Universität Ulm
Abteilung Allgemeine Physiologie
Leiter: Prof. Dr. Reinhardt Rüdel

Untersuchung der Topologie des humanen muskulären Chloridkanals hClC-1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Maya Kuchenbecker
aus Heidenheim
2000

Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Gierschik

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rüdel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Grissmer

Tag der Promotion: 20. Oktober 2000

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1. Ionenkanäle 1

1.2. Chloridkanäle 2

1.3. Die Familie der spannungsabhängigen ClC-Kanäle 3
1.3.1. Der skelettmuskuläre Vertreter 4
1.3.2. Volumen-sensitive Vertreter 4
1.3.3. In der Niere vorkommende Vertreter 5
1.3.4. Weitere Vertreter der ClC-Familie 5

1.4. Der humane skelettmuskuläre Chloridkanal hClC-1 6
1.4.1. Myotonia congenita 6
1.4.2. Elektrophysiologische Eigenschaften 7
1.4.3. Schaltmodell 9

1.5. Zink und andere Chloridkanalblocker 11

1.6. Das Topologiemodell 12

1.7. Die Porenregion 15

1.8. Zielsetzung der Arbeit 15

2. MATERIAL UND METHODEN 17

2.1. Material 17
2.1.1. Geräte 17
2.1.2. Chemikalien 18
2.1.3. Kits und Längenstandards 18
2.1.4. Bakterienstämme 19
2.1.5. Medien und Lösungen für Bakterienkulturen 19
2.1.6. Zellinien 20
2.1.7. Medien und Lösungen für Zellkulturen 20
2.1.8. Antikörper 20
2.1.9. Plasmidvektoren 21
2.1.10. Allgemeine Puffer 21
2.1.11. Sonstiges 21

2.2. Herstellung polyklonaler Antikörper 22
2.2.1. Peptiddesign 22
2.2.2. Immunisierung 22
2.2.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 23

2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 24

2.4. Western Blot 26

2.5. Sequenzspezifische Mutagenese 27

2.5.1. Mutageneseprimer 27
2.5.2. Mutagenesereaktion 28
2.5.3. Dpn I-Verdau 29
2.5.4. Bakterientransformation durch Hitzeschockbehandlung 29

2.6. Bakterientransformation mittels Elektroporation 29
2.6.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen 30
2.6.2. Elektroporation 30

2.7. Herstellung von Glycerinkulturen 31

2.8. Plasmidpräparation 31
2.8.1. Minipräparation 31
2.8.2. Midipräparation 32

2.9. DNA-Fällung 32

2.10. Restriktionsverdau 33

2.11. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten 33

2.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 34

2.13. Ligation mit T4-Ligase 34

2.14. Sequenzierung 35

2.15. Transiente Transfektion von tsA201 Zellen 36

2.16. Herstellung von Zell-Lysaten 37

2.17. Bestimmung des Proteingehalts von Zell-Lysaten 38

2.18. Immunofluoreszenzfärbung 39

2.19. Elektrophysiologie 41
2.19.1. Ganzzellmessungen 41
2.19.2. Meßlösungen 43
2.19.3. Meßpipetten 43
2.19.4. Datenerfassung 44
2.19.5. Spannungsprogramme 44
2.19.6. Datenanalyse 45
2.19.7. Applikation von $ZnCl_2$ 47

3. ERGEBNISSE 48

3.1. Herstellung polyklonaler Antikörper 48
3.1.1. Peptiddesign 48
3.1.2. Immunoreaktivität der Antikörper 50

3.2. Insertion und Lokalisation antigener Epitope 52
3.2.1. Epitopeinbau durch sequenzspezifische Mutagenese 52
3.2.2. Einbau des flag-Epitops 53
3.2.3. Expression der flag-Epitop-Mutanten 55
3.2.4. Funktionsuntersuchung der flag-Epitop-Mutanten 56

3.2.5. Einbau des HSV-Epitops 59
3.2.6. Expression der HSV-Epitop-Mutanten 61
3.2.7. Funktionsuntersuchung der HSV-Epitop-Mutanten 62
3.2.8. Immunofluoreszenzfärbung 64

3.3. Der hydrophile Abschnitt D4/5 und die Bildung der Porenregion 66
3.3.1. Deaktivierungskinetik der flag-Epitop-Mutante D4/5flag 66
3.3.2. Ionenselektivität und der Einfluß extrazellulärer Anionen auf die Deaktivierungskinetik des WT und der Mutante D4/5flag 67

3.4. Identifizierung extrazellulärer Zn^{2+}-Bindungsstellen im hClC-1 70
3.4.1. Entfernung potentieller Bindungsstellen 70
3.4.2. Funktionsuntersuchung der Cysteinmutanten 72
3.4.3. Zn^{2+}-Blockade der Cysteinmutanten 74
3.4.4. Die Doppelmutante C242A/C254A 76
3.4.5. Konzentrationsabhängigkeit der Zn^{2+}-Blockade 77

4. DISKUSSION 78

4.1. Lokalisierung von Transmembranlinkern des hClC-1 mit Hilfe spezifischer Antikörper 78
4.1.1. Herstellung sequenzspezifischer Antikörper 79
4.1.2. Epitopinsertion durch sequenzspezifische Mutagenese 81
4.1.3. Expression der flag-Epitop-Mutanten 81
4.1.4. Funktionalität der flag-Epitop-Mutanten 82
4.1.5. Einbau des HSV-Epitops 84
4.1.6. Lokalisation der Epitope 85

4.2. Der hydrophile Abschnitt D4/5 und die Bildung der Porenregion 86

4.3. Identifizierung extrazellulärer Zn^{2+}-Bindungsstellen 88

4.4. Das Topologiemodell und mögliche Porenregionen 91

5. ZUSAMMENFASSUNG 94

6. LITERATUR 96

7. ANHANG 104

7.1. Einbuchstabencode der Aminosäuren 104

7.2. Plasmidkarte 104

Abkürzungen

Neben den gebräuchlichen Abkürzungen für die Basen der DNA und dem Einbuchstabencode der Aminosäuren fanden folgende Abkürzungen Verwendung:

9-AC	Anthrazen-9-Carbonsäure
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fötales Rinderserum (foetal bovine serum)
Glg.	Gleichung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KLH	Keyhole limpet hemocyanin (Hämocyanin einer Napfschneckenart)
Lsg.	Lösung
MEM	Minimum Essential Medium
n	Stichprobenumfang
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PMSF	Phenylmethansulphonylfluorid
pNPP	4-Nitrophenyl-phosphat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	enzymatische Einheit (unit)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Ionenkanäle

Schon vor ca. 3 Milliarden Jahren hat die Natur das Prinzip entdeckt, Biomoleküle in eine Lipidschicht einzuhüllen, um sie so gegen die Umgebung abzugrenzen und ein spezifisches inneres Milieu zu schaffen. Dies war eine der wichtigsten Errungenschaften für die Entstehung des Lebens.

Da solche Lipidschichten jedoch nur für eine sehr begrenzte Anzahl von Molekülen passierbar sind, mußten Mechanismen geschaffen werden, die lebensnotwendige Transporte durch diese Barriere ermöglichen. Einen dieser Transportwege stellen Ionenkanäle dar. Diese Transmembranproteine bilden wassergefüllte Poren, die in geöffnetem Zustand bestimmten Ionen den Durchtritt durch Lipidschichten ermöglichen (Abb.1.1).

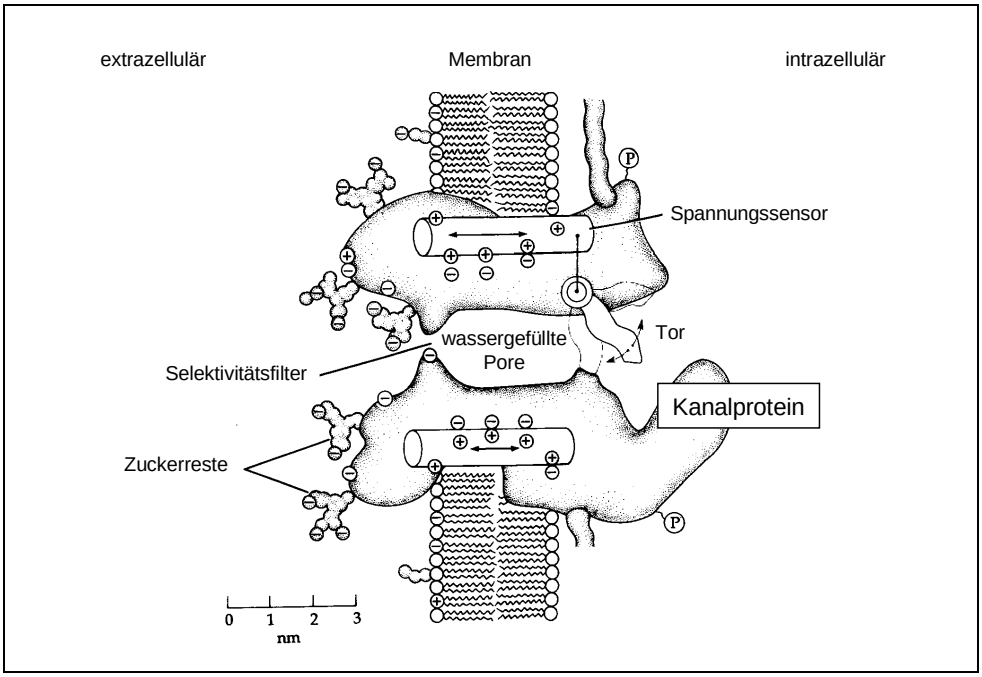


Abb.1.1: Modell eines spannungsabhängigen Ionenkanals nach B. Hille (1992)

Der Kanal bildet eine wassergefüllte Pore, die bestimmten Ionen den Durchtritt durch die Lipidschichten der Plasmamembran ermöglicht. Ein Selektivitätsfilter bestimmt, welche Ionen die Pore passieren können. Das Schaltverhalten des Kanals wird durch einen Spannungssensor reguliert.

Die meisten Ionenkanäle können ihre Ionendurchlässigkeit verändern und besitzen ein spezifisches Schaltverhalten. Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen: die ligandengesteuerten Ionenkanäle, deren Aktivität von der Bindung eines spezifischen Liganden abhängt, und die spannungsgesteuerten Ionenkanäle, deren Aktivitätszustand vom Potential der Plasmamembran beeinflußt wird.

1.2. Chloridkanäle

Während noch vor geraumer Zeit das Hauptaugenmerk der Ionenkanal-Forschung auf Kationenkanälen lag, war zu Beginn der neunziger Jahre die Klonierung der Gene für die beiden Kanäle CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Riordan *et al.*, 1989) und ClC-0 (Jentsch *et al.*, 1990) der Auslöser für die verstärkte Erforschung von Chloridkanälen.

Obwohl Chloridionen in der Regel weniger als die Hälfte der negativ geladenen Teilchen einer Zelle ausmachen, stellen sie in physiologischer Hinsicht eine der wichtigsten Anionen dar. Denn im Gegensatz zu den impermeablen organischen Anionen sind sie in der Lage, die Zellmembran zu durchqueren. Sie sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie z.B. transephitheliale Transportvorgänge, Regulation des Zellvolumens und des pH-Wertes, aber auch an der Erregbarkeit von Zellmembranen, beteiligt.

Neben dem γ-Aminobuttersäure-gesteuerten (GABA) Rezeptor (Schofield *et al.*, 1987) und dem Glycinrezeptor (Grenningloh *et al.*, 1987), die beide ligandengesteuerte Chloridkanäle sind und einen inhibitorischen Effekt auf die Erregungsweiterleitung an den Synapsen von Nervenzellen haben, gibt es vier weitere Gruppen, denen die bisher bekannten Chloridkanäle zugeordnet werden:

- die Familie der Calcium-aktivierten Chloridkanäle (Gruber *et al.*, 1998),
- die spannungsabhängigen, anionenselektiven Kanäle (VDACs) (Reymann *et al.*, 1995),
- der cAMP-aktivierte CFTR Kanal (Sheppard & Welsh, 1999), dessen Mutation Ursache der zystischen Fibrose ist, und
- die Familie der spannungsabhängigen ClC-Kanäle (Jentsch *et al.*, 1999), deren humaner skelettmuskulärer Vertreter hClC-1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.3. Die Familie der spannungsabhängigen ClC-Kanäle

Als erster Vertreter der Familie der ClC-Kanäle wurde 1990 der spannungsabhängige Chloridkanal ClC-0 des elektrischen Organs des Zitterrochens *Torpedo marmorata* von T.J. Jentsch und seinen Mitarbeitern kloniert (Jentsch *et al.*, 1990). Er war das erste bekannte Mitglied einer Genfamilie, die keinerlei Verwandtschaft zu anderen Ionenkanalfamilien zeigt und deren ständig steigende Zahl identifizierter Mitglieder derzeit 13 Kanäle umfaßt. Diese werden im gesamten Reich der Lebewesen von Bakterien und Hefen über Pflanzen bis zum Mensch gefunden (Jentsch *et al.*, 1999, Waldegger & Jentsch, 2000 a).

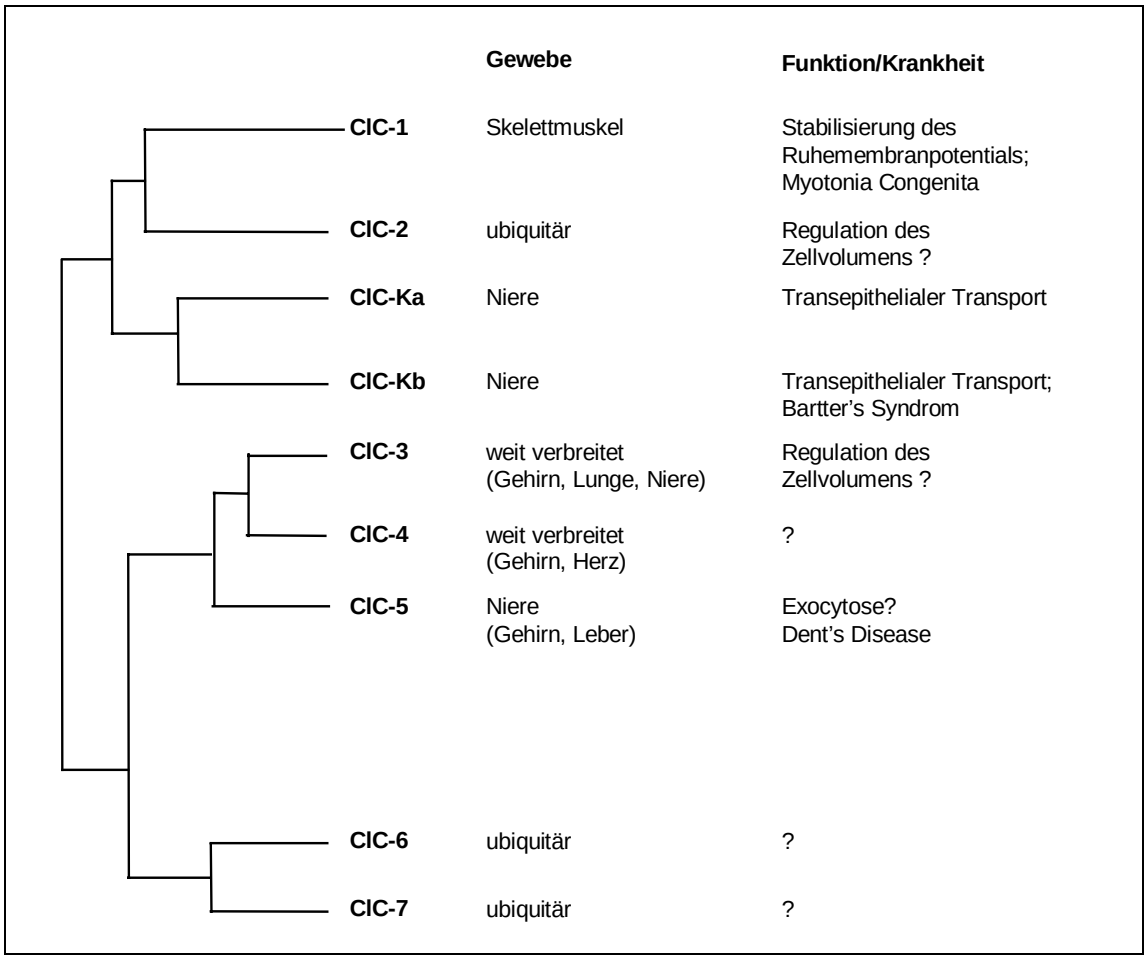


Abb.1.2: Phylogenetische Beziehung der humanen Mitglieder der ClC-Familie

Der phylogenetische Stammbaum der neun bisher bekannten ClC-Kanäle des Menschen wird in drei Äste unterteilt. Diese Äste besitzen weniger als 30 % Homologie zueinander. Hinter dem jeweiligen Kanal sind die Gewebe aufgeführt, in denen die Kanäle gefunden werden. Die letzte Spalte enthält die (mögliche) Funktion, sowie Erbkrankheiten, die durch Mutationen des Kanals hervorgerufen werden.

Beim Menschen sind neun Vertreter der ClC-Familie bekannt (Abb.1.2). Diese werden in den unterschiedlichsten Organen gefunden, wo sie eine Vielzahl verschiedenster Funktionen erfüllen, die die Erregbarkeit der Zellmembran (Steinmeyer *et al.*, 1991 a), den transepithelialen Transport (Kieferle *et al.*, 1994) und die Ansäuerung intrazellulärer Organellen (Luyckx *et al.*, 1998) umfassen. Möglicherweise spielen sie auch eine Rolle bei der Regulation des Zellvolumens (Gründer *et al.*, 1992). Die humanen ClC-Kanäle werden aufgrund ihrer phylogenetischen Abstammung in drei Äste unterteilt. Diese besitzen weniger als 30 % Homologie zueinander.

1.3.1. Der skelettmuskuläre Vertreter

Kurz nach der Entdeckung von ClC-0 im elektrischen Organ von *Torpedo marmorata*, das ontogenetisch von der Skelettmuskulatur abstammt, wurde mit Hilfe von Hybridisierungsstudien der muskuläre Chloridkanal der Säuger ClC-1 entdeckt (Steinmeyer *et al.*, 1991 a). Der Kanal wird fast ausschließlich im Skelettmuskel, in geringen Mengen auch im Herz und der Niere, exprimiert und ist verantwortlich für die, im Vergleich zu anderen Zellen, sehr hohe Chloridleitfähigkeit des Skelettmuskels.

Bei der Ratte konnte gezeigt werden, daß die Zunahme der Expression von ClC-1 in den ersten Wochen nach der Geburt mit der Zunahme der Chloridleitfähigkeit des Skelettmuskels korreliert und von dessen Innervation abhängig ist (Conte *et al.*, 1989, Klocke *et al.*,1994, Steinmeyer *et al.*, 1991 a).

1.3.2. Volumen-sensitive Vertreter

ClC-2 ist ein ubiquitär verbreiteter Vertreter der ClC-Genfamilie (Thiemann *et al.*, 1992), der durch sehr starke Hyperpolarisation, mechanische Dehnung der Zelle und durch einen sauren extrazellulären pH-Wert aktiviert wird. Die physiologische Funktion dieses Kanals ist noch weitgehend ungeklärt, es gibt jedoch Hinweise darauf, daß er an der Volumenregulation von Zellen beteiligt ist (Gründer *et al.*, 1992). Darüber hinaus wird vermutet, daß der Kanal in Nervenzellen die intrazelluläre Chloridkonzentration bestimmt und dadurch die Effekte postsynaptischer GABA-Rezeptoren modulieren kann (Smith *et al.*, 1995, Staley *et al.*, 1996).

Ein weiteres Mitglied der ClC-Familie, das im Zusammenhang mit der Regulation des Zellvolumens diskutiert wird, ist der Protein-Kinase C gesteuerte ClC-3 (Duane *et al.*, 1997, 1999, Kawasaki *et al.*, 1994). Die genaue physiologische Funktion dieses in einer Vielzahl von Geweben verbreiteten Kanals ist jedoch ebenfalls unklar (Wang *et al.*, 2000, Valverde, 1999).

1.3.3. In der Niere vorkommende Vertreter

Die beiden humanen Kanäle ClC-Ka und ClC-Kb (ClC-K1 und ClC-K2 bei der Ratte) sind zwei sehr homologe (80-90 % Homologie) Vertreter der ClC-Familie, die fast ausschließlich in der Niere vorkommen und dort eine wichtige Rolle bei der Urinkonzentrierung spielen (Adachi *et al.*, 1994, Kieferle *et al.*, 1994, Uchida *et al.*, 1993). Die physiologische Rolle des ClC-Kb wird sehr deutlich in der Tatsache, daß Mutationen in diesem Kanal zu der Erbkrankheit des Bartter's Syndrom Typ III führen (Simon *et al.*, 1997), das mit einem sehr starken renalen Salzverlust einhergeht. Bei Mäusen führt die Deletion des Gens für den ClC-K1 zur nephrogenen Diabetes Insipidus. Eine genauere Charakterisierung der ClC-K Kanäle scheiterte jedoch bisher an der Tatsache, daß lediglich der ClC-K1 und eine Chimäre aus ClC-K1 und ClC-Kb funktionell exprimiert werden konnten (Adachi *et al.*, 1994, Uchida *et al.*, 1995, Waldegger & Jentsch, 2000 b).

Ein weiterer Vertreter, der hauptsächlich in der Niere gefunden wird, ist ClC-5. Mutationen in diesem Kanal sind die Ursache der Dent's Disease (Lloyd *et al.*, 1996), einer durch Proteinurie und Hyperkalziurie verursachten Nierensteinerkrankung. Es wird vermutet, daß der Kanal an Exocytose-Vorgängen in der Niere beteiligt ist (Devuyst *et al.*, 1999, Günther *et al.*, 1998).

1.3.4. Weitere Vertreter der ClC-Familie

ClC-4 Kanäle werden in verschiedenen Geweben, unter anderem auch im Gehirn und Herz gefunden (van Slegtenhorst *et al.*, 1994). Sie zeigen große Homologie zu ClC-3 und ClC-5 Kanälen (~80 %), mit denen sie einen gemeinsamen Ast im Stammbaum der ClC-Familie bilden. In *Xenopus* Oocyten und Säugerzellen können sie funktionell exprimiert werden und zeigen dort elektrophysiologische Charakteristika, wie sie auch bei ClC-5 Kanälen

gefunden werden (Friedrich *et al.*, 1999). Über ihre physiologische Funktion ist jedoch noch nichts bekannt.

Die jüngsten Familienmitglieder ClC-6 und ClC-7 (Brandt & Jentsch, 1995) bilden ebenfalls einen eigenen Ast im Stammbaum der Genfamilie (Abb.1.2). Sie werden ubiquitär exprimiert und sind möglicherweise in den Membranen intrazellulärer Organellen lokalisiert (Buyse *et al.*, 1998).

