

Aus dem Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie und dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin

DISSERTATION

Inactivation and Anion Selectivity of Volume-regulated Anion Channels Depend on C-terminal Residues of the First Extracellular Loop

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Momsen Reincke
aus Köln

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract in deutscher Sprache	2
2	Abstract in englischer Sprache	3
3	Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)	7
4	Druckexemplar der ausgewählten Publikation	8
5	Lebenslauf	18
6	Publikationsliste	19
7	Danksagung	20

1 Abstract in deutscher Sprache

Die Regulierung des Zellvolumens ist sowohl für das Überleben einer einzelnen Zelle als auch für das Funktionieren eines komplexen Organismus essentiell. Alle Wirbeltierzellen reagieren auf hypotone Schwellung mit dem durch Volumen-regulierte Anionen-Kanäle (VRACs) vermittelten Anionenstrom $I_{Cl,vol}$. Dieser Strom ist bereits seit Jahrzehnten beschrieben, die molekulare Identität der VRACs jedoch war bis vor kurzem unbekannt. Die Inaktivierung von $I_{Cl,vol}$ bei positiven Membranpotentialen ist ein Markenzeichen von VRACs, dennoch ist sowohl die Kinetik als auch die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Zelltyp zu Zelltyp sehr unterschiedlich.

Durch die Entdeckung, dass VRACs unterschiedlich aus LRRC8-Proteinen zusammengesetzte Heteromere sind, wurden nun endlich Struktur-Funktions-Untersuchungen von VRACs möglich. In dieser Arbeit wollten wir nun die molekularen Mechanismen der Inaktivierung von VRACs genauer untersuchen.

Der Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war die Beobachtung, dass HCT116-Zellen, die entweder nur LRRC8A/LRRC8C oder nur LRRC8A/LRRC8E exprimieren, deutlich verschiedene $I_{Cl,vol}$ -Inaktivierungsphänotypen zeigen, ganz wie man es auch in nativen Zellen beobachten kann. Davon ausgehend analysierten wir die Inaktivierungseigenschaften von verschiedenen LRRC8C/LRRC8E-Chimären. Auf diese Weise gelang es uns, eine hochkonservierte Region der LRRC8-Proteine zwischen Transmembranregion 1 und Transmembranregion 2 zu identifizieren, die für die beobachteten Unterschiede in der Kinetik und Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung verantwortlich ist. Indem wir einzelne Aminosäuren innerhalb dieser Region mutierten, gelang der Nachweis, dass die Ladung (jedoch nicht die Größe) der Aminosäuren an Position 98 und 100 in LRRC8A (sowie an entsprechenden Positionen in LRRC8C and LRRC8E) die Kinetik und Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung determinieren. Interessanterweise haben ladungsumkehrende Mutationen an Position 98 noch einen weiteren Effekt, und zwar eine Abschwächung der Iod > Chlorid Permeabilität von $I_{Cl,vol}$. Möglicherweise ist also besagte Region auch an der Bildung der Pore von VRACs beteiligt.

2 Abstract in englischer Sprache

Cell volume homeostasis is crucial for the survival of single cells, let alone the functioning of whole organisms. $I_{Cl,vol}$, a current mediated by Volume regulated anion channels (VRACs), can be elicited by hypotonic swelling in all vertebrate cells. VRACs, key players in volume regulation, have been known to exist for decades, however, their molecular identity has only recently been revealed. $I_{Cl,vol}$ inactivation at positive potentials has been described as a hallmark of VRACs, yet both kinetics and voltage-dependence of $I_{Cl,vol}$ inactivation differ vastly between cell types.

Structure-function analysis of VRACs was finally enabled by the recent discovery that VRACs are formed by differentially assembled heteromers of LRRC8 proteins. Fueled by this discovery, we sought to shed some light on the molecular basis of VRACs inactivation.

