloridkanal in seiner Leitfähigkeit beeinflussen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese CLCA-Proteine mit einem Kanal interagieren können und welcher Mechanismus der Proteininteraktion zu Grunde liegt. Das Protein könnte direkt mit dem Kanal in Verbindung treten oder indirekt, z.B. G-Protein vermittelt, seinen Öffnungsmechanismus beeinflussen.

Eine weitere entscheidende Bedeutung dieser beiden CLCA-Proteine kommt ihrer Beteiligung bei Krankheiten der Atemwege zu. So spielt wie in der Literaturübersicht dargestellt mCLCA3 eine Schlüsselrolle beim Asthma-Mausmodell und eCLCA1 eine vermeintlich ähnliche Rolle bei der COB des Pferdes. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass mCLCA3 eine

entscheidende Rolle in der Muzinproduktion und in der Becherzellmetaplasie spielt (Holtzman et al. 2006; Nakanishi et al. 2001; Patel et al. 2006; Zhou et al. 2001; Zhou et al. 2002). Der Mechanismus, der hierfür verantwortlich ist, ist noch nicht geklärt. Zum einen wird eine ATP-vermittelte Muzin-Exozytose und eine über EGFR-Transaktivierung Adenosin-induzierte Muzinsynthese diskutiert (Bertrand et al. 2004; Holtzman et al. 2006; McNamara et al. 2004). Zum anderen muss auch eine Regulation der Muzinsynthese über eine Aktivierung der ERK in Betracht gezogen werden (Abdel-Ghany et al. 2002; Holtzman et al. 2006). Jedoch scheint eine Verbindung zwischen einem Ionenkanal und der Muzingenexpression zunächst unklar. Wie diese Arbeit hingegen eindeutig zeigt, ist mCLCA3 ein sekretorisches Protein und könnte so durchaus als Signalmolekül die Muzinproduktion beeinflussen und zu einer Becherzellmetaplasie führen. Weitere Studien müssen zeigen, ob das mCLCA3-Protein in der Lage ist, an Oberflächenrezeptoren zu binden und welche Signalwege dadurch eingeschaltet werden. Die Untersuchungen an unterschiedlichen mCLCA3-Knockout Mausmodellen konnten zeigen, dass je nach genetischem Hintergrund des Mausmodells mCLCA3 nicht essentiell für die Becherzellmetaplasie ist (Patel et al. 2006; Robichaud et al. 2005) oder aber zu einer Becherzellvermehrung beiträgt (Long et al. 2006). In der Untersuchung von Patel und Mitarbeiter identifizierten die Autoren mit mCLCA5 ein weiteres CLCA-Mitglied, welches ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Becherzellmetaplasie spielt (Patel et al. 2006). Anscheinend kann hier ein CLCA-Mitglied die Funktion eines fehlenden anderen CLCA-Mitglieds ersetzen. Strukturelle Untersuchungen an mCLCA5 sollten in Zukunft Aufschluss darüber geben, ob das Protein ganz sezerniert wird oder aber wie sein orthologer Vertreter beim Menschen hCLCA2 mit einer carboxy-terminalen Untereinheit in der Plasmamembran verankert ist und nur das amino-terminale Spaltprodukt sezerniert wird (Elble et al. 2006). Weitere Fragen, die daraus resultieren, lauten: Ist einer der beiden Untereinheiten für die Becherzellmetaplasie alleine verantwortlich? Und wenn ja, welche? Werden von beiden mCLCA-Mitgliedern die gleichen intrazellulären Signalwege angestoßen? Beeinflussen sich die beiden Vertreter synergistisch oder antagonistisch?

Die Erforschung der vermeintlich durch mCLCA3 und mCLCA5 vermittelten *downstream* Ereignisse ist von entscheidender Bedeutung: Erstens für das Verständnis ihrer Rolle bei der Becherzellmetaplasie und zweitens für die eventuelle therapeutische Intervention zur Beeinflussung von komplexen Atemwegserkrankungen wie Asthma (Zhou et al. 2002).

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass eCLCA1 und mCLCA3 keine echte Kanalfunktion besitzen können, sondern sezernierte Proteine darstellen. Diese Arbeit kann

jedoch nicht sicher ausschließen, dass eine Membran-Assoziation für die beiden CLCA-Proteine *in vivo* existiert. Die Möglichkeit, dass *in vivo* existierende spezifische Bindungspartner *in vitro* nicht exprimiert werden, könnte hier aufgrund der *in vitro*-Testsysteme nicht nachweisbar gewesen sein. Gegen diese Hypothese spricht jedoch die bereits veröffentlichte Beobachtung, dass das mCLCA3-Protein *in vivo* im Darmschleim vorliegt (Leverkoehne und Gruber 2002). Auch die Existenz eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers konnte für zahlreiche CLCA-Proteine experimentell ausgeschlossen werden (Elble und Pauli, persönliche Mitteilung). Weitere Arbeiten sollten zeigen, wie die Proteine ihre Funktionen, insbesondere die Induktion einer Chloridleitfähigkeit und die Becherzellmetaplasie bzw. Muzinproduktion, als sekretorische Proteine erfüllen. Gibt es Interaktionspartner, z.B. Chloridkanäle? Und falls ja, wie ist ihre molekulare Identität? Welche Signalwege oder regulatorischen Mechanismen werden von den Proteinen aktiviert?