1.4. Der humane skelettmuskuläre Chloridkanal hClC-1

Im Gegensatz zur Nervenzelle, wo das Ruhemembranpotential durch die Kaliumleitfähigkeit bestimmt wird, ist in der Muskelfaser eine vergleichsweise hohe Chloridleitfähigkeit für das Ruhemembranpotential verantwortlich. Im Säugetiermuskel trägt sie mit 70-80 % zum Ruhemembranpotential des Sarkolemms bei (Bretag, 1987, Bryant & Morales Aguilera, 1971, Hutter & Warner, 1967a, Palade & Barchi, 1977a). Erst 1991 konnte dieser Chloridleitfähigkeit, mit der Klonierung des ClC-1, ein Ionenkanal zugeordnet werden (Steinmeyer *et al.*, 1991 a).

1.4.1. Myotonia congenita

Die Bedeutung der hohen Chloridleitfähigkeit des Skelettmuskels wird durch die erbliche Muskelkrankheit Myotonia congenita verdeutlicht. Mutationen in CLCN1, dem Gen für den muskulären Chloridkanal, verursachen mehrere Formen einer Myotonie, die durch zeitweilige Muskelsteifheit charakterisiert sind (Koch *et al.*, 1992). Ursache dieser Muskelsteifheit ist eine reduzierte Chloridleitfähigkeit der Muskelfaser, die, wie im folgenden beschrieben, zu einer erhöhten Erregbarkeit des Muskels führt (Bryant, 1969, Lipicky *et al.*, 1971, Rüdel *et al.*, 1988).

Im Muskel kommt es während eines Aktionspotentials durch den Ausstrom von Kaliumionen aus der Muskelfaser zu einer Anhäufung dieser Ionen in den T-Tubuli. Im gesunden Muskel führt diese Kaliumakkumulation zu einer physiologisch unbedeutenden Depolarisation von 0,1 mV pro Aktionspotential, da das Membranpotential durch die hohe Leitfähigkeit für Chloridionen in der Nähe des Umkehrpotentials für Chlorid (-80 mV) gehalten wird. In myotonen Muskelfasern mit reduzierter Chloridleitfähigkeit hat die Kaliumanhäu-

fung jedoch eine bis zu zehnmal höhere Depolarisation zur Folge und kann erneute Aktionspotentiale, sogenannte „myotonic runs“, auslösen (Adrian & Bryant, 1974, Bryant, 1976). Es kommt zu einer Nachaktivität, die die Ursache der symptomatischen Muskelsteifheit der Myotonia congenita im Anschluß an willkürliche Muskelkontraktionen ist. Betroffene Patienten zeigen eine verzögerte Muskelrelaxation nach plötzlichen Muskelkontraktionen wie z.B. dem Händeschütteln.

Die Erkrankung wurde erstmals 1876 von dem selbst betroffenen Arzt A.J. Thomsen beschrieben (Thomsen, 1876). Sie tritt in zwei Formen auf: der autosomal dominant vererbten Form, auch Thomsen-Myotonie genannt, und der autosomal rezessiv vererbten Form, der Becker-Myotonie (Becker, 1957, 1977). Dank der intensiven Suche der vergangenen fünf Jahre sind bis heute mehr als 30 Mutationen des ClC-1 Kanals bekannt, die die beiden Formen dieser Myotonie verursachen.

Für die Myotonia congenita existieren mehrere Tiermodelle, wobei das älteste die myotone Ziege ist, von der bereits 1880 aus Tennessee (USA) berichtet wurde. Die Punktmutation A885P im ClC-1 verursacht bei diesen Tieren typische myotone Symptome, die einem autosomal dominanten Erbgang unterliegen (Beck *et al.*, 1996). Des weiteren sind mehrere Mausstämme bekannt, u.a. die ADR-Maus (arrested development of righting response), deren Erbgang rezessiv ist. Betroffene Tiere zeigen ab dem 10. bis 12. Tag nach der Geburt Schwierigkeiten beim Aufrichten aus der Rückenlage (Watkins & Watts, 1984). Ursache ist die Insertion eines Transposons in das Gen des ClC-1 (Steinmeyer *et al.*, 1991 b).

1.4.2. Elektrophysiologische Eigenschaften

Funktionelle ClC-1 Kanäle können in *Xenopus* Oocyten (Steinmeyer *et al.*, 1991 a) und verschiedenen eukaryotischen Zell-Linien exprimiert werden (Astill *et al.*, 1996, Fahlke *et al.*, 1995, Pusch *et al.*, 1994). Da ihre Einzelkanalleitfähigkeit mit ~1 pS jedoch sehr gering ist (Pusch *et al.*, 1994), gibt es bisher nur eine Studie, in der Einzelkanalmessungen durchgeführt wurden (Saviane *et al.*, 1999). Die meisten Daten basieren auf Ganzzellableitungen, d.h. auf makroskopischen Strömen.

ClC-1 Kanäle sind im gesamten Spannungsbereich geöffnet und zeigen einwärtsrektifizierende Eigenschaften. Ihre Anionenselektivität entspricht der Reihenfolge $Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$, und ihre spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit kann durch eine einfache

Boltzmann-Funktion beschrieben werden. Die Kanäle werden durch Depolarisation aktiviert und antworten auf hyperpolarisierende Spannungssprünge mit einem instantanen Stromanstieg, dem eine langsame unvollständige Deaktivierung folgt (Abb.1.3).

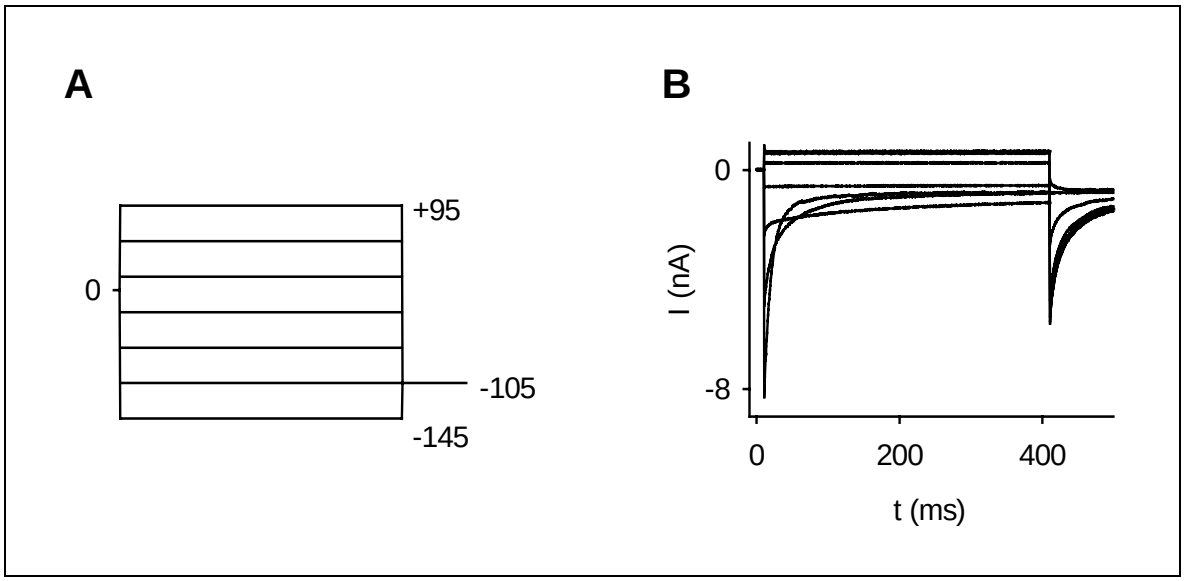


Abb.1.3: Ganzzellableitung einer ClC-1 exprimierenden eukaryotischen Zelle

A, Typisches Pulsprotokoll zur Charakterisierung von ClC-1 Strömen. Ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV erfolgen, im Bereich von –145 mV bis +95 mV, Spannungssprünge (400 ms) im Abstand von 40 mV. Im Anschluß wird die Membran für 100 ms auf einen konstanten Wert von -105 mV polarisiert.
B, Stromantwort einer ClC-1 exprimierenden Zelle auf das in A gezeigte Pulsprotokoll. Die Kanäle sind im gesamten Spannungsbereich geöffnet und antworten auf hyperpolarisierende Spannungssprünge mit einer unvollständigen Deaktivierung. Deutlich sind auch die einwärtsrektifizierenden Eigenschaften zu erkennen.

Das Deaktivierungverhalten kann mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen und einem konstanten Wert beschrieben werden:

$$I(t) = a_1\exp(-t/\tau_1) + a_2\exp(-t/\tau_2) + c \qquad \text{(Glg. 1)}$$

Dies zerlegt den Prozeß in drei Komponenten: eine schnell und eine langsam deaktivierende sowie eine konstante Komponente. Während die Stromkomponenten (a_1, a_2, c) der Anpassungskurve stark von der angelegten Spannung abhängen, sind die Zeitkonstanten (τ_1, τ_2) spannungsunabhängig. Auch das Aktivierungsverhalten der Kanäle kann auf diese Weise beschrieben werden (Fahlke *et al.*, 1996).

1.4.3. Schaltmodell

Für das Schaltverhalten des ClC-1 wurde von C. Fahlke und seiner Arbeitsgruppe (Fahlke *et al.*, 1996) ein Modell entwickelt, das den Vorgang in zwei unabhängige Prozesse zerlegt. Das Öffnen und Schließen des Kanals durch ein intrazelluläres Tor erfolgt in einem spannungsunabhängigen Prozeß, wobei das Tor direkt mit der Pore des Kanals interagiert und möglicherweise mit den Cl^--Ionen um eine gemeinsame Bindungsstelle konkurriert. Durch einen Spannungssensor wird in einem zweiten Prozess festgelegt, ob ein Kanal eine hohe oder niedrige Affinität zu seinem Tor besitzt und sich dementsprechend schnell, langsam oder gar nicht verschließt.

Wie in Abb.1.4 dargestellt, besteht der Spannungssensor aus zwei identischen Sensoren, die beide unabhängig von einander zwei mögliche Positionen (↑ und ↓) einnehmen können. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Sensor eine bestimmte Position einnimmt, ist spannungsabhängig und unterliegt einer Boltzmann-Verteilung. Da die beiden Konfigurationen ↑↓, ↓↑ funktionell identisch sind, entsprechen den vier möglichen Positionen des Spannungssensors (↑↑, ↑↓, ↓↑, ↓↓) drei verschiedene kinetische Konformationen des Kanals. Je nachdem, in welcher Konformation sich der Kanal befindet, besitzt er unterschiedliche Affinität zu seinem Tor und zeigt ein schnelles oder langsames bzw. gar kein Deaktivierungsverhalten. Ein möglicher Kandidat für den Spannungssensor ist die Aminosäure D136, deren Austausch durch Glycin eine besonders schwere Form der Myotonie verursacht. Die Mutation führt zu einer drastischen Veränderung der Spannungsabhängigkeit des Schaltverhaltens, ohne jedoch Poreneigenschaften wie z.B. die Ionenselektivität zu beeinflussen (Fahlke *et al.*, 1995).

Der Anteil der Kanäle, der sich bei einer bestimmten Spannung in einem der drei Zustände schnell, langsam oder nicht-deaktivierend befindet, wird durch die Amplituden der drei Stromkomponenten (a_1, a_2, *c)* der mathematischen Anpassungskurve (Glg. 1) wiedergegeben. Mit zunehmender Depolarisation nimmt dabei der Anteil schnell deaktivierender Kanäle (a_1) ab, während der Anteil nicht-deaktivierender Kanäle (*c*) zunimmt. Die langsam deaktivierende Komponente (a_2) zeigt einen glockenförmigen Verlauf, sie nimmt erst zu und später wieder ab (Fahlke *et al.*, 1996).

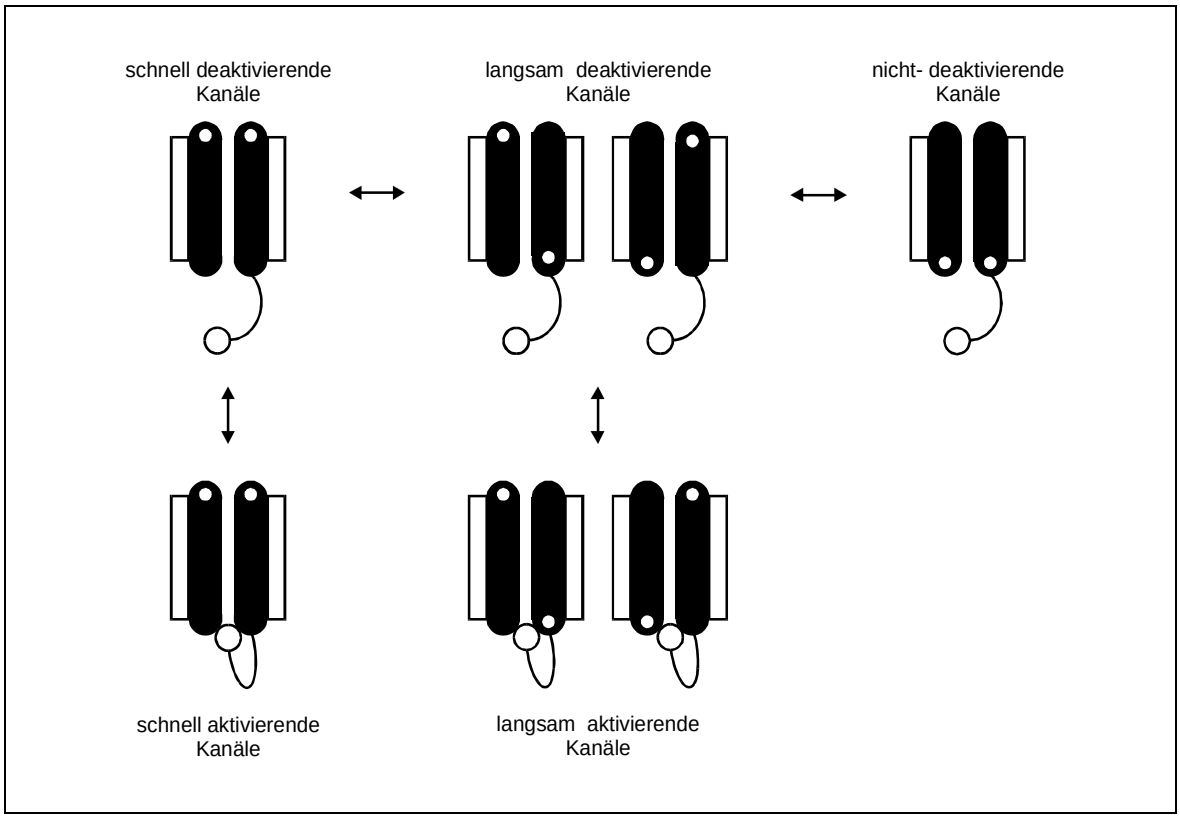


Abb.1.4: Schaltmodell des Chloridkanals ClC-1 nach Fahlke *et al.* (1996)

Der Spannungssensor des Kanals besteht aus zwei identischen Sensoren, die hier durch zwei weiße Kreise dargestellt werden. Diese Sensoren können unabhängig von einander zwei mögliche Positionen einnehmen und dadurch den kinetischen Zustand des Kanals (schnell, langsam oder nicht-(de)aktivierend) festlegen. Welche der zwei möglichen Positionen die Sensoren einnehmen, hängt von der Spannung an der Membran ab.

Die spannungsunabhängigen Zeitkonstanten (τ_1, τ_2) der Deaktivierung können durch Änderungen des intrazellulären pH-Werts oder durch Änderung des Chloridgradienten über der Membran beeinflußt werden. Diese Effekte lassen sich durch einen Schließmechanismus nach dem „ball-and-chain“ Prinzip erklären, wie er bereits für einige spannungsabhängige Kationenkanäle beschrieben wurde (Armstrong & Bezanilla, 1977, Hoshi *et al.*, 1990). Dabei wird die Porenöffnung des Kanals durch einen intrazellulär lokalisierten „Ball“ verschlossen, der sich frei beweglich an einem cytoplasmatischen Abschnitt des Kanalproteins („chain“) befindet und direkt mit der Pore interagiert (Abb.1.4). Der pH-Effekt auf die Zeitkonstanten läßt sich so durch die Beteiligung geladener Gruppen an dieser Wechselwirkung zwischen „Ball“ und Porenöffnung erklären. Die Tatsache, daß eine Veränderung des Chloridgradienten nur einen Effekt auf die Zeitkonstanten (τ_1, τ_2) zeigt,

legt es nahe, daß der intrazelluläre Schließmechanismus mit den Chloridionen um eine gemeinsame Bindungsstelle konkurriert.

Dieses von Fahlke *et al.* postulierte Schaltmodell des ClC-1 zeigt jedoch überraschend wenig Übereinstimmungen mit dem sogenannten „double-barrel“ Modell, das für den sehr nah verwandten *Torpedo* Kanal ClC-0 existiert und von Saviane *et al.* auch für den ClC-1 vorgeschlagen wurde (Saviane *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der ClC-Familie ist der ClC-0 sowohl auf makroskopischer als auch auf Einzelkanalebene sehr gut untersucht. Aufgrund der Einzelkanalmessungen geht man davon aus, daß er ein Dimer darstellt, das zwei identische Poren bildet („double-barrel“). Jede dieser „Proto“-Poren kann unabhängig von der anderen durch ein Tor verschlossen werden. Zusätzlich zu diesen zwei „schnellen“ Toren besitzt der Kanal ein „langsames“ Tor, das beide Poren gemeinsam verschließt (Ludewig *et al.*, 1996, 1997, Middleton *et al.*, 1994, 1996). Während die Aktivierung der „schnellen“ Tore durch Depolarisation erfolgt, zeigt das „langsame“ Tor eine über mehrere Sekunden andauernde, sehr langsame Aktivierung durch Hyperpolarisation. Im Gegensatz zu dem von Fahlke *et al.* postulierten Modell des ClC-1 ist das Schaltverhalten des *Torpedo* Kanals unabhängig von einem Spannungssensor und nur durch das passierende Anion gesteuert (Chen & Miller, 1996, Pusch *et al.*, 1995).

Ein „double-barrel“ Modell (Hanke & Miller, 1983), bei dem ein Kanal zwei unabhängige Poren besitzt, ist bisher ausschließlich für ClC-Kanäle beschrieben. Bei allen anderen untersuchten Ionenkanälen ermöglicht stets eine einzige Pore, die von mehreren Untereinheiten des Proteins gebildet wird, den Durchtritt der Ionen. Auch das von Fahlke *et al.* (1997c, 1998) postulierte Modell des ClC-1 entspricht einem solchen „single-barrel“ Modell, wobei die Pore von beiden Untereinheiten des Homodimers gebildet wird.

1.5. Zink und andere Chloridkanalblocker

Aus Studien am Froschmuskel ist es seit den sechziger Jahren bekannt, daß divalente Kationen wie Zn^{2+} und Cd^{2+} die Ruhemembranleitfähigkeit für Cl^--Ionen herabsetzen. Diese Reduktion der Leitfähigkeit ist pH-abhängig und sinkt mit abnehmenden pH-Werten

(Hutter & Warner, 1967a,b). Durch Applikation von Zn^{2+} können außerdem myotone Symptome am isolierten Rattenmuskel induziert werden (Bretag, 1987).

Aufgrund dieser frühen Beobachtungen war es naheliegend, daß auch der muskuläre Chloridkanal ClC-1 sensitiv für diese Kationen ist. Während Rychkov *et al.* (1997) am ClC-1 der Ratte eine pH-abhängige Blockade durch Cd^{2+}-Ionen zeigen konnten, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Blockade des humanen Kanals durch Zink untersucht (Kürz *et al.*, 1997). Auch der Kanal des elektrischen Organs von *Torpedo marmorata* ClC-0 (Chen, 1998) und der ubiquitär verbreitete Vertreter ClC-2 (Clark *et al.*, 1998) können durch extrazelluläre Zn^{2+}-Applikation geblockt werden.

Die externe Applikation von ZnCl führt beim hClC-1 zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Ströme, wobei das Maximum der Blockade ab einer Konzentration von 1 mM erreicht wird. Interne Zugabe von Zn^{2+} verändert die Ströme dagegen nicht. Die Stromreduktion ist irreversibel und betrifft sowohl den instantanen als auch den späten Strom. Das Schaltverhalten sowie die Poreneigenschaften der Kanäle bleiben dagegen unverändert. Es wird vermutet, daß an der Zn^{2+}-Blockade Cystein- und Histidinreste an der extrazellulären Oberfläche des hClC-1 beteiligt sind, wobei ein Hill-Koeffizient von 2,6 mindestens zwei Bindungspartner fordert (Kürz *et al.*, 1997).

Weitere typische Chloridkanalblocker sind aromatische Monocarbonsäuren wie die Anthrazen-9-Carbonsäure (9-AC). Auch 9-AC verursacht im Säugetiermuskel durch die Reduktion der Chloridleitfähigkeit myotone Symptome (Bryant & Morales Aguilera, 1971, Palade & Barchi, 1977b). Im Gegensatz zu ClC-0 und ClC-2, bei denen auch relativ hohe Konzentrationen von 9-AC (1 mM) nur geringe Effekte zeigen, werden ClC-1 Ströme bereits durch verhältnismäßig geringe Konzentrationen von 9-AC (0,1 mM) blockiert (Jentsch, 1994).

1.6. Das Topologiemodell

Die Topologie eines Ionenkanals gibt die transmembranäre Lokalisation bestimmter Proteinabschnitte wieder, d.h. sie legt fest, welche Abschnitte die Membran durchqueren und sogenannte Transmembrandomänen bilden, und welche auf der extra- bzw. intrazellulären Seite der Membran lokalisiert sind und sogenannte hydrophile Linkerregionen darstellen.

Die Kenntnis der Topologie liefert damit eine zweidimensionale Vorstellung über die Struktur eines Transmembranproteins. Zur Erstellung eines dreidimensionalen Strukturmodells sind dagegen Röntgen-Kristallstruktur-Analysen notwendig, die jedoch bisher für die wenigsten Membranproteine durchgeführt werden konnten.

Eine erste Näherung der Topologie eines Kanalproteins erhält man durch die Erstellung eines Hydrophobizitätsplots, der die Hydrophobizität bestimmter Proteinabschnitte aufgrund ihrer Aminosäurensequenz bestimmt. Hierzu erhält jeder der 20 möglichen Aminosäurereste einen bestimmten Hydrophobizitätswert. Diese Werte werden dann über ein Fenster gemittelt und dem entsprechenden Proteinabschnitt zugewiesen. Da Peptidsequenzen, die in der Zellmembran liegen, hydrophoben Charakter haben müssen, weisen Sequenzabschnitte von mindestens 20 aufeinanderfolgenden hydrophoben Aminosäuren auf potentielle Transmembrandomänen des Kanals hin.

Erste Hydrophobizitätsplots des *Torpedo* Kanals ClC-0 deuteten auf 13 hydrophobe Transmembranbereiche, die mit D1 bis D13 bezeichnet wurden, und einen cytoplasmatischen N-Terminus hin (Jentsch *et al.*, 1990). Im Laufe der Zeit und mit der Entdeckung immer neuer Mitglieder der ClC-Familie mußte dieses Modell jedoch mehrmals überarbeitet werden.