The starting point of this study was the fact that HCT116 cells expressing either only LRRC8A/LRRC8C or only LRRC8A/LRRC8E display strikingly different $I_{Cl,vol}$ inactivation phenotypes, mirroring those observed in native cells. This observation prompted us to carefully analyze the inactivation phenotype of LRRC8C/LRRC8E-chimeras, which lead to the identification of a highly conserved region between transmembrane region 1 and transmembrane region 2 of LRRC8 proteins which is accountable for the observed differences in inactivation kinetics and voltage-dependence. Moreover, by introducing point mutations in this region, we showed that charge but not size of the amino acids present at position 98 and 100 in LRRC8A (and respective positions in LRRC8C and LRRC8E) determined kinetics and voltage dependence of inactivation. Notably, introducing charge reverting mutations at position 98 also attenuated the iodide > chloride permeability of $I_{Cl,vol}$, therefore implying a possible role of said region in the formation of the pore.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Momsen Reincke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Inactivation and Anion Selectivity of Volume-regulated Anion Channels Depend on C-terminal Residues of the First Extracellular Loop‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe ‚Uniform Requirements for Manuscripts (URM)‘ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet. Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort, Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation: Florian Ullrich^{*}, **S. Momsen Reincke^{*}**, Felizia K. Voss, Tobias Stauber, Thomas J. Jentsch. Inactivation and Anion Selectivity of Volume-Regulated Anion Channels (VRACs) Depend on C-terminal Residues of the First Extracellular Loop. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33):17040–17048, Aug 2016. ^{*}**geteilte Erstautorenschaft**. Impact Factor 4.258

Als geteilter Erstautor war SMR an allen Schritten des Projektes (Planung des Projektes, Erhebung der Daten, Auswertung der Daten, statistische Analyse der Daten, Interpretation und Diskussion der Ergebnisse, Darstellung der Ergebnisse, Verfassen des Manuskriptes, Bearbeiten der Revision) beteiligt. Im Einzelnen hat SMR folgende Beiträge zum Paper geleistet:

- Elektrophysiologische Charakterisierung des „Wildtyps“ (Figure 1): Die Untersuchung der Konstrukte LRRC8A/LRRC8C und LRRC8A/LRRC8E per Transfektion im Quintupel-Knockout-Background erfolgte anteilig durch SMR, die Untersuchung der Tripel-Knockout-Zelllinien erfolgte komplett durch SMR.
- Klonierung und elektrophysiologische Charakterisierung von LRRC8C/LRRC8E-Chimären (Figure 2, sowie Daten nicht im Paper): Diese Arbeit, insbesondere das Design der Primer, die Durchführung der PCR, die Transformation der Bakterien und die Auswertung der Sequenzierung wurde für den überwiegenden Teil der untersuchten Chimären (mindestens 26 funktionale Chimären, sowie einige wenige nichtfunktionale Chimären) von SMR durchgeführt. All diese C/E-Chimären mit jeweils unterschiedlichen Anteilen von LRRC8C und LRRC8E wurden ausführlich elektrophysiologisch charakterisiert. Diese Arbeit legte als Screening-Teil des Projektes das Fundament, um die für die Inaktivierungskinetik relevanten Regionen zu identifizieren (Daten nicht im Paper). Die Identifizierung der relevanten Region (carboxyterminales Ende von ECL1, siehe Figure 2 im Paper) basiert auf diesen Daten und wurde komplett von SMR durchgeführt. Die im Paper als C1, C2, C3, C4 bezeichneten Chimären wurden von SMR kloniert. Die zu C1, C2, C3 und C4 veröffentlichten Daten wurden zur Hälfte¹ von SMR erhoben (Figure 2).
- Klonierung und elektrophysiologische Charakterisierung von LRRC8C/LRRC8E-Austausch-Punktmutanten (Figure 3): SMR klonierte die Konstrukte C-T101N, C-D102N, E-N92T, E-N93D, außerdem die Doppelmutanten C-T101N,D102N und E-N92T,N93D, sowie sechs weitere aus Platzgründen nicht im Paper veröffentlichte C/E und E/C-Mutanten. Die elektrophysiologische Charakterisierung der in Figure 3B-J dargestellten Konstrukte wurde zur Hälfte von SMR durchgeführt.

