

6 Zusammenfassung

Proteinbiochemische Strukturanalysen der orthologen CLCA-Proteine eCLCA1 des Pferdes und mCLCA3 der Maus: Ein Beitrag zum Verständnis ihrer Funktionsweisen

Lars Mundhenk

Die Mitglieder der CLCA-Familie stellen eine neu entdeckte Proteinfamilie dar, die funktionell mit einer Kalzium-aktivierten Chloridleitfähigkeit in verschiedenen Zelltypen im Zusammenhang steht. Die Vertreter mCLCA3 (Maus) und eCLCA1 (Pferd) spielen eine besondere Rolle bei Krankheiten mit gestörter sekretorischer Funktion. Insbesondere ihre Bedeutung bei der Becherzellmetaplasie, z.B. bei Asthma und chronischer-obstruktiver Bronchiolitis, ist von hoher biomedizinischer Relevanz. Funktionelle Analysen im heterologen Zellsystem zeigten in früheren Arbeiten, dass diese CLCA-Proteine eine der jener im Gewebe ähnlichen Chloridleitfähigkeit induzieren, die durch Kalzium als intrazellulärer Botenstoff gesteuert wird. Unklar war jedoch bisher, ob die CLCA-Proteine mit Hilfe von Transmembrandomänen einen eigenständigen Chloridkanal bilden oder ob sie Regulatoren eines anderen, bislang unbekanntem Chloridkanals darstellen. Für die CLCA-Proteine wurde früher ein Protein-Strukturmodell mit vier oder fünf Transmembrandomänen erstellt. Ein solcherart strukturiertes Protein könnte die Funktion eines Kanals erfüllen. In neueren immunhistochemischen und elektronenimmunhistochemischen Untersuchungen konnte das mCLCA3-Protein jedoch in der extrazellulären Muzinschicht über den Enterozyten gefunden werden, so dass mCLCA3 offenbar durchaus zumindest zum Teil von der Zelle abgegeben werden kann.

Diese Arbeit sollte die Fragestellung prüfen, ob mCLCA3 und eCLCA1 Transmembranproteine darstellen und so möglicherweise echte Kanäle ausbilden können, oder aber ob sie sezernierte Proteine sind. Zur Klärung dieser Frage wurden umfangreiche computergestützte und proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt. Zuerst wurden mit Hilfe von unterschiedlichen Computer-Algorithmen die Aminosäuresequenzen der Proteine nach möglichen Transmembrandomänen durchgemustert. Unter Anwendung der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie wurde mCLCA3 in transfizierten Säugetierzellen intrazellulär in sekretorischen Vesikeln lokalisiert, eine Plasmamembranassoziation dagegen war nicht nachweisbar. Nach Expression von mCLCA3 in Säugerzelllinien wurde in *pulse chase*-Experimenten die

Transportkinetik von mCLCA3 untersucht und mittels Westernblotanalyse wurde das Protein näher charakterisiert. Des Weiteren wurde das Glykosylierungsmuster der Proteine proteinbiochemisch bestimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die für die CLCA-Proteine charakteristische Spaltung des Vorläuferproteins für mCLCA3 und eCLCA1 im endoplasmatischen Retikulum stattfindet. Die mCLCA3- und eCLCA1-Spaltprodukte werden vollständig in den extrazellulären Raum als reife Glykoproteine sezerniert. Aufgrund des Fehlens von Transmembrandomänen können mCLCA3 und eCLCA1 daher keine eigenständigen Ionenkanäle bilden, somit kann eine echte Kanalfunktion für diese CLCA-Proteine ausgeschlossen werden. Als sekretorische Proteine sind sie aber offenbar durchaus in der Lage, indirekt eine Chloridleitfähigkeit zu induzieren. Außerdem könnten die CLCA-Proteine über eine Aktivierung von Signalwegen und regulatorischen Mechanismen die für Atemwegserkrankungen wie Asthma des Menschen und chronisch-obstruktive Bronchiolitis des Pferdes charakteristische Becherzellmetaplasie hervorrufen. Zukünftige Arbeiten sollten die Interaktionspartner und Funktionsmechanismen dieser CLCA-Proteine in Bezug auf die durch sie induzierte Chloridsekretion als auch auf die Becherzellmetaplasie und Muzinsynthese identifizieren.