In einer ersten Anpassung wurde der C-Terminus sowie die nur wenig hydrophobe Domäne D13 dem Cytoplasma zugewiesen. Eine Studie am ClC-2 konnte zeigen, daß der intrazellulär lokalisierte N-Terminus auch dann noch das Schaltverhalten des Kanals reguliert, wenn er in C-terminale Bereiche bzw. vor D13 eingesetzt wird. Dies ist jedoch nur möglich, wenn diese Bereiche dieselbe Lokalisation aufweisen wie der ursprüngliche N-Terminus (Gründer *et al.*, 1992).

Auch der Linkerregion D8/9, die die Transmembrandomänen D8 und D9 verbindet, konnte eine neue Orientierung zugewiesen werden. Dies war durch die Identifizierung der Glykosylierungsstelle N430 möglich, da eine Glykosylierung nur auf der extrazellulären Seite der Membran stattfindet (Kieferle *et al.*, 1994, Middleton *et al.*, 1994). Die extrazelluläre Lokalisation von D8/9 erforderte jedoch eine gerade Anzahl von Transmembrandomänen, die vor diesem hydrophilen Linker liegen. Aus diesem Grund wurden in unterschiedlichen

Studien Modelle postuliert, die die Domäne D2 (Adachi *et al.*, 1994) bzw. D4 (Jentsch *et al.*, 1995, Middleton *et al.*, 1994) auf die extrazelluläre Seite verlegten.

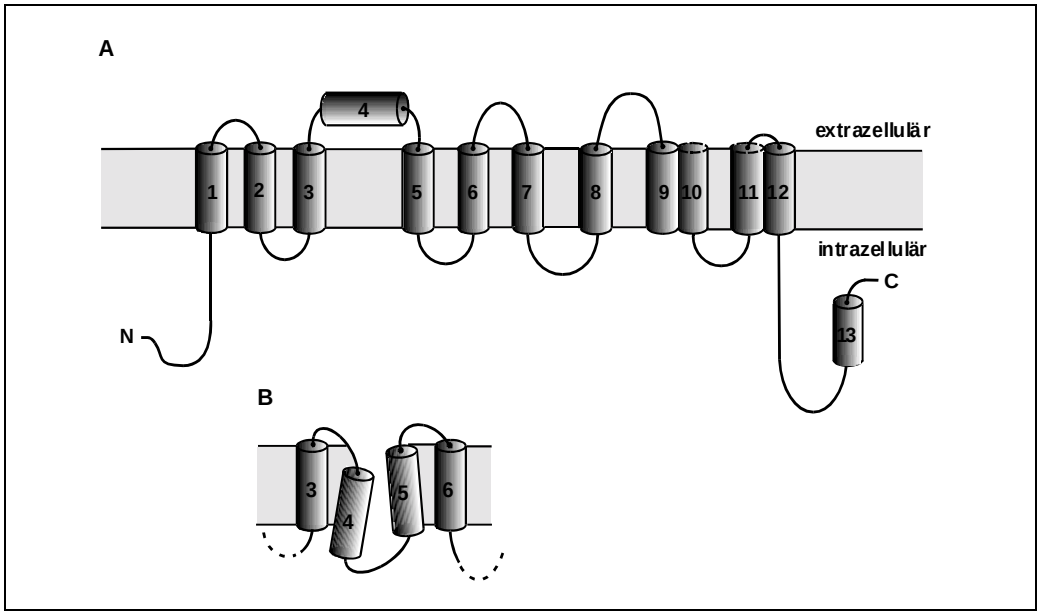


Abb.1.5: Das aktuelle Topologiemodell des skelettmuskulären Chloridkanals ClC-1

A, Das aktuelle Topologiemodell nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997) geht von 10 Transmembrandomänen sowie zwei cytoplasmatischen Termini aus. Die Domäne D4 wird entgegen ihrer ursprünglich transmembranären Lage auf der extrazellulären Seite lokalisiert.
B, Von Fahlke *et al.* (1997d) wurde ein Alternativmodell der Region D3-D6 postuliert, das die Domäne D4 in der Zellmembran lokalisiert.

Die erste systematische Topologie-Untersuchung, der das aktuelle Topologiemodell entstammt (Abb.1.5 A), wurde von Schmidt-Rose & Jentsch (1997) am ClC-1 durchgeführt. In dieser *in vitro* Studie wurden mehrere, sich zum Teil ergänzende biochemische Methoden eingesetzt. In einer Glykosylierungsstudie konnte mit Hilfe von künstlich eingebauten Glykosylierungsstellen mehreren Regionen des Kanals eine extrazelluläre Lokalisation zugewiesen werden. Intrazelluläre Bereiche wurden in einem sogenannten „Protease Protection Assay“ identifiziert. Nur intrazelluläre Proteinabschnitte sind während der Translation am endoplasmatischen Reticulum für Proteasen zugänglich.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß der 988 Aminosäuren umfassende Kanal 10 Transmembrandomänen sowie zwei cytoplasmatisch lokalisierte Termini besitzt. Außerdem sprechen die Ergebnisse für eine extrazelluläre Lokalisation der Domäne D4. Letzte-

res steht jedoch im Widerspruch zu „Cysteine Scanning“ Untersuchungen, die diese Domäne, wie in Abb.1.5,B dargestellt, in der Membran lokalisieren (Fahlke *et al.*, 1997d). Beim „Cysteine Scanning“ werden durch Aminosäurenaustausch Cysteinreste in das Kanalprotein eingefügt und ihre Zugänglichkeit für extrazellulär applizierte Sulfhydryl-reaktive Substanzen getestet. Die Topologie des sehr großen hydrophoben Bereichs von Transmembrandomäne D9 bis D12 konnte ebenfalls nicht vollständig aufgeklärt werden, weshalb anstelle der postulierten 10 Transmembrandomänen auch 12 denkbar wären.

1.7. Die Porenregion

Während es als bewiesen gilt, daß die ClC-Kanäle Homodimere bilden (Fahlke *et al.*, 1997c, Middleton *et al.*, 1996), herrscht über die Anzahl der Poren, die ein funktioneller ClC-Kanal besitzt, noch weitgehendst Uneinigkeit. So gibt es zwar eine Reihe von Hinweisen, welche Regionen an der Bildung der Pore(n) beteiligt sein könnten, ein konkretes Modell wurde jedoch noch nicht postuliert.

Die erste identifizierte Mutation, die die Poreneigenschaften eines ClC-Kanals verändert, war die Mutation der Aminosäure K519 am Ende von D12 des *Torpedo* Kanals ClC-0 (Ludewig *et al.*, 1997, Pusch *et al.*, 1995). Ersetzt man diesen positiv geladenen Aminosäurerest, so ändern sich die Ionenselektivität sowie das Schaltverhalten des Kanals.

Eine weitere wichtige Region, in der Mutationen die Poreneigenschaften des Kanals verändern, ist der Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen D2 und D5 (Fahlke *et al.*, 1997a, Ludewig *et al.*, 1996, Schmidt-Rose & Jentsch, 1997, Steinmeyer *et al.*, 1994). Hier konnte insbesondere eine sehr konservierte Region am C-terminalen Ende von D3 als wichtiger Bestandteil des Selektivitätsfilters identifiziert werden. Ersetzt man einen bestimmten Bereich hinter der Transmembrandomäne D3 des ClC-1 durch die entsprechende Region des ClC-3, so zeigt ClC-1 dieselbe Ionenselektivität wie ClC-3 (Fahlke *et al.*, 1997d).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz zu den Kationenkanälen, bei denen sehr viel über Struktur-Funktions-Beziehungen bekannt ist, besteht bei den ClC-Kanälen diesbezüglich noch sehr viel Un-

klarheit. Da die Kenntnis der Transmembrantopologie eines Ionenkanals eine wichtige Voraussetzung für die Bestimmung solcher Beziehungen ist, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, das aktuelle Topologiemodell des hClC-1 weiter zu verifizieren. Mit einem immunochemischen und einem elektrophysiologischen Ansätz wurden dabei zwei sehr unterschiedliche Strategien verfolgt.

Lokalisierung hydrophiler Kanalregionen mit Hilfe spezifischer Antikörper:

- Durch eine Immunisierung mit synthetischen Peptiden sollten Antikörper gegen bestimmte Sequenzabschnitte des Kanalproteins hergestellt werden und mit deren Hilfe die intra- bzw. extrazelluläre Lokalisation bestimmter Proteinabschnitte durch eine Immunofluoreszenzfärbung von ClC-1 exprimierenden Zellen bestimmt werden.

- Zusätzlich sollten in einem parallelen Ansatz sogenannte antigene Epitope in das Kanalprotein inseriert werden. Unter antigenen Epitopen versteht man Aminosäuresequenzen, die die Erkennungssequenzen kommerziell erhältlicher Antikörper darstellen. Sie ermöglichen in einer Immunofluoreszenzfärbung die Lokalisierung der Proteinabschnitte, in die sie eingebaut wurden. Für die Insertion der Epitope mußte eine molekularbiologischen Methode entwickelt werden, mit der kurze Aminosäuresequenzen an beliebigen Stellen in ein Protein eingebaut werden können.

  Anhand der elektrophysiologischen Untersuchungen der epitoptragenden Kanäle erhoffte man sich außerdem, zusätzliche Informationen über mögliche funktionelle Abschnitte des Kanalproteins.

In einem weiteren Projektabschnitt sollten Cysteinreste des hClC-1 identifiziert werden, die eine in unserer Arbeitsgruppe beschriebene Stromblockade durch Zn^{2+}-Ionen vermitteln (siehe S.11). Da die Stromblockade nur durch extrazellulär appliziertes Zink hervorgerufen wird, gäbe die Identifizierung entsprechender Cysteinreste weitere Aufschlüsse über extrazellulär lokalisierte Proteinabschnitte.

- Um die Beteiligung einzelner Cysteine an der Zn^{2+}-Blockade zu untersuchen, mußten zuerst extrazellulär lokalisierte Cysteinreste des Kanals, mit Hilfe der sequenzspezifischen Mutagenese, gegen Alanin ausgetauscht werden. Die Effekte dieses Aminosäureaustausches auf die Zn^{2+}-Blockade sollten anschließend durch elektrophysiologischen Messungen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

ELISA-Reader	Tecan Austria, Salzburg
Thermocycler	Techne, Cambridge, Großbritannien
Axiovert 135 mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (HBO 50 Lampe, Filtersatz: FT 510, LP 520)	Zeiss, Oberkochen
ABI 377 HT Sequenziermaschine	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Bilderfassungssystem Cypertech CS-1	Cypertech GmbH, Berlin
Chinon CP-7M Spiegelreflexkamera	Chinon Industries Inc., Tokio, Japan
DMZ Universal Puller	Zeitz-Instrumente, Augsburg
Easyject PLUS Elektroporator	Eurogentec, Seraing, Belgien
EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker	HEKA Elektronik, Lambrecht
Mikromanipulator	Märzhäuser, Wetzlar
Mini-PROTEAN® cell (PAGE und Western Blot)	Bio-Rad, München
Mini-sub® cell GT (Agarosegelelektrophorese)	Bio-Rad, München
Osmomat® 030	Gonotec, Berlin
Gene Quant II (Photometer)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Schwingungsgedämpfter Tisch	Newport, Irvine, USA
Power Pac 200 (Spannungsgeber)	Bio-Rad, München
UV-Leuchttisch	Bachhofer, Reutlingen

2.1.2. Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Acrylamidlösung 30 %; Acrylamid/bis-Acrylamid (37,5:1)	Sigma, Deisenhofen
Agar	Life Technologies, Eggenstein
Agarose, ultra pure (für Elektrophorese)	Life Technologies, Eggenstein
dNTPs	AGS, Heidelberg
Dulbeccos PBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom KG, Berlin
EDTA, 1 % in PBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom KG, Berlin
Ethidiumbromid	Fluka, Neu-Ulm
FBS (Foetal Bovine Serum)	Life Technologies, Eggenstein
FMC NuSieve® 3:1 Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
FMC SeaPlaque® GTG® Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Geneticin® (G-418 Sulphat)	Life Technologies, Eggenstein
Hefeextrakt	Life Technologies, Eggenstein
MEM mit Earle's Salzen und L-Glutamin	PAA, Martinsried
4-Nitrophenyl-phosphat (SIGMA FAST pNPP)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin, 2,5 % in PBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom KG, Berlin
Tryptone	Life Technologies, Eggenstein

2.1.3. Kits und Längenstandards

Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
QIAfilter Midi Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
SeeBlue™ Standard	NOVEX, San Diego, CA
SuperSignal®-Kit	Pierce, Rockford, Illinois
TSA™-Direct green Kit	NEN Life Science Products, Boston
1 kb-Marker	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp ladder	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4. Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL1-Blue

DH5α

2.1.5. Medien und Lösungen für Bakterienkulturen

LB-Medium:

Tryptone	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g

ad 1000 ml H_2O, pH 7,2

SOC-Medium:

Tryptone	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
$MgSO_4$	10 mM
MgCl	10 mM
Glucose	20 mM

ad 1000 ml H_2O, pH 7,2

Agarplatten: Das Medium wurde mit 1,5 % Agar versetzt. Gegebenenfalls wurde nach dem Autoklavieren, bei einer Temperatur von weniger als 50 °C, ein Antibiotikum zugegeben.

Antibiotika: 100 µg/ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) Sigma, Deisenhofen

2.1.6. Zellinien

tsA201: HEK293 Zellinie (ATCC CRL 1573), die das Simian Virus 40 (SV40) „large T-Antigen“ exprimiert; dies ermöglicht eine episomale Replikation von Plasmiden, die den SV40 „origin of replication“ besitzen (Margolskee *et al.*, 1993).

HEK293/C1: HEK293 Zellinie (ATCC CRL 1573), die den Chloridkanal hClC-1 exprimiert (Fahlke *et al.*, 1995).

2.1.7. Medien und Lösungen für Zellkulturen

Trypsin/EDTA: 0,15 % Trypsin, 0,08 % EDTA in PBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+}

Medium für tsA201 Zellen: MEM mit 10 % FBS (MEM 10 %)

Medium für HEK/C1 Zellen: MEM 10 % mit 330 µg/ml Geneticin®

Kultivierung: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % Luftfeuchtigkeit; die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit Hilfe von 1 ml Trypsin/EDTA von den Kulturflaschen abgelöst und vereinzelt. Die Enzymreaktion wurde nach 30 Sekunden Inkubation durch Zugabe von 1 ml FBS und 5 ml PBS gestoppt, die Zellen mit 1000 g abzentrifugiert und nach dem Resuspendieren in 2 ml Medium auf neue Kulturflaschen verteilt.

2.1.8. Antikörper

ImmunoPure® Ziege anti-Kaninchen IgG HRP gekoppelt, affinitätsgereinigt, 0,8 mg/ml	Pierce, Rockford, Illinois
Ziege anti-Maus IgG, HRP gekoppelt, affinitätsgereinigt	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen anti-Hühner IgG, HRP gekoppelt, affinitätsgereinigt	Sigma, Deisenhofen
AffiniPure® Kaninchen anti-Hühner IgG AP gekoppelt, affinitätsgereinigt, 0,6 mg/ml	Dianova, Hamburg
Monoklonaler anti-FLAG® M2 Antikörper Maus IgG1, 3,6 mg/ml	Sigma, Deisenhofen

Monoklonaler anti-HSV® Antikörper Maus IgG1, 1 mg/ml	Sigma, Deisenhofen

Kaninchen anti-ClC-1 Antiserum: Das Antiserum wurde freundlicherweise von Dr. K.P. Campbell zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung wurden Kaninchen mit einem Peptid immunisiert, das den letzten 15 Aminosäuren des ClC-1 Kanals der Ratte (rClC-1) entspricht. Da der C-Terminus des rClC-1 homolog zum C-Terminus des humanen Chloridkanal hClC-1 ist, erkennt dieser Antikörper die Kanalproteine beider Spezies (Gurnett *et al.*, 1995).

2.1.9. Plasmidvektoren

pRc/CMV-hClC-1: eukaryotischer Expressionsvektor pRc/CMV (Invitrogen, Groningen, Niederlande), in den die cDNA des hClC-1 inseriert wurde (Fahlke *et al.*, 1995).

pEGFP: eukaryotischer Expressionsvektor, der das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) enthält (Clontech, Heidelberg). EGFP ist eine Mutante des „green fluorescent proteins“ mit erhöhter Leuchtkraft.

2.1.10. Allgemeine Puffer

PBS:	KCl	2,6 mM
	NaCl	137 mM
	Na_2HPO_4	6,5 mM; pH 7,2

PBS/Tween: 0,1 % Tween20 in PBS

2.1.11. Sonstiges

Borsilikatglaskapillaren (Patch, Clark GC 150 TF thinwall)	Harvard Apparatus Ltd., Kent
Kodak Ectachrom 400 Farbdiafilm	Eastman Kodak, Rochester, NY
Lumi-Film Chemiluminescence Detection Film	Roche Diagnostics, Mannheim
Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm)	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilmkassette Hypercassette™	Amersham, Buckinghamshire, UK

2.2. Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper gegen bestimmte Proteinabschnitte des hClC-1 wurde eine Immunisierung mit synthetischen Peptiden entsprechender Aminosäuresequenz durchgeführt. Die Synthese dieser Peptide sowie die Immunisierung und die Aufreinigung der Antikörper durch eine fraktionelle Fällung mit Polyethylenglycol (Polson *et al.*, 1980) wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt.

Die Immunoreaktivität der aufgereinigten Antikörperfraktionen wurde anschließend im ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) getestet. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit den zur Immunisierung verwendeten Peptiden beschichtet und die Bindung spezifischer Antikörper an diese immobilisierten Peptide getestet.

2.2.1. Peptiddesign

Für eine Immunisierung geeignete Proteinabschnitte müssen 14-16 Aminosäuren lang sein. Da sie keinesfalls innerhalb von Transmembrandomänen liegen dürfen, sollten sie außerdem möglichst hydrophilen Charakter haben. Die Auswahl der Peptid-Sequenzen erfolgte deshalb, unter Verwendung des Computerprogramms Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin), anhand eines Hydrophobizitätsplots nach Kyte und Doolittle (1982).

Diese Methode bestimmt die Hydrophobizität einzelner Proteinabschnitte aufgrund ihrer Aminosäuresequenz. Dabei wird jedem der 20 möglichen Aminosäurereste ein bestimmter Hydrophobizitätswert zugewiesen. Diese Werte werden jeweils über ein Fenster von 9 Aminosäuren gemittelt und der entsprechenden Position im Protein, die in der Mitte des Fensters liegt, zugewiesen.

Da kleine Moleküle nur geringe antigene Eigenschaften haben, wurden die Peptide nach ihrer Synthese an das Trägermolekül KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt. KLH ist ein Glykoprotein, das bei Immunisierungen neben BSA (bovine serum albumin) routinemäßig zur Kopplung von Peptiden verwendet wird.

2.2.2. Immunisierung

Als Versuchstiere für die Antikörperproduktion wurden Hühner eingesetzt. Bei diesen Tieren lassen sich spezifische Antikörper nicht nur im Serum nachweisen, sondern auch in den

von ihnen gelegten Eiern. Das sogenannte IgY (yolk), das der Immunglobulinklasse G der Säuger entspricht, wird über aktive Prozesse in den Dotter transportiert und kommt dort sogar in höheren Konzentrationen als im Serum vor (Bar-Joseph & Malkinson, 1980). Nach ihrer Isolierung aus dem Dotter kann die polyklonale IgY-Fraktion analog zu polyklonalen Antiseren eingesetzt werden.

Je Peptid wurden zwei verschiedene Tiere immunisiert. Diese erhielten innerhalb von 56 Tagen vier Injektionen mit dem entsprechenden Antigen (boost 1-4). Die Eidotter wurden ab Tag 38 nach Beginn der Immunisierung gesammelt und zu je zwei Fraktionen vereinigt.

Immunisierungsprotokoll:

Tag	**0**	**14**	**28**	**38**	**56**		**80**
Injektion	boost 1	boost 2	boost 3		boost 4		
Eidotter	prä-immun			Eidotter wurden ab Tag 38 gesammelt Fraktion I: Tag 38 bis Tag 53 Fraktion II: Tag 66 bis Tag 80			

2.2.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Lösungen:

Coating-Puffer: NaCarbonat 5 mM, pH 9,6

Blockierungspuffer: 1 % BSA in PBS/Tween

- Um die Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden Antigen zu beschichten, wurden sie über Nacht bei 4 °C mit 50 µl Peptid (0,01 µg/µl) in Coating-Puffer inkubiert.
- Nach fünf Waschschritten mit je 200 µl PBS/Tween folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation (4 °C) mit 50 µl Blockierungspuffer.
- Anschließend wurden die Platten für zwei Stunden bei RT mit 50 µl verschiedener Verdünnungen (1-1:64) des primären Antikörpers (0,1 mg/ml in Blockierungspuffer) inkubiert.

- Nach weiteren fünf Waschschritten mit je 200 µl PBS/Tween erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Die Platten wurden dazu für eine Stunde mit 50 µl des an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Antikörpers (1:1000 Verdünnung in Blockierungspuffer) behandelt (RT).
- Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch 5-maliges Waschen mit je 200 µl PBS/Tween entfernt und spezifisch gebundene Antikörper durch eine abschließende Farbreaktion mit 4-Nitrophenyl-phosphat (pNPP) als Substrat (1 mg/ml in 0,2 M Tris-Puffer) sichtbar gemacht.

Die enzymgekoppelte Farbreaktion erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation, die im Dunkeln bei RT durchgeführt werden muß. Dabei wird pNPP mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase durch hydrolytische Abspaltung einer Phosphatgruppe in p-Nitrophenol umgewandelt. P-Nitrophenol ruft eine Gelbfärbung hervor, die nach dem Stoppen der Reaktion mit 0,5 M EDTA (pH 9,0) im Photometer bei 405 nm quantifiziert werden kann. Die Farbentwicklung ist der Menge an gebundenem, primärem Antikörper direkt proportional. Es ist darauf zu achten, daß pNPP in Lösung sehr instabil ist und das Substrat deshalb stets frisch angesetzt werden muß.

2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein allgemeines Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu ihrer Trennung in einer Gelmatrix ausgenutzt wird. Eine spezielle Methode zur Auftrennung von Proteinen ist dabei die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).

Bei dieser Methode werden die Proteine vor ihrer elektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe von SDS und β-Mercaptoethanol denaturiert. Da die meisten Proteine SDS in einem konstanten Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1 % SDS-Lösung) binden, erhalten sie dadurch eine SDS-Hülle, die ihnen eine negative Nettoladung verleiht, die ihrer Größe proportional ist. Auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, wandern diese SDS-Protein-Komplexe in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Dabei werden sie durch den Siebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Bei dem in dieser Arbeit angewandten Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970) unterstützt ein zusätzliches Sammelgel, das sich in seiner Salzkonzentration sowie im pH vom Trenngel unterscheidet, die Bildung sehr diskreter Banden.