¹Die Formulierung „zur Hälfte“ ist wie folgt gemeint: Beim Großteil der im Paper veröffentlichten Daten sind in jedem einzelnen Plot bzw. jedem I/V-Diagramm Daten aus Messungen von *beiden* geteilten Erstautoren verwendet, meist im Verhältnis 50/50. Dieses Vorgehen diente als interne Kontrolle und zur Reduktion der Variabilität, die insbesondere bei Einzelmessungen mit langsamer Inaktivierung sehr hoch war.

- Elektrophysiologische Charakterisierung der Austauschmutationen in LRRC8A sowie ladungsumkehrende Mutationen in LRRC8C und LRRC8E (Figure 4A-H): Die elektrophysiologische Untersuchung der Konstrukte A-D100A, A-D100R, A-D100K, A-D100E, E-N93A, E-N93R, E-N93K, E-N93E, A-K98A, E-K91A, A-K98N, E-K91N, A-K98E, E-K91E wurde zur Hälfte von SMR durchgeführt.
- Zur Durchführung der elektrophysiologischen Experimente gehörte auch das Herstellen der intrazellulären und extrazellulären Lösungen. Weiterhin erfolgte die Durchführung geeigneter Kontrollen durch SMR (z. B. Kontrolle der Osmolarität der Lösungen, regelmäßige Negativ-Kontrollen durch Messungen an untransfizierten Quintupel-Knockout-Zellen).
- Die statistische Datenanalyse und Auswertung der oben genannten durch SMR erhobenen Daten erfolgte durch SMR. Die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse der oben genannten Daten erfolgte durch SMR. Die Planung des weiteren Vorgehens erfolgte in Abstimmung mit den anderen Autoren.
- Das Manuskript und die Revision wurde in Teilen von SMR verfasst.

Unterschrift des Doktoranden

3 Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Title Changes

Journal Summary List
 Journals from: **subject categories BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)
 Sorted by: **Impact Factor**

Journals 61 - 80 (of 289)

Page 4 of 15

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to Journal information)	ISSN	Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Eigenfactor [®] Metrics (y)	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	61	ADDICT BIOL	1355-6215	2906	4.547	4.439	1.366	93	4.0	0.00771		1.271
<input type="checkbox"/>	62	J MOL BIOL	0022-2836	61223	4.517	3.621	1.657	280	>10.0	0.05599		1.683
<input type="checkbox"/>	63	BIOFACTORS	0951-6433	2835	4.504	3.758	0.383	47	7.1	0.00406		0.916
<input type="checkbox"/>	64	BIOCONJUGATE CHEM	1043-1802	14322	4.500	4.558	1.040	278	7.0	0.02339		1.189
<input type="checkbox"/>	65	MATRIX BIOL	0945-053X	3837	4.470	4.137	2.161	62	8.1	0.06531		1.269
<input type="checkbox"/>	66	MOL CELL BIOL	0270-7306	59899	4.427	4.782	0.876	314	>10.0	0.06553		2.161
<input type="checkbox"/>	67	J LIPID RES	0022-2275	21219	4.368	4.542	1.060	216	8.8	0.03321		1.565
<input type="checkbox"/>	68	ACS CHEM NEUROSCI	1948-7193	2574	4.348	4.510	0.974	191	2.9	0.01106		1.390
<input type="checkbox"/>	69	RNA	1355-8382	11983	4.344	4.302	1.191	152	7.5	0.03665		2.289
<input type="checkbox"/>	70	CHROMOSOMA	0009-5915	3156	4.303	3.318	1.256	39	>10.0	0.00587		1.624
<input checked="" type="checkbox"/>	71	J BIOL CHEM	0021-9258	377497	4.258	4.403	0.953	2506	>10.0	0.47101		1.646
<input type="checkbox"/>	72	FEBS J	1742-464X	15151	4.237	4.082	1.113	310	5.3	0.04208		1.356
<input type="checkbox"/>	73	MOL PLANT MICROBE IN	0894-0282	9875	4.145	4.328	0.811	111	8.6	0.01326		1.267
<input type="checkbox"/>	74	AM J RESP CELL MOL	1044-1549	11341	4.082	4.052	1.087	161	8.1	0.02118		1.363
<input type="checkbox"/>	75	PROTEOMICS	1615-9853	15423	4.079	3.666	0.858	366	6.7	0.02745		1.063
<input type="checkbox"/>	76	RNA BIOL	1547-6286	3882	4.076	4.795	0.712	111	3.5	0.01967		2.067
<input type="checkbox"/>	77	J STEROID BIOCHEM	0960-0760	9241	3.985	3.787	1.123	212	8.5	0.01384		1.030
<input type="checkbox"/>	78	INT J BIOL SCI	1449-2288	3178	3.982	4.454	0.634	131	3.9	0.00949		1.158
<input type="checkbox"/>	79	J GENET GENOMICS	1673-8527	1469	3.981	3.013	0.389	54	4.6	0.00452		0.952
<input type="checkbox"/>	80	INT J BIOCHEM CELLB	1357-2725	14758	3.905	4.172	0.587	242	7.2	0.02588		1.257