Lösungen:

Lösung A: 30 % Acrylamid/bis-Acrylamid (37,5:1)

Lösung B: 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8

Lösung C: 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8

Lösung D: 10 % SDS

Lösungen	Trenngel 12 %	Trenngel 7 %	Sammelgel 4 %
Lsg. A	4 ml	2,34 ml	650 µl
Lsg. B	2,5 ml	2,5 ml	-
Lsg. C	-	-	1,25 ml
Lsg D	100 µl	100 µl	50 µl
H_2O	3,5 ml	5,0 ml	3,05 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl

Elektrodenpuffer:	Tris/HCl	25 mM; pH 8,3
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %
SDS-Probenpuffer:	Tris/HCl	62,5 mM; pH 6,8
	Glycerin	10 %
	SDS	1 %
	β-Mercaptoethanol	1 %
	Bromphenolblau	0,001 %

Die Proteinauftrennung erfolgte bei 140 V in einem 7 bzw. 5,5 %-igen Polyacrylamidgel. Pro Spur wurden 5-10 µg Protein in denaturierendem SDS-Probenpuffer aufgetragen. Im Gegensatz zur Standardmethode, bei der die Denaturierung durch eine Erhitzung auf 95 °C verstärkt wird, darf die Denaturierung der ClC-1 Kanäle nicht bei 95 °C durchgeführt werden, da das Kanalprotein unter diesen Bedingungen nicht mehr in die Gelmatrix einwan-

dert. Eine vollständige Trennung war nach 1-2 Stunden erreicht. Als Marker diente der vorgefärbte SeeBlue™ Standard der Firma NOVEX.

2.4. Western Blot

In einem Elektrophoresegel sind Moleküle frei beweglich und unterliegen ohne Anliegen eines elektrischen Feldes allgemeinen Diffusionsvorgängen. Deshalb müssen elektrophoretisch aufgetrennte Proteine, die man mit Hilfe von Antikörpern detektieren möchte, zuerst auf einer Membran immobilisiert werden. Der Transfer auf eine solche Membran (Western Blot) erfolgt wiederum in einem elektrischen Feld.

Lösungen:

Transfer-Puffer:	Tris/HCl	25 mM; pH 8,3
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %
	Methanol	20 %
Blockierungspuffer:	5 % Magermilchpulver in PBS/Tween	

Antikörperverdünnungen:

Die Antikörper wurden in Blockierungspuffer verdünnt.

Primäre Antikörper:	anti ClC-1	1:1000
	IgY Fraktionen	1:100 – 1:1000
Sekundäre Antikörper:	anti Kaninchen IgG (HRP)	1:40000
	anti Hühner IgG (HRP)	1:20000

- Im Anschluß an eine SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der Transfer bei 111 V dauerte etwa 1,5 Stunden.
- Unbesetzte Bindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden durch 20-minütige Behandlung mit Blockierungspuffer abgesättigt.
- Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Nitrocellulosemembran wurde dazu zusammen mit der Antikörperlösung in eine Folie eingeschweißt und auf einer senkrecht stehenden, langsam rotierenden Scheibe befestigt.
- Anschließend wurde der Blot dreimal 10 Minuten mit PBS/Tween gewaschen und dann zwei Stunden mit dem an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten, sekundären Antikörper inkubiert.

- Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszens.

In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert die Meerrettich-Peroxidase das Substrat Luminol. Das Produkt dieser Reaktion liegt in einem angeregten Zustand vor, der unter Photoemission wieder in den Grundzustand übergeht. Das emittierte Licht kann mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden. Unter Verwendung des SuperSignal®-Kit vom Pierce wurden dazu gleiche Volumina Luminol und Enhancer gemischt und der Blot eine Minute darin inkubiert. Anschließend wurde der Blot in Folie eingepackt und circa eine Minute auf einen Röntgenfilm gelegt.

2.5. Sequenzspezifische Mutagenese

Der Austausch bzw. das Einfügen bestimmter Aminosäuren in das Kanalprotein erfolgte mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Bei dieser Methode wird ein die entsprechende cDNA enthaltender Plasmidvektor während mehrerer Zyklen mit Hilfe des Enzyms Pfu-Polymerase und zweier Primer amplifiziert. Da die Primer die gewünschte Mutation in Form von „mismatch“ Basen tragen und einander komplementär sind, ist das entstehende Produkt ein Plasmid mit zwei versetzten Einzelstrangbrüchen, das die entsprechende Mutation enthält und in Bakterien vermehrt werden kann (Abb.2.1).

2.5.1. Mutageneseprimer

Für die Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Primer benötigt, die beide die gewünschte Mutation in Form von „mismatch“ Basen enthalten. Die 25 bis 45 Basen langen Primer müssen eine Schmelztemperatur größer als 78 °C haben, und die eingefügte Mutation sollte in der Mitte der Primer liegen. Sowohl am 5‘- als auch am 3‘-Ende des Primers müssen mindestens 10 Nukleotide korrekte Basenpaarungen eingehen.

Um das Auffinden positiver Mutanten zu erleichtern, können die Primer die Sequenz einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle enthalten, so daß eine Identifizierung anhand eines Restriktionsverdaus möglich ist. Die Anzahl der dadurch eingefügten „mismatches“ sollte jedoch möglichst klein gehalten werden, außerdem muß das Leseraster erhalten bleiben.

Die Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin) entworfen und in der Sektion Polymere der Universität Ulm hergestellt. Es ist wichtig, daß die Primer HPLC gereinigt werden.

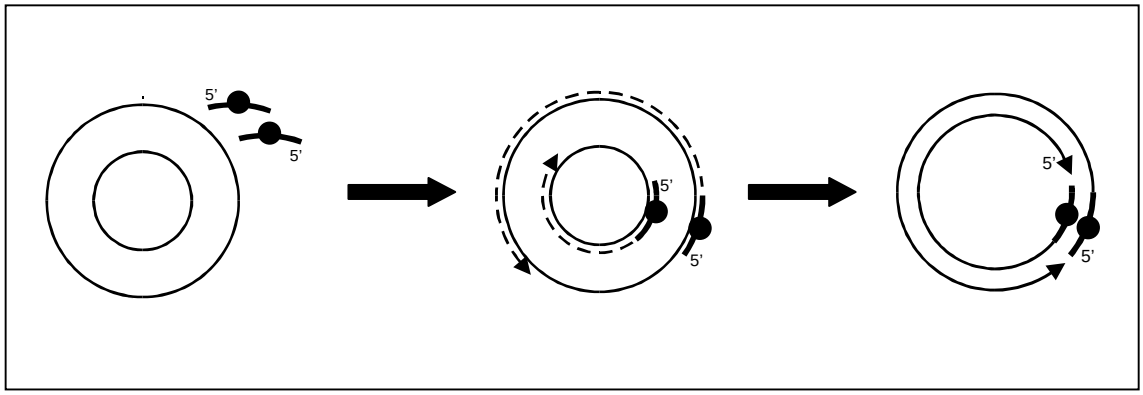


Abb.2.1: Schematische Darstellung der sequenzspezifischen Mutagenese

Bei der QuikChange™-Methode wird das gesamte Plasmid mit Hilfe zweier zueinander komplementärer Primer, die beide die gewünschte Mutation enthalten, amplifiziert. Es entsteht ein Plasmid mit zwei versetzten Einzelstrangbrüchen, das die Mutation trägt und in Bakterien vermehrt werden kann.

2.5.2. Mutagenesereaktion

Lösungen:

Alle benötigten Lösungen sind bereits in gebrauchsfertiger Form im QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit enthalten (Zusammensetzung siehe Angaben des Herstellers).

Reaktionsansatz:		Primer 1	14 pmol	
		Primer 2	14 pmol	
		10x Puffer	5 µl	
		Plasmid	20 ng	
		dNTPs	2,5 mM	(je Nukleotid)
		Pfu-Polymerase	2,5 U	
		ad 50 µl H_2O		
Reaktionsbedingungen:	1x	95 °C	3 min	
	18x	95 °C	1 min	
		55 °C	1 min	
		68 °C	17 min	

2.5.3. Dpn I-Verdau

Nach erfolgreicher Amplifikation wurden 10 U des Restriktionsenzyms Dpn I direkt in den Reaktionsansatz pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Dpn I schneidet innerhalb seiner Erkennungssequenz 5‘-Gm6ATC-3‘ nur, wenn diese methyliert ist. Da die parentale, nicht-mutierte Plasmid-DNA ursprünglich aus E.coli isoliert wurde, trägt sie eine solche dam-Methylierung und kann so mit Hilfe eines Dpn I-Verdaus entfernt werden. Die während der Amplifikation *in vitro* synthetisierten Plasmide besitzen dagegen keine Methylierung und werden von Dpn I nicht verdaut. Bei der anschließenden Bakterientransformation werden folglich nur diese Plasmide vermehrt.

2.5.4. Bakterientransformation durch Hitzeschockbehandlung

Im Anschluß an die Mutagenesereaktion wurden die mutierten Plasmide in Bakterien des Stammes Epicurian Coli® XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) vermehrt. Die Glycerinkulturen dieser Bakterien sind bereits in kompetentem Zustand für eine Transformation durch Hitzeschock.

- Nach dem Auftauen wurden je 50 µl der Bakterien mit 5 µl des Mutageneseansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert.
- Dann erfolgte ein kurzer Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad.
- Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurden 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium dem Ansatz zugegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.
- Abschließend wurden 250 µl des Ansatzes auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.6. Bakterientransformation mittels Elektroporation

Im allgemeinen erfolgte die Bakterientransformation nicht wie bei der Mutagenese durch eine Hitzeschockbehandlung, sondern mittels Elektroporation.

Bei dieser Methode wird die Plasmamembran der Bakterien durch einen elektrischen Puls vorübergehend destabilisiert. Während dieser Phase der reversiblen Porenbildung kann DNA in die Zellen aufgenommen werden. Zwei Parameter, Feldstärke und Pulslänge, sind

für diesen Vorgang von entscheidender Bedeutung. Die Feldstärke bestimmt die Anzahl und Größe der gebildeten Poren, die Pulslänge die Dauer der Porenöffnung (Dower *et al.*, 1988, Kinosita & Tsong, 1977, Saunders *et al.*, 1989).

2.6.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

- Zur Herstellung elektrokompetenter Glycerinkulturen wurden 1000 ml LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert, bis sie die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten (OD_{600} = 0,5 - 0,7).
- Dann wurden die Zellen 15 Minuten mit 3600 g bei 4 °C in einem sterilen Corex-Röhrchen abzentrifugiert.
- Das Bakterienpellet wurde in 1000 ml eiskaltem, sterilem H_2O_{bidest} resuspendiert und erneut mit 3600 g bei 4 °C abzentrifugiert.
- Es folgten drei weitere Resuspendierungsschritte, der erste in 500 ml H_2O, der zweite in 20 ml 10 % Glycerin und der abschließende in 3-4 ml 10 % Glycerin. In dieser Form können die Bakterien in Aliquots bei –70 °C für ca. 6 Monate gelagert werden.

2.6.2. Elektroporation

Für die Transformation wurden 40 µl einer elektrokompetenten Glycerinkultur sofort nach dem Auftauen mit 0,1-1 µg DNA gemischt und in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Dabei ist es wichtig, daß die zu transformierende DNA weitgehendst salzfrei ist, da bei zu hoher Salzkonzentration in der Elektroporationsküvette sehr große Ströme fließen, die zum Zelltod führen.

Pulsprogramm:	Spannung	1800 V
	Kapazität	25 µF
	Widerstand	201 Ω
	Pulslänge	5 ms

Im Anschluß an die Elektroporation wurden die transformierten Zellen zwei Stunden bei 37 °C in 1 ml SOC-Medium inkubiert. 250 µl des Ansatzes wurden dann auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen.

2.7. Herstellung von Glycerinkulturen

500 µl einer Bakterienkultur, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindet (OD_{600} > 0,8) wurden mit demselben Volumen sterilem 50 %-igem Glycerin versetzt und in sterilen Reaktionsgefäßen bei –70 °C eingefroren.

2.8. Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Minipräparationen aus einem kleinen Volumen Bakterienkultur wurden mit selbst hergestellten Lösungen durchgeführt, während für Midipräparationen aus größeren Kulturen das QIAfilter Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet wurde.

2.8.1. Minipräparation

Lösungen:

Resuspendierungspuffer:	Glucose	50 mM
	EDTA	10 mM
	Tris/HCl	25 mM, pH 8,0
Lysepuffer:	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Neutralisierungspuffer:	KAc	3 M, pH 4,8

- 1,5 ml einer Übernachtkultur in LB-Medium (mit Antibiotikum) wurden bei 4 °C mit 12000 g 15 Minuten abzentrifugiert.
- Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.
- Der anschließende Zellaufschluß durch 5-minütige Inkubation der Bakteriensuspension in 200 µl Lysepuffer erfolgte ebenfalls auf Eis.
- Die sehr alkalische Lösung wurde dann durch Zugabe von KAc neutralisiert. Dadurch fallen genomische DNA, denaturierte Proteine und K^+-Dodecylsulfat während der folgenden 5-minütigen Inkubation auf Eis als weißer Niederschlag aus der Lösung aus.
- Durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g wurde dieser Niederschlag entfernt und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA anschließend durch Isopropanol gefällt.

2.8.2. Midipräparation

Lösungen:

Alle benötigten Lösungen sind bereits in gebrauchsfertiger Form im QIAfilter Midi Kit enthalten (Zusammensetzung siehe Angaben des Herstellers).

- 25 ml einer Übernachtkultur in LB-Medium (mit Antibiotikum) wurden bei 4 °C mit 6000 g 15 Minuten abzentrifugiert.
- Das Bakterienpellet wurde dann in 4 ml RNase (100 µg/ml) enthaltendem Resuspendierungspuffer P1 aufgenommen und fünf Minuten bei RT inkubiert.
- Der anschließende Zellaufschluß erfolgte durch 5-minütige Inkubation der Bakteriensuspension in 4 ml Lysepuffer P2 (RT).
- Nach Zugabe von 4 ml des Puffers P3 wurde das Lysat dann sofort in die bereitgestellten Filterspritzen überführt.
- Das während der 10-minütigen Inkubationsdauer ausfallende Präzipitat wurde anschließend mit Hilfe des Filters entfernt. Das Filtrat wurde dabei direkt auf eine zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Ionenaustausch-Säule aufgetragen.
- Nachdem das Filtrat aufgrund seiner Schwerkraft in das Säulenmaterial eingedrungen war, wurde die Säule zweimal mit 10 ml Waschpuffer QC gewaschen.
- Die Elution der gereinigten DNA, an die sich eine Isopropanolfällung anschloß, erfolgte mit 5 ml Puffer QF.

2.9. DNA-Fällung

Zur Fällung wurde die DNA-Lösung mit Hilfe von 3 M NaAcetat (pH 5,2) auf eine Salzkonzentration von 300 mM gebracht und mit 0,7 Volumen 100 %-igem Isopropanol versetzt. Die ausfallende DNA wurde dann bei 4 °C mit 12000 g 30 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet. Anschließend wurde die DNA in einem geeigneten Volumen H_2O oder TE-Puffer aufgenommen (Minipräp. 50 µl; Midipräp. 100 µl). Gegebenenfalls kann dem H_2O zur Entfernung der RNA 20 µg/ml RNase zugefügt werden.

2.10. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sowie die entsprechenden Puffer wurden von der Firma AGS (Heidelberg) bezogen.

Standardansatz:	DNA	1 µg
	10x Puffer	2 µl
	Enzym	8-12 U
	ad 20 µl H_2O	

Sollten die DNA-Fragmente für eine anschließende Ligation isoliert werden, wurde die eingesetzte DNA-Menge auf 5-10 µg erhöht. Entsprechend muß in diesem Fall auch die Enzymmenge angepaßt werden.

2.11. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten bedient man sich der Agarosegelelektrophorese. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zuckerphosphat-Rückgrats, unter den bei dieser Elektrophorese vorherrschenden Bedingungen, negativ geladen und wandern deshalb zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA-Moleküle verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Das Verfahren kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden.

Lösungen:

TBE-Puffer:	Tris-Borat	45 mM
	EDTA	1 mM
TAE-Puffer:	Tris-Acetat	40 mM, pH 8,0
	EDTA	1 mM
Probenpuffer:	Saccharose	10 %
	Bromphenolblau	0,025 %

Zur Analyse von DNA-Fragmenten einer Länge von 0,3-10 Kilobasen wurden 0,8 % (w/v) Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Kleinere Fragmente wurden durch 3 %-ige FMC NuSieve® 3:1 Agarose aufgetrennt. Die Herstellung präparativer Gele erfolgte mit FMC SeaPlaque® GTG® low-melting Agarose in TAE-Puffer.

Die DNA-Proben wurden in 0,1-0,3 Volumen Probenpuffer aufgenommen und bei 80-120 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele 10-20 Minuten in 0,0001 % Ethidiumbromid inkubiert und das Ergebnis auf einem UV-Leuchttisch mit einem Videosystem dokumentiert. Bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 302 nm fluoresziert das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid im sichtbaren Bereich.

2.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) aus Agarosegelen isoliert. Hierzu wurden die DNA-Fragmente auf einem speziellen, „low-melting“ Agarosegel (siehe S. 33) aufgetrennt. „Low-melting“ Agarose besitzt einen niedrigeren Schmelzpunkt als herkömmliche Agarose und ist deshalb für die Isolierung von DNA-Fragmenten besser geeignet.

Lösungen:

Alle benötigten Lösungen sind bereits in gebrauchsfertiger Form im QIAquick Gel Extraction Kit enthalten (Zusammensetzung siehe Angaben des Herstellers).

- Unter UV-Licht wurden die entsprechenden Banden, mit Hilfe eines Skalpells, aus dem zuvor Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten.
- Die Agarosestücke wurden zur Volumenbestimmung in einem Eppendorfgefäß gewogen (100 mg Agarose ~ 100 µl) und mit 3 Volumen Puffer QG versetzt.
- Anschließend wurde die Agarose durch 10-minütige Inkubation bei 50 °C im Heizblock aufgelöst.
- Nach der Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde die Lösung dann in eine QIAquick spin Säule pipettiert und 1 Minute mit 12000 g zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an das Säulenmaterial, während die Agarose abzentrifugiert wird.
- Im Anschluß an einen Waschschritt mit 750 µl Puffer PE wurde die DNA mit 30-50 µl H_2O von der Säule eluiert.

2.13. Ligation mit T4-Ligase

DNA-Fragmente können *in vitro* durch die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (AGS, Heidelberg) miteinander verknüpft werden. Mit Hilfe von ATP stellt dieses Enzym eine

kovalente Phosphodiesterbindung zwischen dem 3‘OH-Ende und der 5‘Phosphat-Gruppe zweier DNA-Fragmente her.

Von der Firma AGS werden für die Ligation unterschiedlicher DNA-Enden zwei verschiedene Puffer zur Verfügung gestellt, die wie folgt eingesetzt wurden:

- „sticky ends“: 66 mM Tris/HCl (pH 7,9); 5 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 1 mM ATP
- „blunt ends“: 66 mM Tris/HCl (pH 7,9); 5 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 0,05 mM ATP; 5 % PEG 6000

In einem 50 µl Ansatz wurden 50-150 ng eines linearisierten Vektors und ein 10-fach molarer Überschuß an Insert sowie 2 U Ligase eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 16 °C über Nacht, anschließend wurde die Ligase für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

In eine Ligation können als Insert neben Restriktionsfragmenten auch kurze DNA-Doppelstränge eingesetzt werden, die durch Dimerisierung zweier komplementärer Oligonukleotide entstanden sind.

Zur Dimerbildung werden die synthetischen Oligonukleotide in gleichen molaren Verhältnissen vereinigt und für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend werden sie über Nacht im Heizblock langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Werden die 5‘-Enden der Oligonukleotide bei ihrer Synthese mit einer Phosphatgruppe versehen, können die Dimere direkt in die Ligation eingesetzt werden. Bei entsprechendem Oligonukleotiddesign kann man die Enden des Dimers auch mit „sticky ends“ versehen, die mit bestimmten Restriktionsschnittstellen kompatibel sind.

2.14. Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten über den Sequence-Yourself™-Service der Firma GATC (Konstanz), d.h. die im Labor mit Hilfe des Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführte Sequenzierreaktion wurde von der Firma GATC auf einer ABI 377 HT Sequenziermaschine (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert.

Bei dem verwendeten Sequenzierungsverfahren nach der Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide werden von einer thermostabilen DNA-Polymerase unterschiedlich

Fluoreszenz-markierte ddNTP in den von ihr synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Dies führt zum einen zum Abbruch der Polymerasereaktion, da die ddNTPs kein freies 3‘-OH Ende besitzen (Sanger *et al.*, 1977), und zum anderen dient die Markierung der vier verschiedenen ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen der späteren Laserdetektion.

Lösungen:

Alle benötigten Lösungen sind bereits in gebrauchsfertiger Form im Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit enthalten (Zusammensetzung siehe Angaben des Herstellers).

Reaktionsansatz:	Premix	8 µl
	dsDNA	500 ng
	Primer	3,2 pmol
	ad 20 µl H_2O	
Reaktionsbedingungen:	30 Zyklen	
	96 °C	30 sec
	50 °C	30 sec
	60 °C	4 min

Im Anschluß an die Polymerasereaktion wurde die DNA gefällt und das getrocknete Pellet zur weiteren gelelektrophoretischen Analyse an die Firma GATC geschickt.

2.15. Transiente Transfektion von tsA201 Zellen

Die transiente Transfektion von tsA201 Zellen erfolgte mit Hilfe des Effectene™ Transfection Kit der Firma Qiagen (Hilden).

Lösungen:

Alle benötigten Lösungen sind bereits in gebrauchsfertiger Form im Effectene™ Transfection Kit enthalten (Zusammensetzung siehe Angaben des Herstellers).

- 24 Stunden vor der Transfektion wurden in einer 60 mm Schale 3 x 10^5 tsA201 Zellen in MEM 10 % ausgesät.
- Für die Transfektion wurden in einem Eppendorfgefäß 1-3 µg DNA mit Puffer EC in einem Endvolumen von 150 µl verdünnt und 8 µl Enhancer pro µg DNA zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend kräftig gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert.

- Danach wurden 10-30 µl Effectene Reagenz, in einem Verhältnis von 1:10 zur DNA, zugegeben und der Ansatz erneut kräftig gemischt. Wiederum folgte eine 5-minütige Inkubation bei RT.
- Während der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und anschließend mit 4 ml frischem MEM 10 % versehen.
- Der Reaktionsansatz wurde anschließend in 1 ml MEM 10 % aufgenommen und auf die Zellen getropft.
- Nach 7-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen erneut mit PBS gespült und gegebenenfalls in MEM 10 % auf neue Schalen verteilt.

Für elektrophysiologische Studien erfolgte eine Cotransfektion von 0,6 µg pRc/CMV-hClC-1 und 0,3 µg pEGFP, einem Vektor für die Expression des „ enhanced green fluorescent protein“, mit dessen Hilfe transfizierte Zellen identifiziert werden konnten. Für alle anderen Untersuchungen wurden die Zellen mit 3 µg des gegebenenfalls modifizierten Expressionsvektors pRc/CMV-hClC-1 transfiziert. Zu den verwendeten Vektoren siehe S 21. Abschnitt 2.1.9.

2.16. Herstellung von Zell-Lysaten

Die Expressionsstärke des Chloridkanals in transfizierten Zellen wurde im Western Blot untersucht. Voraussetzung dafür ist eine Solubilisierung der in die Cytoplasmamembran integrierten Kanäle. Deshalb wurden mit Hilfe des Detergenz Triton® X100 Zell-Lysate hergestellt, in denen die Kanäle in solubilisierter Form vorlagen.

Lösungen:

Lysepuffer:	Tris/HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Triton® X100	1 %

Proteaseinhibitoren: 5 µl/ml folgender Stammlösungen wurden dem Lysepuffer direkt vor Gebrauch zugegeben:

PMSF	1 M	(in Isopropanol)
Aprotinin	0,5 mg/ml	(in 0,01 M HEPES)
Leupeptin	0,1 mg/ml	(in H_2O)
Pepstatin A	0,2 mg/ml	(in Ethanol)

- 48-72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen einer dicht bewachsenen 60 mm Schale zweimal mit PBS gespült und nach dem letzten Waschschritt in Zentrifugenröhrchen überführt.
- Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 g wurde das Zellpellet in 100-250 µl Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen und 30 Minuten auf Eis inkubiert.
- Zellreste und unlösliche Bestandteile wurden anschließend bei 4 °C mit 14000 g 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand kann mit Probenpuffer versetzt direkt auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen werden.

2.17. Bestimmung des Proteingehalts von Zell-Lysaten

Die in den Zell-Lysaten enthaltene Menge an löslichen Proteinen wurde mit Hilfe eines modifizierten Proteintests nach Lowry bestimmt. Dieser Proteintest (DC Protein Assay) von Bio-Rad ist im Gegensatz zur Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) mit den meisten Detergenzien, insbesondere mit Triton® X100 bis zu einer Konzentration von 1 %, kompatibel. Der Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt, so daß das Probenvolumen auf 5 µl reduziert werden konnte.

Lösungen:
Alle benötigten Lösungen sind mit dem DC Protein Assay erhältlich (Zusammensetzung siehe Angaben des Herstellers).

Da die Proben 1 % Triton® X100 enthielten, mußte Lösung A mit 20 µl/ml Lösung S versetzt werden. Man erhält so Lösung A‘.

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Protein-Lösung der Konzentration 1,56 mg/ml als Stammlösung angesetzt. Wahlweise kann man eine solche Stammlösung aus IgG oder BSA herstellen. In drei Schritten wurde die Stammlösung anschließend jeweils 1:2 mit Lysepuffer verdünnt, so daß folgende Verdünnungsreihe entstand:

$$1{,}56\ \text{mg/ml} \rightarrow 0{,}78\ \text{mg/ml} \rightarrow 0{,}39\ \text{mg/ml} \rightarrow 0{,}195\ \text{mg/ml}$$

Reaktionsansatz:	Proteinprobe	5 µl
	Lösung A‘	25 µl
	Lösung B	200 µl

(es ist wichtig, die Reihenfolge der Lösungen beim Pipettieren einzuhalten)

Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Absorption bei 650 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Eichgeraden ermittelt.

2.18. Immunofluoreszenzfärbung

Die extra- bzw. intrazelluläre Lokalisation bestimmter Proteinabschnitte des ClC-1 wurde anhand von Immunofluoreszenzfärbungen bestimmt. Dazu wurden ClC-1 Kanäle, denen an einer bestimmten Stelle ein sogenanntes antigenes Epitop inseriert wurde, in tsA201 Zellen exprimiert. Unter antigenem Epitop versteht man kurze Aminosäuresequenzen, die von spezifischen Antikörpern erkannt werden.

Kommt ein solches Epitop aufgrund der Topologie des Kanals auf der extrazellulären Seite der Zellmembran zu liegen, können Antikörper auch bei nicht-permeabilisierter Zellmembran daran binden. Intrazellulär lokalisierte Epitope werden dagegen in diesem Fall von ihren Antikörpern nicht erkannt, da diese bei intakter Zellmembran nicht ins Zellinnere gelangen können. Intrazellulär lokalisierte Epitope sind für ihre Antikörper nur zugänglich, wenn die Zellmembran permeabilisiert ist.

Zur Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulärer Lokalisation wurden deshalb transfizierte Zellen zum einen vor, zum andern nach Permeabilisierung der Zellmembran mit dem entsprechenden Antikörper behandelt. Im ersten Fall erkennen die Antikörper nur Epitope auf der extrazellulären Seite der Membran, im zweiten binden sie sowohl extra- als auch intrazellulär lokalisierte.

Gebundene Antikörper wurden anschließend unter Verwendung des TSA™-Direct green Kit (NEN Lile Science Products, Boston) nachgewiesen. Bei dieser Methode katalysiert die Meerrettichperoxidase eines sekundären Antikörpers in Anwesenheit von H_2O_2 die kovalente Bindung eines Fluoreszenz-markierten Tyramidsubstrats an Proteinen (Tyrosinreste). Die an dieser relativ unspezifischen Bindung beteiligten Proteine stammen aus dem vorangegangenen Blockierungsschritt, wo sie zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Oberfläche der Zellpräparation dienen. Da die Bindung nur in unmittelbarer Nähe der Peroxidase erfolgt, bleibt die damit verbundene Fluoreszenzmarkierung auf den Bindungsort des sekundären Antikörpers beschränkt und kann so der Detektion epitopspezifischer Antikörper dienen.

Lösungen:

Paraformaldehydlösung:	4 % Paraformaldehyd in PBS; pH 7,2	
Waschpuffer TNT:	Tris/HCl	0,1 M, pH 7,5
	NaCl	0,15 M
	Tween® 20	0,05 %
Blockierungspuffer TNB:	Tris/HCl	0,1 M, pH 7,5
	NaCl	0,15 M
	Blocking Reagent	0,5 % (im Kit enthalten)
Quenching-Puffer:	H_2O_2	0,1 %
	Methanol	10 %

Alle anderen Lösungen waren im TSA™-Direct green Kit enthalten (Zusammensetzung siehe Angaben des Herstellers).

Antikörperverdünnungen:

Die Antikörper wurden in Blockierungspuffer TNB verdünnt. Je nachdem, ob die Detektion vor oder nach Permeabilisierung der Zellmembran stattfand, wurden unterschiedliche Verdünnungen der primären Antikörper eingesetzt.

Primäre Antikörper:	anti FLAG® M2	1:500	(vor Permeabilisierung)
		1:2000	(nach Permeabilisierung)
	anti HSV®	1:5000	(vor Permeabilisierung)
		1:10000	(nach Permeabilisierung)
	anti ClC-1	1:500	(vor Permeabilisierung)
		1:2000	(nach Permeabilisierung)
	IgY Fraktionen	1:100 – 1:1000	(vor Permeabilisierung)
		1:1000 – 1:10000	(nach Permeabilisierung)
Sekundäre Antikörper:	anti Kaninchen IgG (HRP)	1:500	
	anti Maus IgG (HRP)	1:500	
	anti Hühner IgG (HRP)	1:500	

Die Immunofluoreszenzfärbung wurde in Multititerplatten (24-well) durchgeführt, in denen die Zellen nach ihrer Transfektion zwei Tage kultiviert wurden. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Zellen mit je 1 ml TNT-Puffer viermal gewaschen.

- Zur Detektion der Epitope nach Permeabilisierung der Cytoplasmamembran wurden die Zellen 20 Minuten mit 200 µl Paraformaldehydlösung fixiert und im Anschluß durch 10-minütige Behandlung mit 200 µl 0,1 % Triton® X100 in PBS permeabilisiert.
- Nach 1-stündiger Sättigung der freien Bindungsstellen durch 200 µl TNB-Puffer wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert.
- Anschließend wurden endogene Peroxidasen durch eine 5-minütige Behandlung mit Quenching-Puffer inaktiviert.
- Die Bindung des HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers erfolgte während einer 2-stündigen Inkubation bei RT.
- Gebundene Antikörper wurden anschließend durch eine 10-minütige Inkubation mit einer 1:50 Verdünnung der Fluoreszenz-markierten Tyramide in Amplifikationslösung sichtbar gemacht.

Erfolgte die Inkubation mit den epitopspezifischen Antikörpern vor Permeabilisierung der Cytoplasmamembran, wurden diese direkt in das Kulturmedium der Zellen gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die folgenden Schritte von der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen bis zur Detektion der sekundären Antikörper wurden wie beschrieben durchgeführt.

Die gefärbten Zellen wurden bei 200-facher Vergrößerung mit einer Spiegelreflexkamera an einem mit Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung ausgestatteten Axiovert 135 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) fotografiert. Die Belichtungszeiten für einen Farbdiafilm lagen zwischen 5 und 10 Sekunden.

2.19. Elektrophysiologie

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurden Ganzzellableitungen (Hamill *et al.*, 1981) an transfizierten tsA201 und HEK293 Zellen durchgeführt.

2.19.1. Ganzzellmessungen

In der „whole-cell“ Konfiguration (Marty & Neher 1995) werden Ströme über die gesamten Zellmembran einer Zelle gemessen. Hierbei wird das makroskopische Strommuster

einer Zelle wiedergegeben, ohne daß man unmittelbar den Beitrag einzelner Kanäle sehen kann. Wie bei jeder Voltage-Clamp-Technik wird auch bei dieser Methode ein vorgegebenes Membranpotential konstant gehalten und der dazu notwendige Kompensationsstrom gemessen. Es wird jedoch nur eine Elektrode verwendet, die sowohl der Spannungsmessung als auch der „Strominjektion“ dient.

Durch Annähern der Meßpipette an die Zellmembran wird zunächst ein sogenannter „Gigaseal“ ausgebildet. Dabei entsteht zwischen der Zellmembran und dem Glas der Pipette ein sehr großer elektrischer Abdichtwiderstand von mehreren Gigaohm. Diese Verbindung zwischen Membran und Pipette ist sowohl elektrisch als auch mechanisch sehr stabil („Cell-attached“ Konfiguration). Eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung eines solch hohen Abdichtwiderstandes ist eine saubere Pipettenspitze, weshalb beim Eintauchen in die Badlösung ein leichter Überdruck an die Pipette angelegt werden muß. Um von der „Cell-attached“ Konfiguration einen Zugang zum Zellinneren zu erhalten, wird das Membranstück unter der Pipettenöffnung durch Anlegen eines Unterdrucks zerstört, und man gelangt so in die „whole-cell“ Konfiguration.

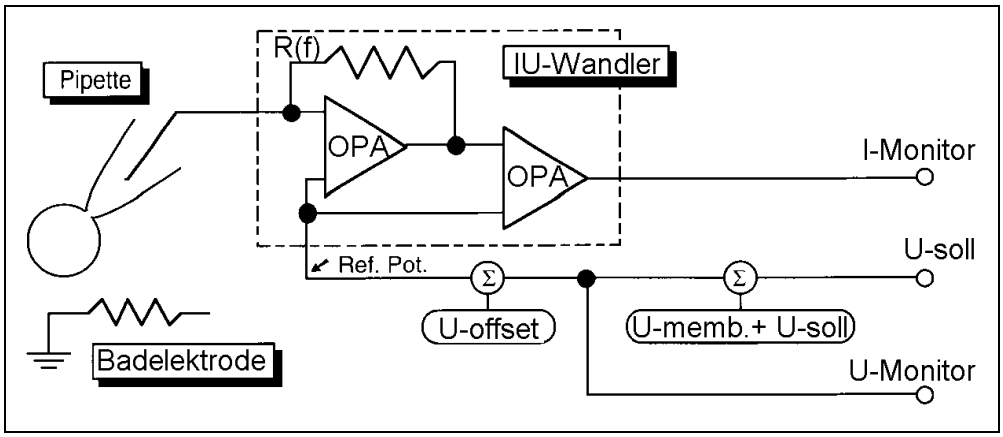


Abb.2.2: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers

Durch den Operationsverstärker (OPA) des Strom-Spannungs-Wandlers wird die Pipettenspannung der Sollspannung (U-soll) angeglichen, der hierzu notwendige Kompensationsstrom wird auf dem I-Monitor registriert. R(f): Rückkopplungswiderstand.

In Abb.2.2 ist das vereinfachte Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers dargestellt. Ein Strom-Spannungs-Wandler am Meßkopf des Patch-Clamp-Verstärkers stellt das Kernstück der Meßelektronik dar. An den Eingängen eines Operationsverstärkers (OPA) liegt die

Spannung der Pipette sowie die vorgegebene Sollspannung (U-soll) an. Kommt es zu einer Abweichung zwischen diesen beiden Spannungen, entsteht am Ausgang des OPA eine Spannung, die proportional zu dieser Differenz, aber sehr viel größer ist. Durch den Spannungsunterschied zwischen dem Ausgang des OPA und der Pipette fließt ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand R_f. Dieser Strom fließt solange, bis keine Differenz mehr zwischen den beiden Eingängen des OPA besteht, bis also das Potential der Pipette gleich der Sollspannung ist. Auf diese Weise wird also das Pipettenpotential jederzeit der Sollspannung angeglichen. Gleichzeitig wird die Ausgangsspannung des OPA registriert und in Abhängigkeit von der Größe des Rückkopplungswiderstand R_f in den entsprechenden Strom umgerechnet.

2.19.2. Meßlösungen

Interne Lösung:	CsCl	130 mM		Externe Lösung:	NaCl	140 mM	
	$MgCl_2$	2 mM			KCl	4 mM	
	EGTA	5 mM			$CaCl_2$	2 mM	
	HEPES	10 mM	pH 7,4		$MgCl_2$	1 mM	
					HEPES	5 mM	pH 7,4

Zur Bestimmung der Ionenselektivität wurde das NaCl in der externen Lösung durch entsprechende Mengen NaBr, $NaNO_3^-$ oder NaI ersetzt.

2.19.3. Meßpipetten

Die Meßpipetten wurden mit einem DMZ Universal Puller (Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, Augsburg) aus Borsilikatglaskapillaren (Patch, Clark GC 150 TF thinwall; Harvard Apparatus Ltd., Kent) gezogen und besaßen, mit interner Standardlösung gefüllt, einen Widerstand von 1,2 – 2,0 MΩ.

Puller-Programm:	P (A):	HA	400	P (B):	HA	430
		F (TH)	20		F (TH)	25
		s (TH)	17		s (TH)	10
		AD	121		t (H)	30
		tH	50		t (F1)	80
		sH	50		F1	170
					s (F2)	185
					AD	350

Die Elektroden (Silber/Silberchlorid-Elektroden) bestanden aus Silberdrähten, die mit Chlorierbeize (1 g $FeCl_3$, 1 ml 32 % HCl, 1 ml H_2O) behandelt wurden, um Offsetpotentiale möglichst konstant zu halten. Die Badelektrode wurde über eine Agarbrücke (3 % Agar in Badlösung) mit der Badlösung verbunden.

2.19.4. Datenerfassung

Die zu untersuchenden Zellen wurden für die Patch-Clamp-Experimente mindestens einen Tag in 30 mm Schälchen kultiviert, um eine gute Anheftung am Schalenboden zu gewährleisten. Nach dem Austausch des Mediums durch externe Lösung erfolgten die Messungen direkt in den Kulturschälchen unter einem inversen Axiovert 135 Mikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung (Zeiss, Oberkochen). Das Mikroskop war mit einem Mikromanipulator von Märzhäuser (Wetzlar) ausgestattet und befand sich zusammen mit der gesamten Meßeinrichtung auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Zur Stromregistrierung wurde ein digital gesteuerter EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker der Firma HEKA Elektronik (Lambrecht) mit dem dazugehörenden Softwareprogramm Pulse verwendet.

Bei jeder Messung wurde kurz vor Ausbildung des „Gigaseals“ das Offsetpotential zwischen Pipetten- und Badlösung mit Hilfe des Verstärkers auf Null korrigiert. Außerdem ermöglichte der Verstärker eine Kapazitätskompensation zur Subtraktion von Stromtransienten, die durch Umladungprozeße an der Pipette (C_{pip}), der Zellmembran (C_m) und im elektronischen Schaltkreis (C_f) entstehen. Mindestens 60 % des Serienwiderstandes wurden kompensiert.

2.19.5. Spannungsprogramme

Zur allgemeinen Charakterisierung der Chloridströme wurde das in Abb.2.3 A dargestellte Standard-Pulsprogramm verwendet. Ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV erfolgten Spannungsprünge auf Werte im Abstand von 20 mV in einem Bereich von -145 mV bis +95 mV. Den 400 ms andauernden variablen Spannungswerten folgte stets ein konstanter Spannungssprung auf -105 mV. Dieser induziert die sogenannten „tail currents“, aus denen die relative Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle berechnet werden kann. Außerdem kann anhand dieses Pulsprotokolls auch eine sogenannte Stromspannungskurve erstellt und die Deaktivierungskinetik der Kanäle bestimmt werden (Abschnitt 2.19.6). Zur

besseren Übersichtlichkeit wird in den Abbildungen der Stromkurven meist nur jeder zweite Spannungssprung dargestellt.

Zur Untersuchung des Umkehrpotentials wurde ein zusätzliches Pulsprotokoll angewendet. Ausgehend von einem 150 ms Präpuls auf +50 mV erfolgten im Bereich von –30 mV bis +70 mV Spannungssprünge in 10 mV Schritten. Der Präpuls dient dabei der vollständigen Öffnung der Kanäle. Trägt man anschließend die gemessenen Ströme gegen die Spannung auf, kann der Spannungswert ermittelt werden, bei dem keine Nettoladung fließt.

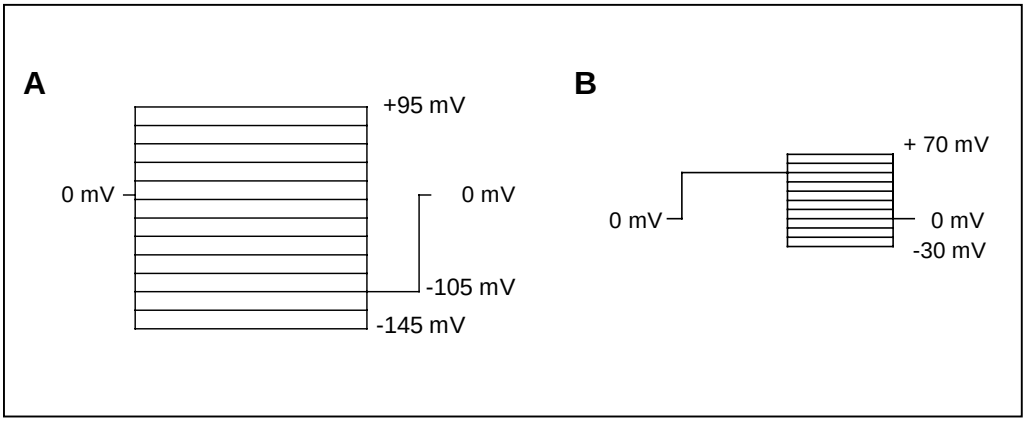


Abb.2.3: Pulsprogramme

A, Standardpulsprotokoll zur allgemeinen Charakterisierung der Chloridströme; B, Pulsprotokoll zur Untersuchung des Umkehrpotentials.

2.19.6. Datenanalyse

Die Daten wurden mit den Programmen Clampfit (Axon Instruments, Forster City, CA), Excel (Microsoft, Redmond, WA) und Sigma Plot (Jandel Scientific, San Rafael, CA) ausgewertet.

Die im negativen Spannungsbereich auftretende Deaktivierung der Chloridkanäle wurde durch folgende Summe aus zwei Exponentialfunktionen und einem konstanten Wert beschrieben (vergleiche Abschnitt 1.4.2):

$$I(t) = a_1\exp(-t/\tau_1) + a_2\exp(-t/\tau_2) + c$$

Zur Beschreibung der Kinetik dieser Deaktivierung wurden die Amplituden a_1, a_2, und c für jede Spannung durch die jeweilige instantane Stromamplitude (I_{inst}) geteilt, so daß man

die relativen Stromamplituden A_1, A_2 und C erhält. Diese wurden dann gegen die Spannung aufgetragen (Fahlke *et al.*, 1995, 1996, Rychkov *et al.*, 1996).

Zur Bestimmung der instantanen bzw. „steady-state" Ströme wurden die aufgezeichneten Stromkurven mit obengenannter Gleichung angenähert und die errechneten Stromwerte am Anfang und am Ende des Testpulses auf die maximale Stromamplitude normalisiert. Trägt man diese normalisierten Werte gegen die Spannung auf, erhält man die sogenannte Stromspannungskurve.

Die relative Offenwahrscheinlichkeit wurde mit Hilfe der „tail currents" bestimmt (siehe Abschnitt 2.19.5). Dabei geht man davon aus, daß sich die Anzahl offener Kanäle im Moment eines Spannungssprungs nicht ändert und daß die Einzelkanalamplitude bei einem konstanten Testpuls immer gleich ist. Unter diesen Annahmen ist der instantane Strom beim Einsetzen des konstanten Testpulses bei -105 mV ein Maß für die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle während der vorausgegangenen Präpulse.

Zur Erstellung der sogenannten Aktivierungskurve wurden die „tail currents" ebenfalls mit obengenannter Gleichung angenähert und die instantanen Ströme auf die maximale Stromamplitude normalisiert. Die relative Offenwahrscheinlichkeit wurde dann gegen die Spannung der Testpulse aufgetragen und durch folgende Boltzmann-Funktion angenähert:

$$I(V) = Amp\{1 + \exp[(V - V_{0.5})/k_v]\}^{-1} + \text{constant.}$$

Die Ionenselektivität der Kanäle wurde durch Messungen des Umkehrpotentials (E_{rev}) unter Verwendung unterschiedlicher externer Lösungen und folgender Anwendung der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung (Hille, 1992) bestimmt:

$$E_{rev,\,X} - E_{rev,\,Cl} = (RT/F)\ln\{P_{Cl}[Cl^-]_i/(P_{Cl}[Cl^-]_o + P_X[X^-]_o)\} - (RT/F)\ln\{P_{Cl}[Cl^-]_{i*}/P_{Cl}[Cl^-]_{o*}\}$$

[X] steht hierbei für die Konzentration der getesteten Anionen, $[Cl^-]_{o*}$ und $[Cl^-]_{i*}$ für die Cl^- Konzentration in externer und interner Standard-Lösung. Da die interne Konzentration der verschiedenen Anionen nicht verändert wurde, konnte die relative Permeabilität mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$P_x/P_{Cl} = ([Cl^-]_{o*}/[X^-]_o)\exp\{(E_{rev,\,Cl} - E_{rev,\,X})/(RT/F)\} - ([Cl^-]_o/[X^-]_o).$$

Bei Raumtemperatur (20 °C) ist RT/F = 25.26 mV, wobei R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur und F die Faradaykonstante ist.

Statistische Signifikanz wurde mit dem Student t-Test berechnet. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 gewählt. Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der in eine Berechnung eingegangenen Messungen war in der Regel ≥ 4 und wird mit n angegeben.

2.19.7. Applikation von $ZnCl_2$

$ZnCl_2$ wurde als 100 mM Stammlösung in externer Lösung angesetzt und in entsprechenden Verdünnungen vorsichtig in die Badlösung eingetropft. Um die dadurch hervorgerufene Stromreduktion zu quantifizieren, wurde das in Abb.2.4 dargestellte Pulsprotokoll in 15 Sekunden Abständen wiederholt. Ausgehend von einem Ruhepotential von 0 mV erfolgte ein Spannungssprung auf +50 mV (100 ms), um die Kanäle maximal zu aktivieren. Dieser Aktivierung folgte ein hyperpolarisierender Puls auf -125 mV, der zur Überwachung des Deaktivierungsverhaltens diente.