Page 4 of 15

4 Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Florian Ullrich^{*}, **S. Momsen Reincke^{*}**, Felizia K. Voss, Tobias Stauber, Thomas J. Jentsch. Inactivation and Anion Selectivity of Volume-Regulated Anion Channels (VRACs) Depend on C-terminal Residues of the First Extracellular Loop. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33):17040–17048, Aug 2016. ***geteilte Erstautorenschaft**. Impact Factor 4.258

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.739342>

5 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6 Publikationsliste

Naturwissenschaftliche Artikel mit Peer-review

Florian Ullrich*, **S. Momsen Reincke***, Felizia K. Voss, Tobias Stauber, Thomas J. Jentsch. Inactivation and Anion Selectivity of Volume-Regulated Anion Channels (VRACs) Depend on C-terminal Residues of the First Extracellular Loop. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33):17040–17048, Aug 2016. ***geteilte Erstautorenschaft**. Impact Factor 4.258

Rosa Planells-Cases, Darius Lutter, Charlotte Guyader, Nora M. Gerhards, Florian Ullrich, Deborah A. Elger, Asli Kucukosmanoglu, Guotai Xu, Felizia K. Voss, **S. Momsen Reincke**, Tobias Stauber, Vincent A. Blomen, Daniel J. Vis, Lodewyk F. Wessels, Thijn R. Brummelkamp, Piet Borst, Sven Rottenberg, Thomas J. Jentsch. Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs. *EMBO Journal*, 34(24):2993–3008, Dec 2015. Impact Factor 9.6

Mathematische Artikel mit Peer-review

Momsen Reincke. Spectra of the Dirac Operator of Pseudo-Riemannian Spin manifolds. *Advances in Applied Clifford Algebras*, 2016. arXiv:1601.05376. Impact Factor 0,9

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Thomas Jentsch für die Überlassung des Themas bedanken. Durch ihn konnte ich erfahren, was es bedeutet, in einer herausragenden wissenschaftlichen Atmosphäre zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Florian für seine kompetente Einarbeitung und produktive Betreuung in allen Phasen des Projektes. Insbesondere möchte ich mich für die methodische Einführung in die Elektrophysiologie bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei allen anderen ElektrophysiologInnen aus der AG Jentsch bedanken, nämlich bei Ian für Hilfe bei Messungen an Slices und bei Kathrin und Jonas für die Überlassung der Setups sowie Unterstützung bei einigen denkwürdigen troubleshooting-Sessions.

Ich möchte mich bei Andreia für die Hilfe bei den Klonierungen bedanken, bei Ruth und Janet für Hilfe in der Zellkultur. Bei Karina und Steffi möchte ich mich für die Unterstützung während meiner Arbeit an den autaptischen Kulturen bedanken.

Zuletzt möchte ich Feli, Jonas, Andreia, Anja und Ian für die lustige Bürogemeinschaft sowie der gesamten Arbeitsgruppe Jentsch für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre danken.