Die Ströme wurden solange aufgezeichnet, bis sich nach der Zn^{2+}-Applikation konstante Werte eingestellt hatten. Dann wurde die Stromamplitude bei +50 mV in Relation zum Ausgangswert vor der Applikation gesetzt.

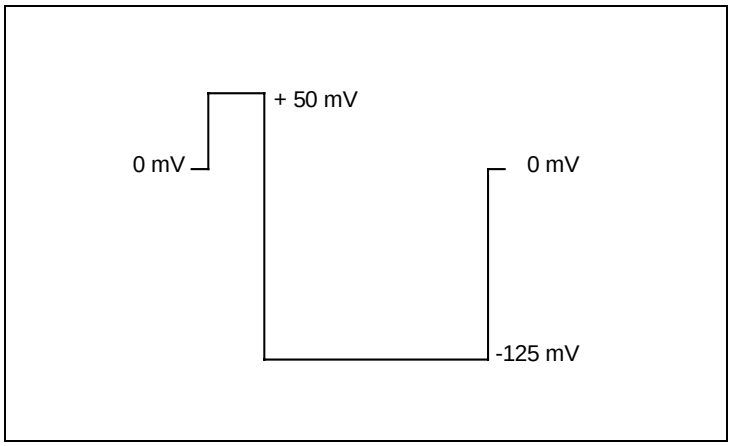


Abb.2.4: Pulsprotokoll zur Bestimmung der Stromreduktion durch externe Applikation von Zn^{2+}-Ionen

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung polyklonaler Antikörper

Ein erster Ansatz, die Transmembrantopologie des Chloridkanals ClC-1 zu untersuchen, war die Herstellung polyklonaler Antikörper, die spezifische Sequenzabschnitte des Kanalproteins erkennen sollten. Mit Hilfe der Antikörper sollte dann die Lokalisation dieser Kanalabschnitte untersucht werden.

3.1.1. Peptiddesign

Zur Herstellung der Antikörper wurde eine Immunisierung mit synthetischen Peptiden durchgeführt, deren Aminosäuresequenz ausgewählten Abschnitten des Kanalproteins entspricht. Geeignete Sequenzen wurden mit Hilfe eines Hydrophobizitätsplot nach Kyte und Doolittle bestimmt (Abb.3.1).

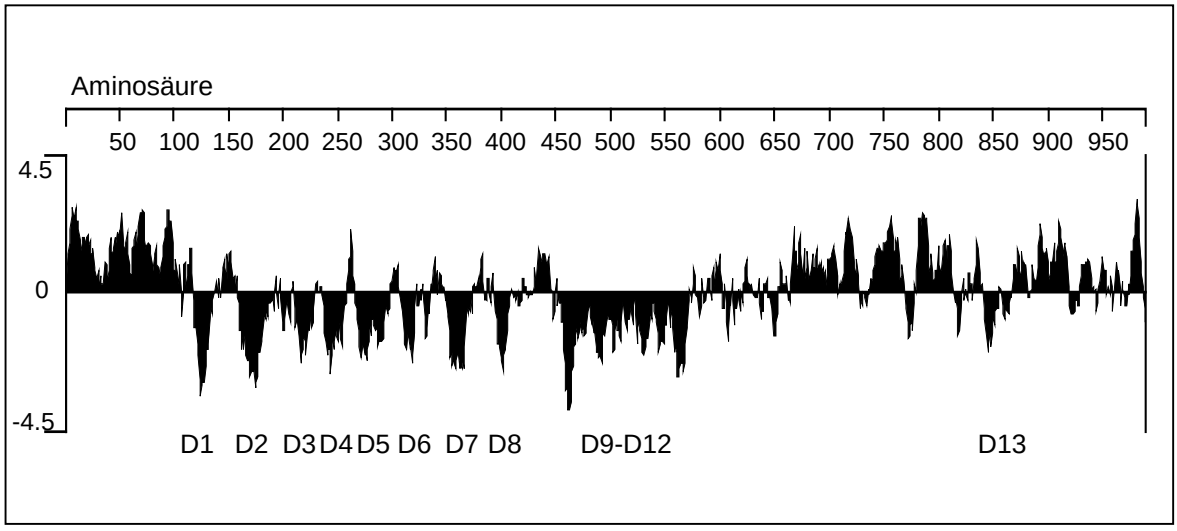


Abb.3.1: Hydrophobizitätsplot nach Kyte & Doolittle

Bei diesem Verfahren wird einzelnen Proteinabschnitten aufgrund ihrer Aminosäuresequenz ein bestimmter Hydrophobizitätswert zugewiesen. Negative Werte stehen dabei für hydrophobe Eigenschaften und positive Werte für hydrophile Eigenschaften. Mit D1 bis D13 sind die hydrophoben Regionen gekennzeichnet, die ursprünglich als Transmembrandomänen beschrieben wurden.

Kanalabschnitte, die sich für eine Immunisierung eignen, dürfen keinesfalls innerhalb eines Transmembransegments liegen und sollten exponiert an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sein. Mit Ausnahme des Peptids P566 wurden deshalb Sequenzen gewählt, die in der Mitte hydrophiler Bereiche (Hydrophobizitätswerte > 0) liegen und, wenn möglich, mehrere gleichartig geladene Aminosäuren enthalten. P566 entspricht mit Hydrophobizitätswerten zwischen –1,27 und –0,13 der am wenigsten hydrophoben Region des sehr großen hydrophoben Bereichs D9-D12 zwischen den Aminosäuren V457 und M568.

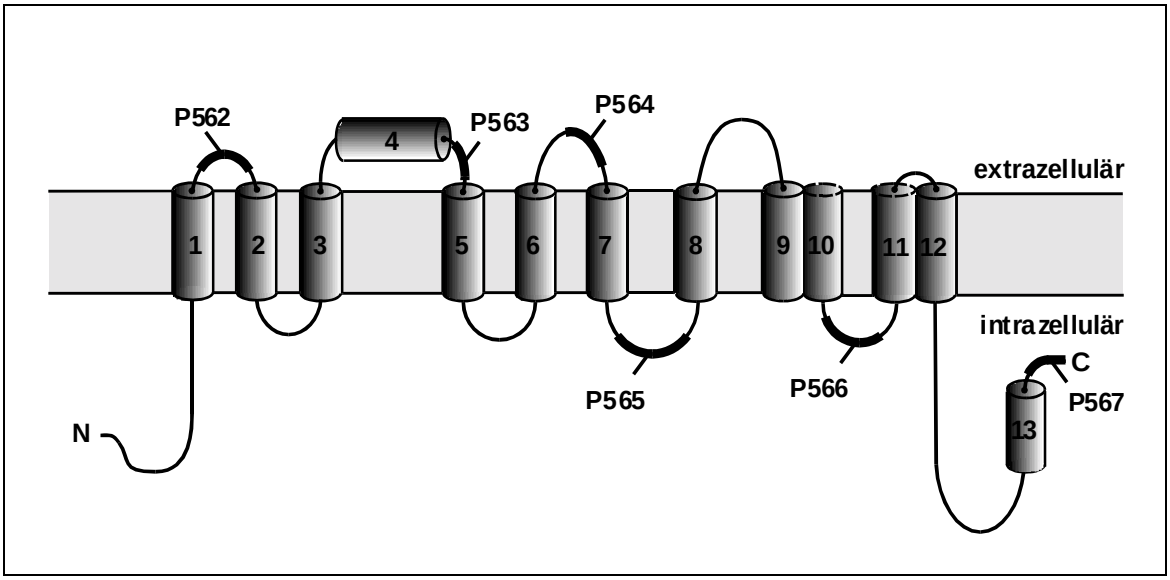


Abb.3.2: Topologiemodell von hClC-1 mit den ausgewählten Peptidabschnitten

Die mit P562 bis P567 bezeichneten Peptide liegen mit Ausnahme von P566 in der Mitte sehr hydrophiler Kanalbereiche. P566 entspricht der am wenigsten hydrophoben Region der sehr großen hydrophoben Domäne D9-D12 (vergleiche Abb.3.1).

In Tab.3.1 sind die Aminosäuresequenzen der ausgewählten Peptide (P562 bis P567; Abb.3.2) dargestellt. In den meisten Fällen enthalten sie am C-terminalen Ende einen zusätzlichen Cysteinrest, der die Kopplung des Peptids an das Trägermolekül KLH mit Hilfe von m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid-ester (MBS) ermöglichte. Bei P567 erfolgte die Kopplung mit Hilfe von Glutaraldehyd über die freie Aminogruppe eines Lysinrestes.

Die Synthese der Peptide sowie deren Kopplung an das Trägerprotein KLH wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt.

Tab.3.1: Aminosäuresequenzen der zur Immunisierung eingesetzten Peptide
In der letzten Spalte sind die Antikörperfraktionen aufgeführt, die aus der jeweiligen Immunisierung hervorgegangen sind.

Peptid (Position im Protein)	Aminosäuresequenz	IgY-Fraktion
P562 (D1/2)	H_2N-KSLQAYKWSYAQMQPC-$CONH_2$	SA24, SA25
P563 (D4/5)	H_2N-CGVYEQPYYYSD-$CONH_2$	SA26, SA27
P564 (D6/7)	H_2N-RTNFRMDFPFDLKEC-$CONH_2$	SA28, SA29
P565 (D7/8)	H_2N-RKHKALSQFLAKHRC-$CONH_2$	SA30, SA31
P566 (D10/11)	H_2N-DGILFDDIIYKILPGC-$CONH_2$	SA32, SA33
P567 (C-Terminus)	H_2N-SLRSTDEEDEDELIL-COOH	SA34, SA35

3.1.2. Immunoreaktivität der Antikörper

Die aus der Peptidimmunisierung erhaltenen Antikörperfraktionen SA24-SA35 (Tab.3.1) wurden mit Hilfe eines ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) auf ihre Immunoreaktivität gegen die entsprechenden zur Immunisierung eingesetzten Peptide getestet. In Abb.3.3 sind die Ergebnisse dieses Tests dargestellt.

Von den insgesamt 12 Antikörperfraktionen, die nach ihrer Aufreinigung in einer dem Dottervolumen entsprechenden Menge PBS aufgenommen wurden, zeigten lediglich vier eine Bindung an das entsprechende Peptid. Dies war die Antikörperfraktion SA24, die aus der Immunisierung mit dem Peptid P562 (D1/2) hervorgegangen ist, die Fraktionen SA26 und SA27, die beide durch Immunisierung mit P563 (D4/5) entstanden sind, und SA33, die das Peptid P566 (D10/11) erkennt. Die Bindung erfolgte nur bei Antikörperverdünnungen kleiner einer 1:4 Verdünnung, d.h. es sind sehr hohe Antikörperkonzentrationen notwendig.

Eine anschließende Western Blot Analyse der Antikörperfraktionen SA24, SA26, SA27 und SA33 mit Lysaten von hClC-1 exprimierenden tsA201 Zellen ergab, ebenso wie die Immunofluoreszenzfärbung solcher Zellen, keine spezifischen Signale.

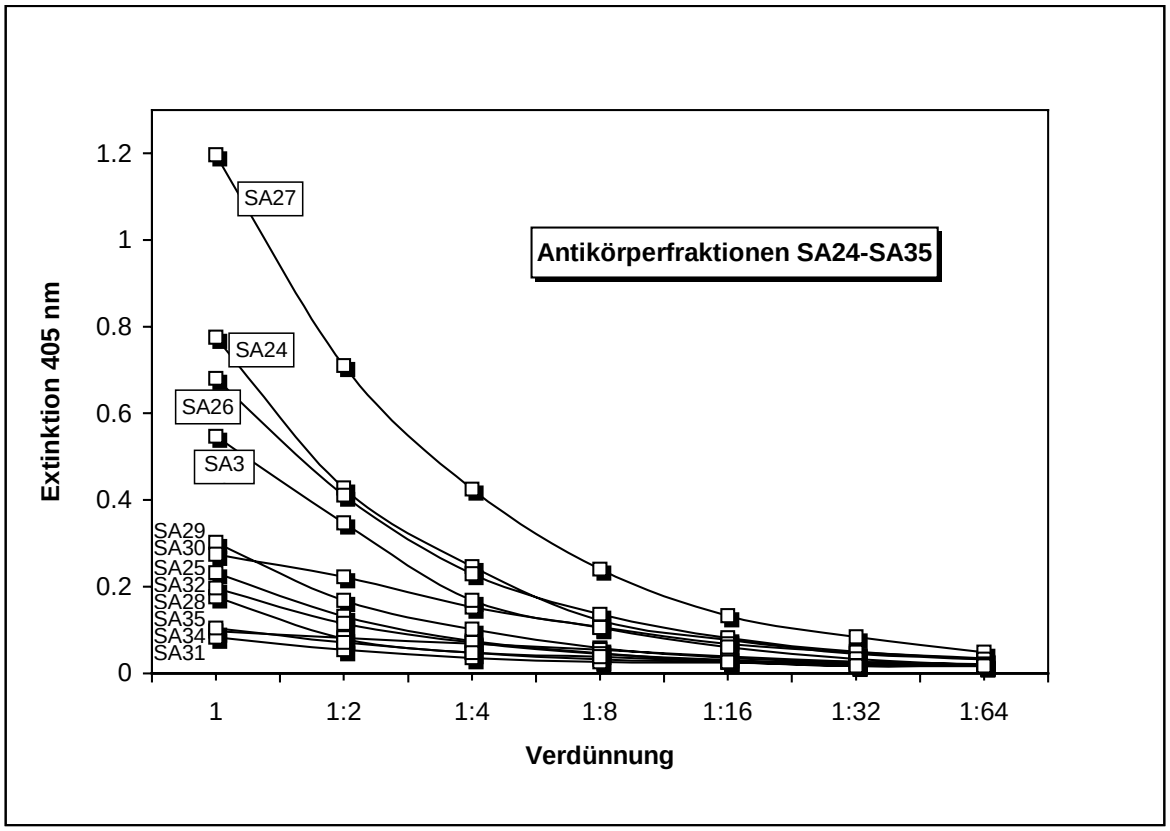


Abb.3.3: ELISA zur Überprüfung der Immunoreaktivität der IgY Fraktionen SA24-SA35 gegen die zu ihrer Herstellung eingesetzten Peptide

Zur Überprüfung der Immunoreaktivität wurden Mikrotiterplatten mit den zur Immunisierung verwendeten Peptiden beschichtet und die Bindung spezifischer Antikörper durch eine Farbreaktion mit pNPP als Substrat sichtbar gemacht. Das Endprodukt dieser Farbreaktion ruft eine Gelbfärbung hervor, die im Photometer bei 405 nm quantifiziert werden kann und deren Intensität der Menge an gebundenen Antikörpern direkt proportional ist.

3.2. Insertion und Lokalisation antigener Epitope

Ein zweiter Ansatz, die Lokalisation bestimmter Kanalabschnitte in der Membran zu untersuchen, war die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode, mit deren Hilfe an beliebigen Stellen des Kanalproteins antigene Epitope eingebaut werden können. Unter antigenen Epitopen versteht man kurze Aminosäuresequenzen, die von spezifischen Antikörpern erkannt werden. Durch Immunofluoreszenzfärbung von permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Zellen, die den Chloridkanal mit der entsprechenden Epitopinsertion exprimieren, könnte dann die Lokalisation der Epitope in der Zellmembran bestimmt werden.

3.2.1. Epitopeinbau durch sequenzspezifische Mutagenese

Die sequenzspezifische Mutagenese unter Verwendung des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit erwies sich als die effektivste Methode, um Nukleotidsequenzen mit einer Länge von 20-40 Basen an beliebigen Stellen in die cDNA des Chloridkanals einzubauen. Die ursprüngliche Methode wurde dabei etwas abgeändert und die Insertionen als sogenannte „dangling-ends“ an das 5‘-Ende der jeweiligen Primer angehängt. In Abb.3.4 ist das Prinzip dieser Mutagenese gezeigt.

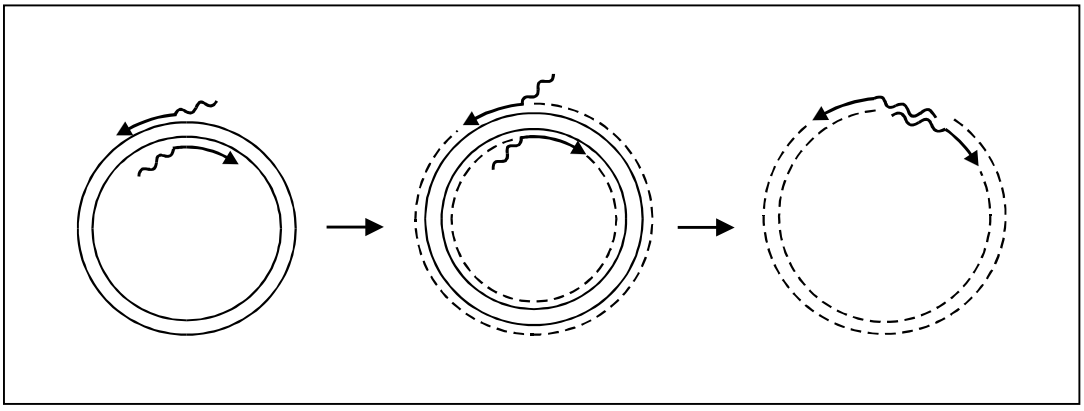


Abb.3.4: Modifizierte QuikChange™-Methode zur Insertion der antigenen Epitope

Im Gegensatz zur ursprünglichen Methode werden die Insertionen nicht in der Mitte der Mutageneseprimer platziert, sondern als sogenannte „dangling-ends“ an das 5‘-Ende der jeweiligen Primer angehängt.

Das 3‘-Ende jedes Primers besteht aus 15 bis 20 Nukleotiden, die komplementär zur Chloridkanalsequenz sind, die sich in 5‘- bzw. 3‘-Richtung an die Insertionsstelle anschließt. Damit bindet ein Primer „vor“, der andere auf dem Gegenstrang „hinter“ dieser Stelle. Die 5‘-Enden der Primer sind größtenteils komplementär zueinander und enthalten jeweils einen Teil der Epitopesequenz. Sie besitzen keine komplementären Strukturen zum Chloridkanal. Die als Template verwendete cDNA des Chloridkanals lag in dem Expressionsvektor pRc/CMV vor.

3.2.2. Einbau des flag-Epitops

Mit Hilfe der in Tab.3.2 aufgeführten Primerpaare wurde die Nukleotidsequenz 5‘-GACTATAAGGACGACGACGACAAG-3‘ am 3‘-Ende der Codons für folgende Aminosäuren in die Chloridkanalsequenz eingebaut (Abb.3.5): A151 (D1/2), K231 (D3/4), P260 (D4/5), F297 (D5/6), L332 (D6/7), M477 (D9/10), D513 (D10/11) und T550 (D11/12). Diese Nukleotidfolge entspricht dem flag-Epitope, das aus den Aminosäuren DYKDDDDK besteht (Knappik & Plückthun, 1994) und gegen das monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich sind.

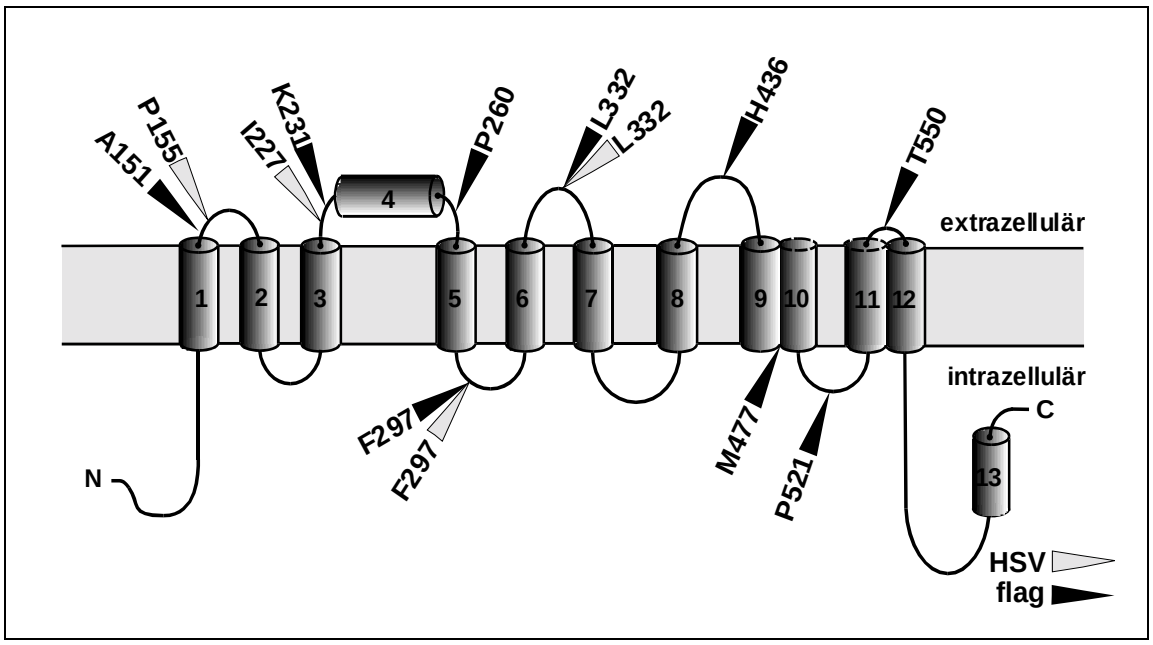


Abb.3.5: Topologiemodell des hClC-1 mit den eingebauten Epitopen

Die Epitopinsertionen sind durch Dreiecke sowie die Aminosäureposition gekennzeichnet, an der der Einbau erfolgte (schwarz: flag-Epitop; grau: HSV-Epitop).

Tab.3.2: Mutageneseprimer zum Einbau der flag-Epitope

Position	**Nukleotidsequenz** (hervorgehoben der Epitopanteil sowie die überlappenden Basen)
A151 (D1/2)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** CAG ATG CAG CCC AGC CTT CC 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** CGC GTA GGA CCA CTT GTA GG 3‘
K231 (D3/4)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** GAG GGC CCC TTC GTC CAC ATT GC 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** TTT CCC CAC GGG GAT GCC AC 3‘
P260 (D4/5)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** TAC TAC TAC TCT GAT ATC C 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** TGG CTG CTC ATA TAC CCC GC 3‘
F297 (D5/6)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** GCT GTT CGG AAC TAC TGG AGA GG 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** AAA GTA GGT GGA GGT GAC C 3‘
L332 (D6/7)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** TTC AGA ACC AAT TTC CGA ATG 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** CAG AGC AGT GAT GGT GAC AG 3‘
M477 (D9/10)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** CCC ATA CCC TGC GGA G 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** CAT AGT GGT GGC CAC GTA GG 3‘
D513 (D10/11)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** GAC ATC ATC TAC AAG ATC C 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** ATC AAA CAA AAT ACC ATC 3‘
T550 (D11/12)	5‘ **AAG GAC GAC GAC GAC AAG** GGT CAG ATT GCT CAC 3‘ 5‘ **T GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC** CGT TAA TTC GAA GCA AAT C 3‘

Erfolgreiche Insertionen der Nukleotidsequenz wurden mit Hilfe eines Restriktionsverdaus und einer anschließenden Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem 3%-igen Agarosegel identifiziert. Mit Hilfe eines solchen Gels kann ein Längenunterschied von 24 Basen, wie er der flag-Insertion entspricht, sichtbar gemacht werden. Die so identifizierten Insertionen wurden dann nochmals durch eine Sequenzierung überprüft.

Die flag-Epitop-Konstrukte werden im folgenden, entsprechend dem hydrophilen Bereich, in den sie eingebaut wurden, mit D1/2flag, D3/4flag, D4/5flag usw. bezeichnet. Eine zusätzliche Insertionsmutante mit dem flag-Epitope an Position H436 (D8/9) wurde freundlicherweise von Dr. C. Fahlke zur Verfügung gestellt.

3.2.3. Expression der flag-Epitop-Mutanten

Da als Template bei der Mutagenese eine cDNA des Chloridkanals verwendet wurde, die in dem Expressionsvektor pRc/CMV vorlag, konnten die Insertionsmutanten anschließend direkt in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Zur Überprüfung dieser Expression wurden Western Blot Analysen mit Lysaten von tsA201 Zellen durchgeführt, die mit dem jeweiligen Konstrukt transient transfiziert worden waren. Zur Detektion der Kanäle dienten Antikörper, die den C-Terminus des hClC-1 erkennen.

Wie der Western Blot in Abb.3.6 zeigt, gehen aus allen Konstrukten Kanalproteine hervor, die der Größe des Wildtyps (~ 120 kd) entsprechen. Der Gehalt der Zellen an Kanalprotein ist jedoch von Mutante zu Mutante sehr unterschiedlich. Während er für D4/5flag, D6/7flag und D11/12flag annähernd so hoch ist wie für den Wildtyp, werden alle anderen Konstrukte in geringerem Maße translatiert. Sehr schwache Signale erhält man mit D1/2flag, D3/4flag und D10/11flag.

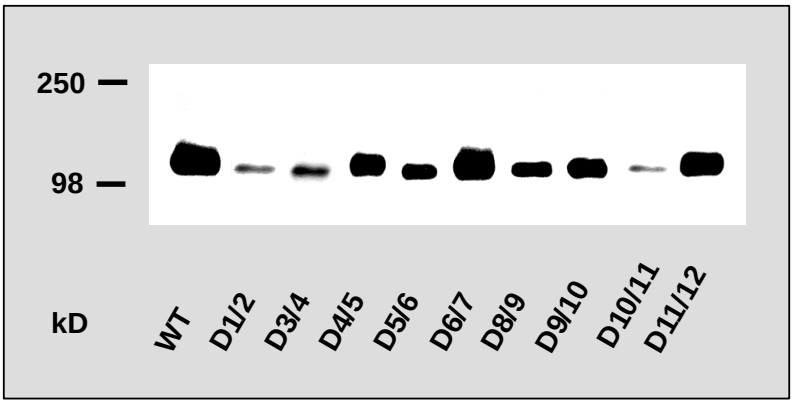


Abb.3.6: Überprüfung der Expression der flag-Epitop-Mutanten
Die Expression der Insertionskonstrukte in transient transfizierten tsA201 Zellen wurde im Western Blot mit Hilfe eines Antikörpers überprüft, der den C-Terminus des hClC-1 erkennt. Die Position der jeweiligen Epitopinsertion ist unter der entsprechenden Spur des Blots gekennzeichnet.

3.2.4. Funktionsuntersuchung der flag-Epitop-Mutanten

Um auszuschließen, daß die Topologie der Kanalproteine durch die Insertion der Epitope verändert wird, wurde die Funktionalität der mutierten Kanäle elektrophysiologisch überprüft. Unter der Annahme, daß Veränderungen in der Topologie eines Kanalproteins auch Auswirkungen auf seine elektrophysiologischen Eigenschaften haben, kann man umgekehrt davon ausgehen, daß Insertionsmutanten, deren Funktionalität unverändert ist, auch eine weitgehend unveränderte Topologie besitzen.

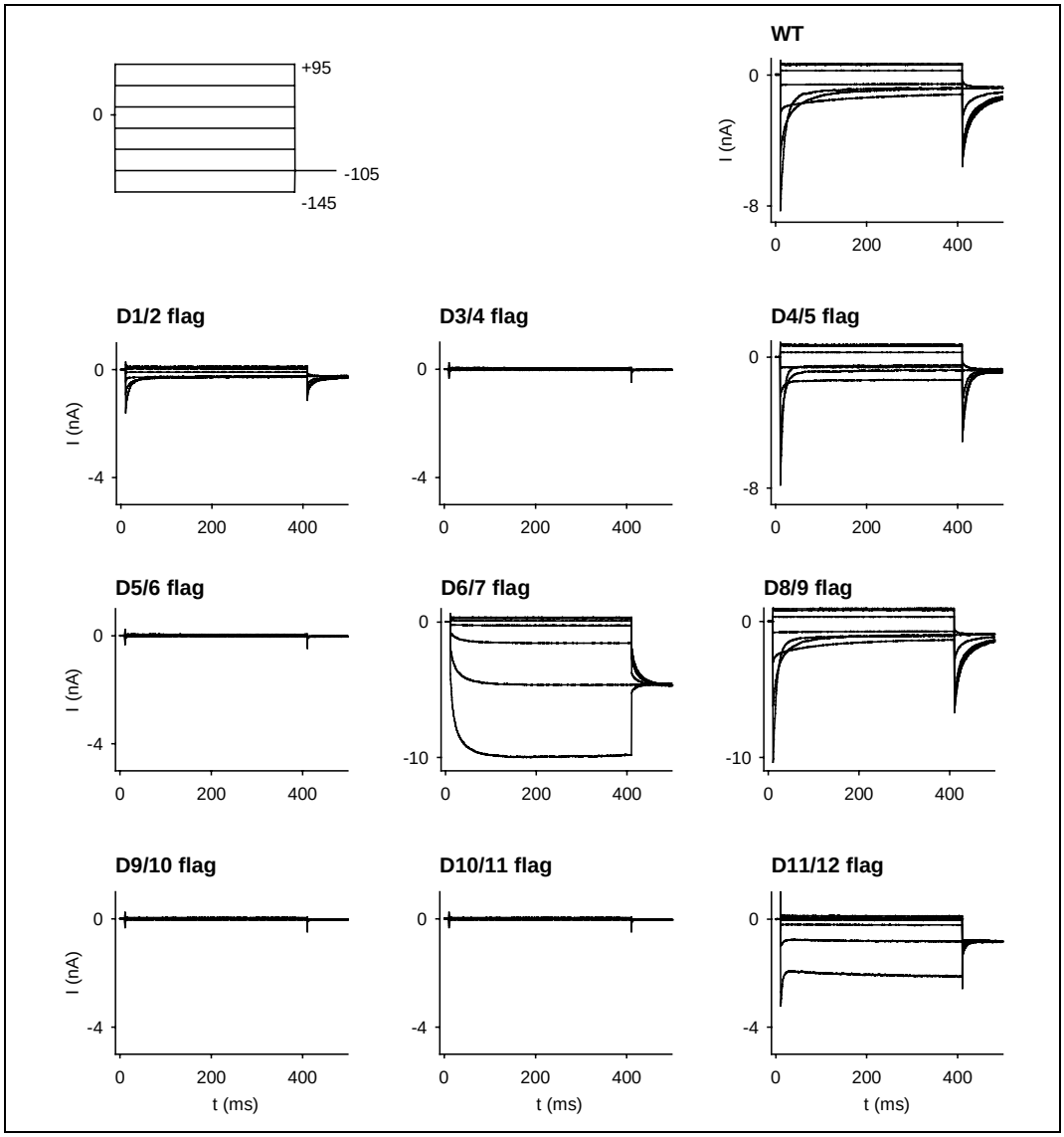


Abb.3.7: Stromantworten der flag-Epitop-Mutanten auf das Standard-Pulsprotokoll
Das Standard-Pulsprotokoll ist oben links dargestellt.

Die einzelnen Konstrukte wurden in tsA201 Zellen exprimiert und die elektrophysiologischen Eigenschaften der jeweiligen Kanäle durch Ganzzellableitungen charakterisiert. Wie die Stromantworten auf ein Standard-Pulsprotokoll in Abb.3.7 zeigen, gehen aus den Konstrukten D1/2flag, D4/5flag, D6/7flag, D8/9flag und D11/12flag funktionelle Kanäle hervor, während die Epitopinsertion in den Regionen D3/4, D5/6, D9/10 und D10/11 zum Verlust der Kanalfunktion führt.

Mit Ausnahme von D6/7flag antworten die funktionellen Kanäle wie der Wildtyp auf hyperpolarisierende Spannungssprünge mit einer unvollständigen Deaktivierung. Bei D11/12flag ist diese jedoch stark reduziert. D6/7flag zeigt bei negativen Potentialen eine Aktivierung, deren Kinetik aber mit derselben Gleichung beschrieben werden kann wie die der Deaktivierung des WT.

Wie Tab.3.3 zeigt, ist die maximale Stromamplitude nur bei den Konstrukten D1/2flag und D11/12flag signifikant verändert. Sie nimmt dort sehr kleine Werte an. Die Umkehrpotentiale unterscheiden sich dagegen in keinem Fall vom WT.

Tab.3.3: Maximale Stromamplituden (bei –145 mV) und Umkehrpotentiale der flag-Epitop-Mutanten

	max. Amplitude (nA)	Umkehrpotential (mV)	n
WT	-10.36 ± 3.6	0.95 ± 1.0	8
D1/2flag	-2.28 ± 1.6*	0.65 ± 0.9	4
D4/5flag	-9.31 ± 5.0	1.09 ± 0.5	7
D6/7flag	-9.08 ± 0.7	1.03 ± 0.3	15
D8/9flag	-9.23 ± 4.0	1.20 ± 0.4	5
D11/12flag	-2.56 ± 1.9*	1.04 ± 1.1	7

** signifikante Abweichung*

Ein Vergleich der Strom-Spannungs-Kurven (Abb.3.8) zeigt, daß die funktionellen Kanalkonstrukte wie der Wildtyp im gesamten Spannungsbereich geöffnet sind und einwärtsrektifizierende Eigenschaften haben. Mit Ausnahme von D6/7flag und D11/12flag zeigen alle Kanäle das für ClC-1 charakteristische Maximum der späten Ströme bei –65 mV.

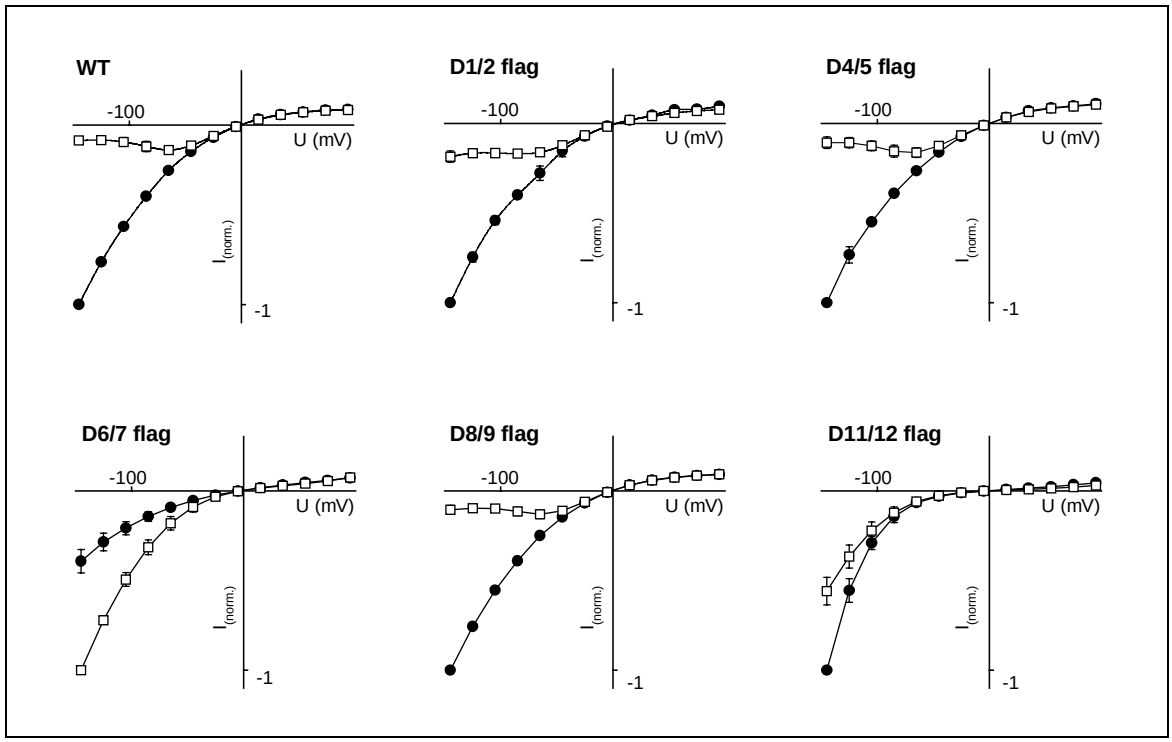


Abb.3.8: Strom-Spannungs-Kurven der flag-Epitop-Mutanten

Spannungsabhängigkeit der instantanen (●) und späten (□) Stromamplituden zu Beginn und am Ende der Testpulse, normalisiert auf den Wert der maximalen Amplitude bei –145 mV; n ≥ 4.

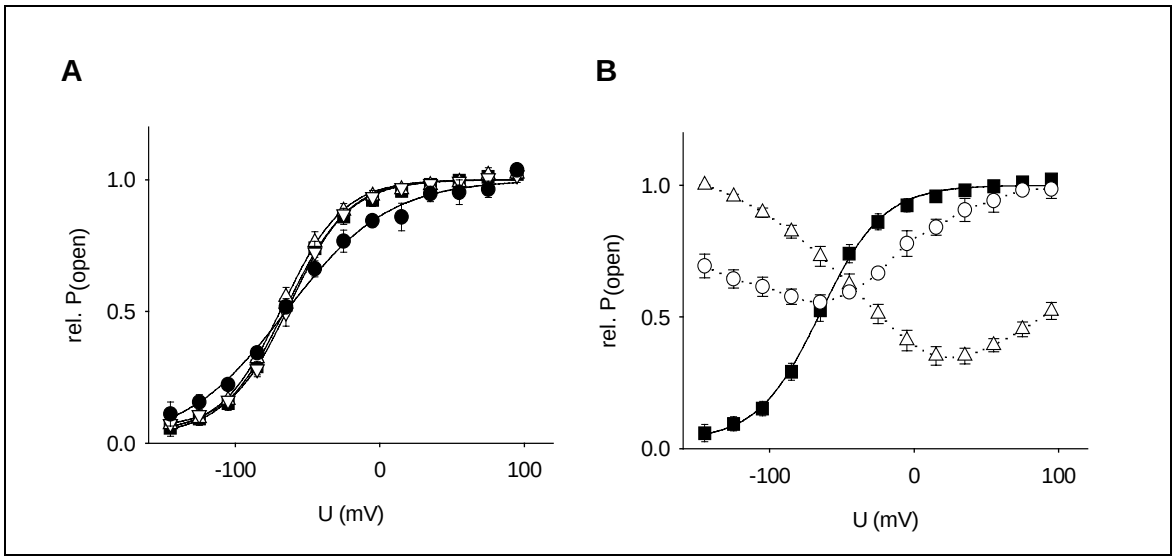


Abb.3.9: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit ($P_{(open)}$)

Die relative Offenwahrscheinlichkeit wurde anhand der normalisierten „tail currents“ der in Abb.3.7 dargestellten Stromkurven bestimmt. Die durchgezogenen Linien stellen die Angleichung der Daten durch eine Boltzmann-Funktion dar. A, WT (■), D1/2flag (●), D4/5flag (△), D8/9flag (▽); B, WT (■), D6/7flag (△), D11/12flag (○); n ≥ 3.

Als weiteres Charakteristikum wurde anhand der „tail currents“ die relative Offenwahrscheinlichkeit der Kanalmutanten bestimmt (Abb.3.9 A). Auch hier weisen nur die Konstrukte D6/7flag und D11/12flag, deren Aktivierungskurve nicht durch eine Boltzmann-Funktion angenähert werden kann, deutliche Unterschiede zum Wildtyp auf (Abb.3.9 B).

Die Angleichung der Aktivierungskurven der Konstrukte D1/2flag, D4/5flag und D8/9flag durch die Boltzmann-Funktion $I(V) = Amp\{1 + \exp[(V - V_{0.5})/k_v]\}^{-1} + c$ ergibt die in Tab.3.4 dargestellten Werte für die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit $V_{1/2}$ und den Steigungsfaktor k_v. Dabei zeigen sich mit Ausnahme des Steigungsfaktors von D1/2flag keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Insertionsmutanten.

Tab.3.4: Parameter der Angleichung der Aktivierungskurve durch eine Boltzmann-Funktion

	k_v (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	n
WT	-21.64 ± 3.2	-64.94 ± 2.8	9
D1/2flag	-35.42 ± 6.7*	-65.05 ± 6.1	3
D4/5flag	-20.91 ± 1.7	-67.32 ± 3.5	5
D8/9flag	-20.36 ± 1.3	-62.03 ± 4.4	5

** signifikante Abweichung*

3.2.5. Einbau des HSV-Epitops

Da die Beschaffenheit des flag-Epitopes, d.h. Aminosäurenzusammensetzung, Länge oder Ladung, für die Funktionsveränderungen einiger Kanalmutanten verantwortlich sein könnte, wurde ein weiteres Epitop in die Regionen D1/2, D3/4, D5/6 und D6/7 eingebaut (Abb.3.5). Dabei handelt es sich um das 11 Aminosäuren lange HSV-Epitop mit der Sequenz QPELAPEDPED.

Die Insertion erfolgte in diesem Fall in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit und des Expressionsvektors pRc/CMV-hClC-1 zwei Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Bsu15 I und Nhe I in die cDNA des Kanals eingebaut. In einem zweiten Schritt ermöglichten diese beiden Schnittstellen dann die Ligation beliebiger Oligonukleotid-Doppelstränge in die entsprechenden Regionen.

Die zur Insertion der Schnittstellen verwendeten Mutageneseprimer sind in Tab.3.5 dargestellt. Sie enthalten die Nukleotidfolge 5‘-ATCGATGGGGCTAGC-3‘ der Bsu15 I und Nhe I Schnittstellen, flankiert von 10-25 Nukleotiden, die der Chloridkanalsequenz komplementär sind, die sich in 5‘- und 3‘-Richtung an die Insertionsstelle anschließt. Die beiden Schnittstellen wurden durch einen kurzen Linker (GGG) getrennt, um ein korrektes Schneiden der Restriktionsenzyme zu gewährleisten.

Tab.3.5: Mutageneseprimer zum Einbau der Restriktionsschnittstellen der Enzyme Bsu15 I und Nhe I

Position	**Nukleotidsequenz** (hervorgehoben die Insertionssequenz und die Schnittstellen von Bsu15 I und Nhe I)
P155 (D1/2)	5‘ CGC GCA GAT GCA GCC C**AT CGA T**GG G**GC T**AG CCT TCC TCT GCA GTT CC 3‘ 5‘ GGA ACT GCA GAG GAA GGC T**AG CCC CAT CGA T**GG GCT GCA TCT GCG CG 3‘
I227 (D3/4)	5‘ CTG GGC AGT GGC ATC **GAT GGG GCT AGC** CCC GTG GGG AAA GAG G 3‘ 5‘ CCT CTT TCC CCA CGG G**GC TAG CCC CAT C**GA TGC CAC TGC CCA G 3‘
F297 (D5/6)	5‘ GGT CAC CTC CAC CTA CTT T**AT CGA TGG GGC TAG C**GC TGT TCG GAA CTA CTG G 3‘ 5‘ CCA GTA GTT CCG AAC AGC **GCT AGC CCC ATC GAT** AAA GTA GGT GGA GGT GAC C 3‘

Um die Nukleotidsequenz des HSV-Epitops in die mit den Restriktionsschnittstellen versehene cDNA des Chloridkanals einzubauen, wurde aus folgenden zueinander komplementären, phosphorylierten Oligonukleotiden ein Dimer gebildet:

5‘ PO_4-cgatCAGCCTGAACTCGCTCCAGAGGATCCGGAAGATg 3‘
5‘ PO_4-ctagcATCTTCCGGATCCTCTGGAGCGAGTTCAGGCTGat 3‘

Da der entstehende Doppelstrang bereits die entsprechenden Enden für eine Ligation in die Bsu15 I/Nhe I Schnittstelle besitzt (Kleinbuchstaben) und an den 5‘-Enden phosphoryliert ist, konnte er anschließend direkt in den Bsu15 I/Nhe I geschnittenen Expressionsvektor pRc/CMV-ClC-1 ligiert werden.

Auch hier wurden die Insertionen mit Hilfe eines Restriktionsverdaus und einer anschließenden Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem 3%-igen Agarosegel identifiziert. Bei erfolgreicher Insertion entstehen Fragmente, die 33 zusätzliche Basen enthalten. Die so identifizierten Insertionen wurden zusätzlich durch eine Sequenzierung überprüft.

Die Insertion des HSV-Epitops in der Region D6/7 wurde mit derselben Methode durchgeführt wie die Insertion der flag-Epitope. Hierzu wurden folgende Primer verwendet:

5‘ **CGCTCCAGAGGATCCGGAAGAT**TTCAGAACCAATTTCCGAATG 3‘
5‘ **TCCGGATCCTCTGGAGCGAGTTCAGGCTG**CAGAGCAGTGATGGTGACAG 3‘

Analog der flag-Epitop-Mutanten werden die HSV-Epitop-Konstrukte im folgenden, entsprechend dem hydrophilen Bereich, in den sie eingebaut wurden, mit D1/2HSV, D3/4HSV, D5/6HSV und D6/7HSV bezeichnet.

3.2.6. Expression der HSV-Epitop-Mutanten

Western Blot Analysen der Lysate von tsA201 Zellen, die die jeweiligen HSV-Epitop-Mutanten exprimieren, zeigen (Abb.3.10), daß auch hier aus allen Konstrukten Kanalproteine hervorgehen, die der Größe des Wildtyps (~120 kd) entsprechen. Einen besonders hohen Gehalt an translatiertem Protein zeigen Zellen, die das Konstrukt D6/7HSV exprimieren, bei allen anderen Zellen ist der Kanalproteingehalt dagegen wesentlich geringer.

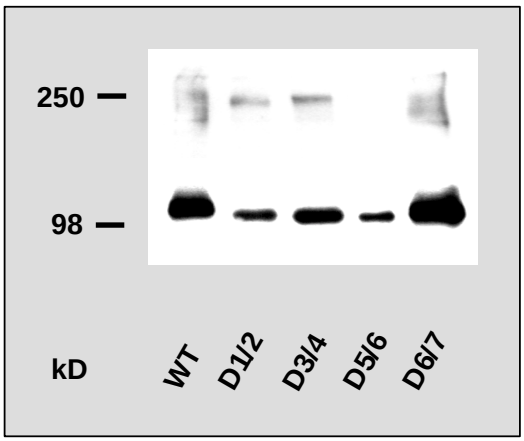


Abb.3.10: Überprüfung der Expression der HSV-Epitop-Mutanten

Die Expression der Insertionskonstrukte in transient transfizierten tsA201 Zellen wurde im Western Blot mit Hilfe eines Antikörpers überprüft, der den C-Terminus des ClC-1 erkennt. Die Position der jeweiligen Epitopinsertion ist unter der entsprechenden Spur des Blots gekennzeichnet.

3.2.7. Funktionsuntersuchung der HSV-Epitop-Mutanten

Ganzzellableitungen von tsA201 Zellen, die transient mit den HSV-Epitop-Konstrukten transfiziert wurden, zeigen, daß die Insertion des HSV-Epitops in den hydrophilen Bereichen D1/2 und D6/7 die Funktionalität der Kanäle nicht beeinflußt. Dagegen führt die Insertion in den Regionen D3/4 und D5/6, genauso wie bereits die Insertion des flag-Epitops, zum Verlust der Kanalfunktion.

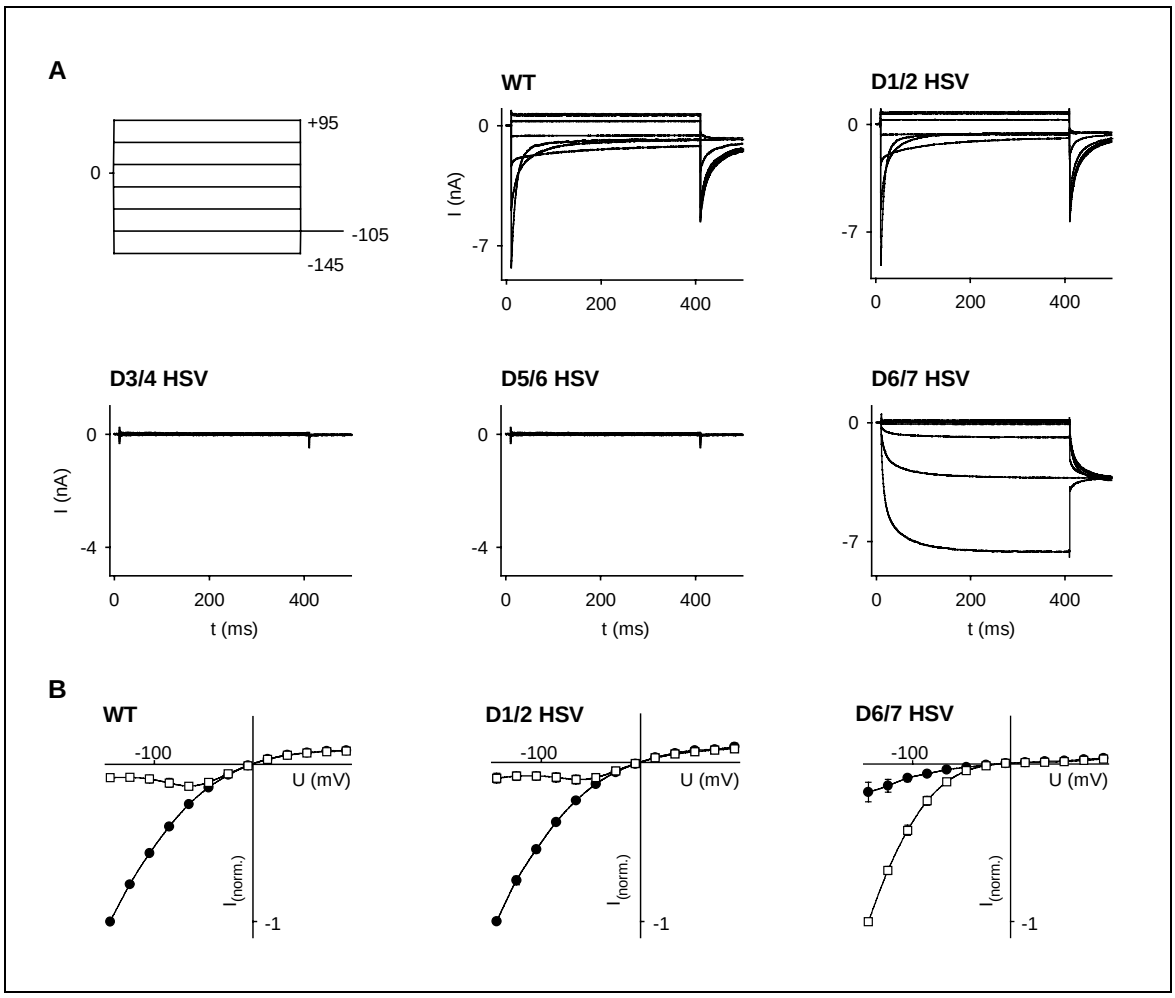


Abb.3.11: Stromantworten der HSV-Epitop-Mutanten auf das Standard-Pulsprotokoll

A, Stromantworten der HSV-Epitop-Mutanten (Pulsprogramm links oben).
B, Spannungsabhängigkeit der instantanen (●) und späten (□) Stromamplituden zu Beginn und am Ende der Testpulse, normalisiert auf den Wert der maximalen Amplitude bei –145 mV; n ≥ 4.

Abb.3.11 zeigt die Stromantworten der einzelnen Mutanten auf das Standard-Pulsprotokoll sowie die Strom-Spannungskurven der funktionellen Kanäle. Während sich die Ströme von D1/2HSV weder in der Größe ihrer maximalen Amplitude (I_{max} = -7,81 ± 3,5 nA; n = 4) noch in ihrem charakteristischen Deaktivierungsverhalten und der Einwärtsrektifizierung vom Wildtyp (I_{max} = -10.36 ± 3.6 nA; n = 7) unterscheiden, zeigt D6/7HSV, ebenso wie die entsprechende flag-Epitop-Mutante, im negativen Spannungsbereich eine Aktivierung. Die maximale Stromamplitude von D6/7HSV I_{max} = -9.31 ± 3.1 nA (n = 4) unterscheidet sich dagegen nicht signifikant von der des Wildtyps.

Das Umkehrpotential der HSV-Epitop-Mutanten liegt, mit E_{rev} = 1.20 ± 0.9 mV (n = 6) für D1/2HSV und E_{rev} = 1.08 ± 1.0 mV (n = 6) für D6/7HSV, im selben Bereich wie das Umkehrpotential des Wildtyps mit E_{rev} = 0.95 ± 1.0 mV (n = 7).

Die Aktivierungskurve (Abb.3.12) von D1/2HSV sowie die aus deren Angleichung mit der Boltzmann-Funktion $I(V) = Amp\{1 + \exp[(V - V_{0.5})/k_v]\}^{-1} + c$ resultierenden Parameter $V_{1/2}$ = -61.09 ± 5.9 mV und k_v = -21.35 ± 2.7 mV (n = 3) zeigen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp ($V_{1/2}$ = -64.94 ± 2.8 mV; k_v = -21.64 ± 3.2 mV; n = 9). Die Aktivierungskurve von D6/7HSV läßt sich dagegen nicht mit einer Boltzmann-Funktion angleichen und entspricht in ihrem Verlauf weitgehend der Aktivierungskurve von D6/7flag.

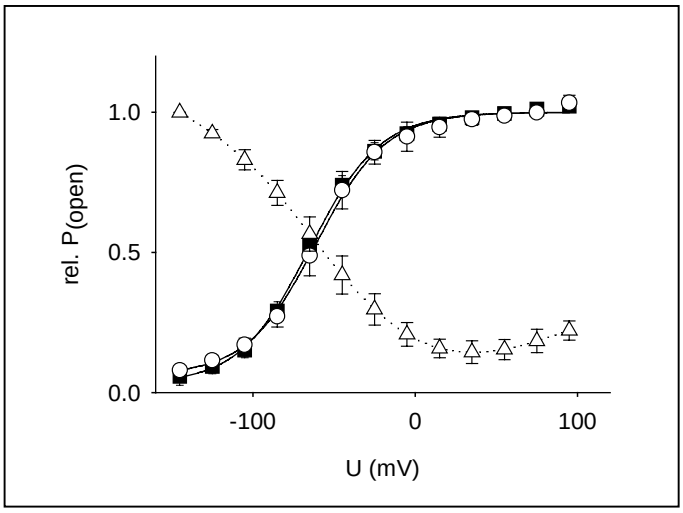


Abb.3.12: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit ($P_{(open)}$) der HSV-Epitop-Mutanten

$P_{(open)}$ wurde anhand der in Abb.3.11 dargestellten Stromkurven bestimmt. Die durchgezogenen Linien stellen die Angleichung der Daten durch eine Boltzmann-Funktion dar. WT (■) n = 9, D1/2HSV (○) n = 3, D6/7HSV (△) n= 5.

3.2.8. Immunofluoreszenzfärbung

Nach dem erfolgreichen Einbau der antigenen Peptidsequenzen, wurde die extra- bzw. intrazelluläre Lokalisation der Epitope in den funktionellen Kanalmutanten, durch eine Immunofluoreszenzfärbung bestimmt. Da die Insertion der flag-Epitope in den hydrophilen Regionen D4/5, D6/7, D8/9 und D11/12, sowie die Insertion des HSV-Epitops in der Region D1/2 die Funktionalität der Kanäle nicht wesentlich verändert, wurde davon ausgegangen, daß die Topologie dieser Insertionsmutanten der des Wildtyps entspricht.

Die Immunofluoreszenzfärbung wurden an tsA201 Zellen durchgeführt, die nach transienter Transfektion die entsprechenden Insertionskonstrukte exprimierten. Um zwischen intra- und extrazellulärer Lokalisation der Epitope zu unterscheiden, wurden diese Zellen vor bzw. nach Permeabilisierung der Zellmembran mit einem epitopspezifischen Antikörper behandelt. Da Antikörper die intakte Zellmembran nicht passieren können, binden sie im ersten Fall nur an Epitope, die extrazellulär lokalisiert sind, während sie nach Permeabilisierung der Zellmembran auch intrazellulär lokalisierte Epitope erkennen. Das Ergebnis der Immunofluoreszenzfärbung mit den epitopspezifischen Antikörpern und einer durch fluoreszierende Tyramide verstärkten Farbreaktion ist in Abb.3.13 dargestellt.

Wildtypkanäle werden von den epitopspezifischen Antikörpern „anti flag-Epitop“ und „anti HSV-Epitop“ weder vor noch nach Behandlung mit Triton® X100 erkannt. Sie können jedoch nach Permeabilisierung der Zellmembran durch Antikörper nachgewiesen werden, die den C-Terminus des Chloridkanals hClC-1 erkennen, der im Cytoplasma lokalisiert ist. Das in die Region D1/2 eingebaute HSV-Epitop wird von seinem spezifischen Antikörper sowohl nach Permeabilisierung als auch bei intakter Zellmembran erkannt. Dasselbe gilt für die in die Regionen D6/7 und D8/9 eingebauten flag-Epitope, die ebenfalls auch bei intakter Zellmembran detektiert werden. Die Epitope der Konstrukte D4/5flag und D11/12flag werden dagegen erst nach Permeabilisierung der Zellmembran erkannt.

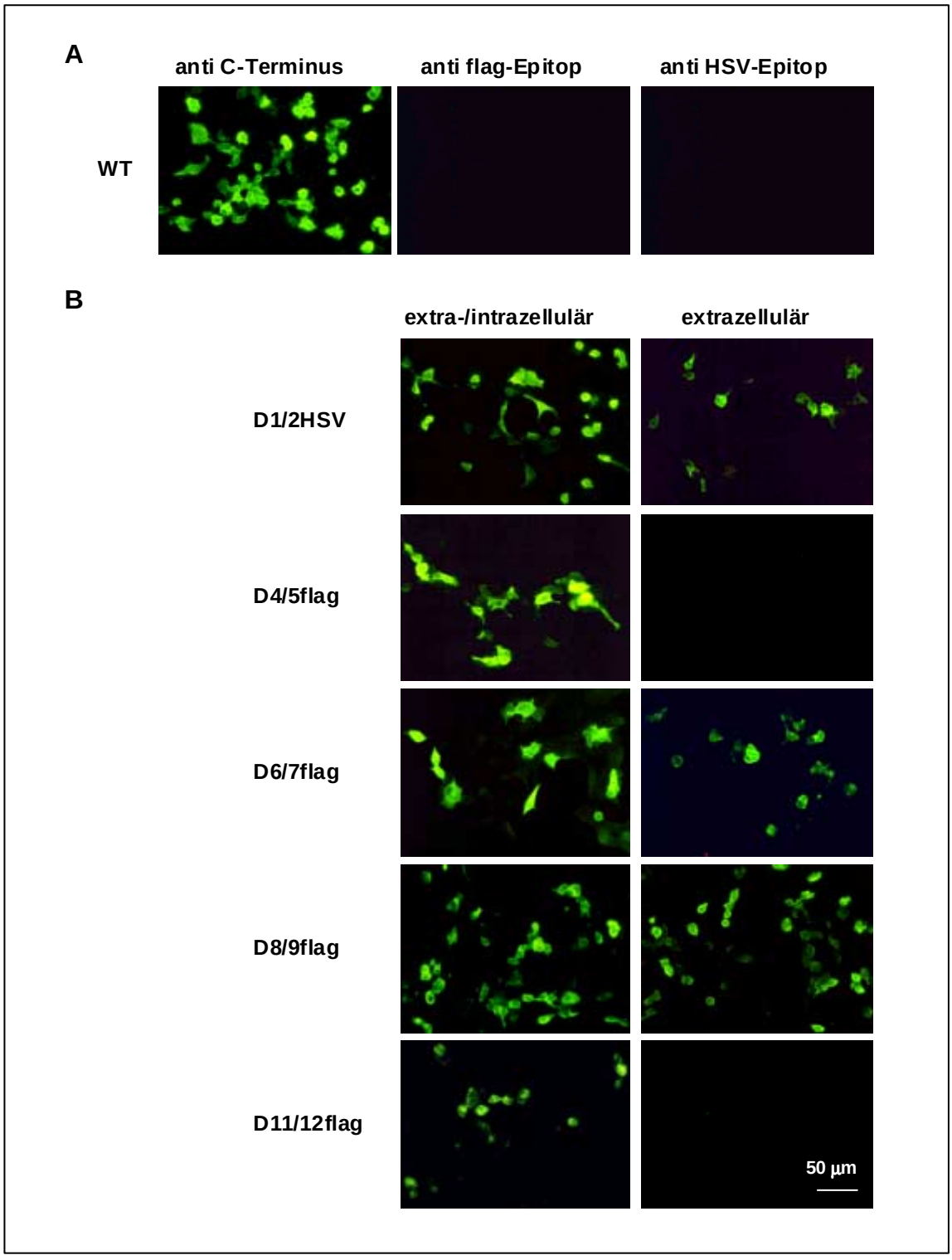


Abb.3.13: Bestimmung der Epitope-Lokalisation durch Immunofluoreszenzfärbung

A, Immunofluoreszenzfärbung von tsA201 Zellen, die den WT Kanal exprimieren. Die Antikörperinkubation erfolgte nach Permeabilisation der Zellmembran.
B, Lokalisation der eingebauten Epitope. Zellen, die die jeweilige Insertionsmutanten exprimieren, wurden vor (rechte Spalte) bzw. nach (linke Spalte) Permeabilisation der Zellmembran mit epitopspezifischen Antikörpern inkubiert.

3.3. Der hydrophile Abschnitt D4/5 und die Bildung der Porenregion

Der hydrophile Bereich D4/5 bzw. die gesamte Region zwischen den Transmembrandomänen D3 und D5 wird als mögliche Porenregion diskutiert, in der bereits der Austausch einzelner Aminosäuren die Eigenschaften des Kanals drastisch verändert (Fahlke *et al.*, 1997d). Es war deshalb überraschend, daß der Einbau des flag-Epitopes an der Position P260 (D4/5flag), d.h. die Insertion mehrerer z.T. geladener Aminosäuren in dieser potentiellen Porenregion, keinen Einfluß auf die Eigenschaften des Chloridkanals hat. Um diese Tatsache genauer zu überprüfen, wurde die Deaktivierungskinetik dieser flag-Epitop-Mutante sowie deren Ionenselektivität genauer untersucht.

3.3.1. Deaktivierungskinetik der flag-Epitop-Mutante D4/5flag

Wie bereits in Abschnitt 3.2.4 gezeigt, antwortet auch die Mutante D4/5flag entsprechend dem Wildtyp auf hyperpolarisierende Spannungssprünge mit einer unvollständigen Deaktivierung, die durch eine Summe aus zwei Exponentialfunktionen und einem konstanten Wert ($I(t) = a_1\exp(-t/\tau_1) + a_2\exp(-t/\tau_2) + c$) beschrieben werden kann. Die genauere Analyse der Parameter dieser Anpassungskurve zeigt jedoch einige Unterschiede zum Wildtyp (Abb.3.14).

Während die relative Amplitude der langsamen Deaktivierungskomponente A_2 von D4/5flag im gesamten Spannungsbereich sehr viel kleinere Werte annimmt als beim Wildtyp, ist die relative Amplitude ihrer schnellen Komponente A_1 entsprechend erhöht. Das Deaktivierungsverhalten läßt sich jedoch, trotz der sehr kleinen Werte von A_2, nicht durch eine einfache Exponentialfunktion beschreiben. Die relative Amplitude der konstanten Komponente C zeigt keine signifikante Veränderung.

Auch bei den Zeitkonstanten ist ein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (Abb.3.14 D). Während sich die schnelle Zeitkonstante τ_1 nicht signifikant von der des Wildtyps unterscheidet (D4/5flag: $\tau_{1(-105mV)} = 13.23 \pm 2.0$ ms, n = 4; WT: $\tau_{1(-105mV)} = 13.65 \pm 2.7$ ms, n = 4), ist die langsame Zeitkonstante τ_2 annähernd doppelt so groß wie beim Wildtyp (D4/5flag: $\tau_{2(-105mV)} = 122.36 \pm 28$ ms, n = 4; WT: $\tau_{1(-105mV)} = 59.02 \pm 10$ ms, n = 4).

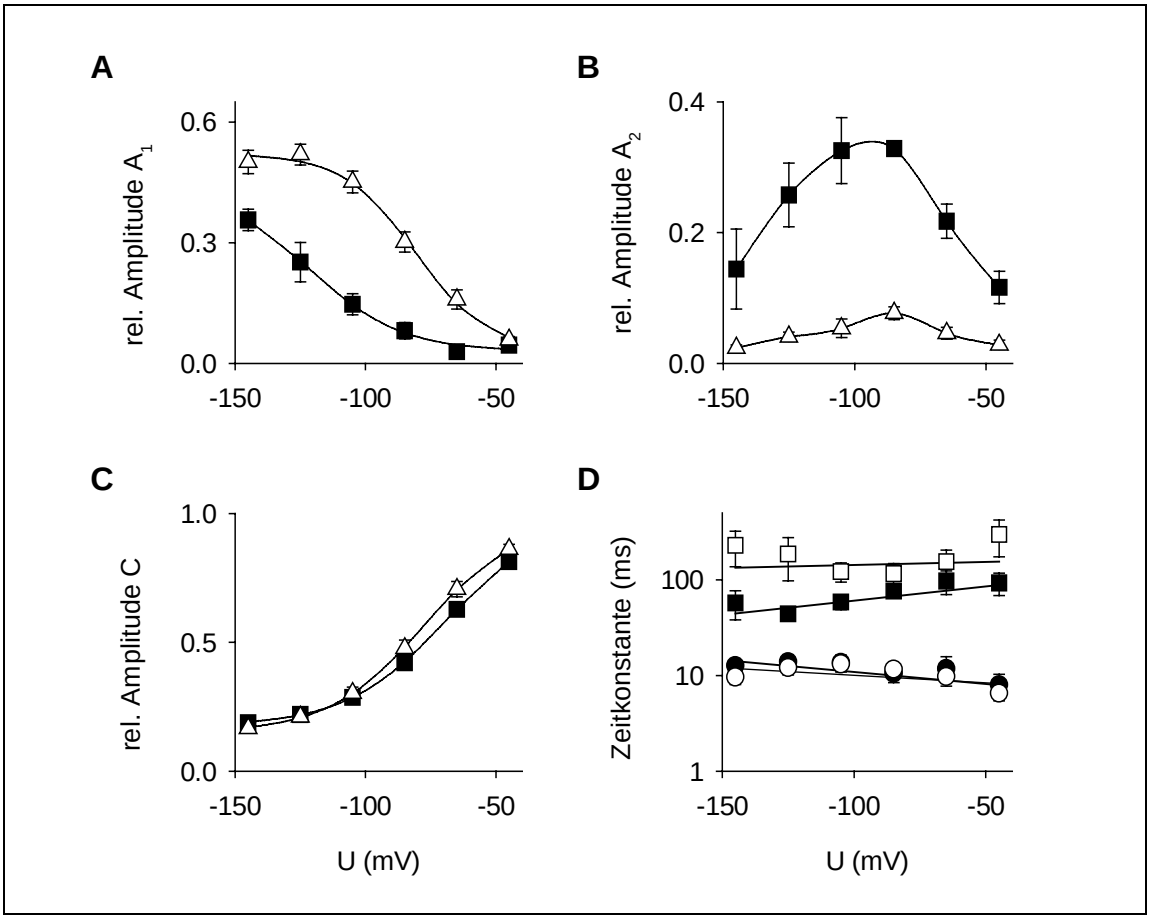


Abb.3.14: Deaktivierungskinetik

Spannungsabhängigkeit der relativen Amplituden der schnellen Deaktivierungskomponente A_1 (A), der langsamen Deaktivierungskomponente A_2 (B) und der konstanten Komponente C (C), nach Angleichung der Stromkurven aus Abb.3.7 durch eine Summe aus zwei Exponentialfunktionen und einem konstanten Wert (WT ■, D4/5flag △); $n \geq 4$.
D, Spannungsabhängigkeit der schnellen Zeitkonstante τ_1 (WT ●, D4/5flag ○) und der langsamen Zeitkonstante τ_2 (WT ■, D4/5flag □); $n \geq 4$.

3.3.2. Ionenselektivität und der Einfluß extrazellulärer Anionen auf die Deaktivierungskinetik des WT und der Mutante D4/5flag

Die Ionenselektivität ist eine der wichtigsten Poreneigenschaften eines Ionenkanals. Sie wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung bestimmt, indem das Umkehrpotential der Kanäle in unterschiedlichen externen Lösungen gemessen wurde.

Wie Tab.3.6 zeigt, bleibt die Ionenselektivität bei der Mutante D4/5flag mit der Folge $Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$, trotz der Insertion des flag-Epitops an der Position P260, unverändert. Ihr Umkehrpotential (E_{rev}) entspricht für alle getesteten Anionen dem des Wildtyps.

Tab.3.6: Relative Ionenselektivität des WT und der flag-Epitop-Mutante D4/5flag (n ≥ 6)

	E_{rev} (mV)				P_{x^-}/P_{Cl^-}			
	Cl^-	Br^-	NO_3^-	I^-	Cl^-	Br^-	NO_3^-	I^-
D4/5flag	3.5 ± 0.1	16.5 ± 1.4	25.0 ± 3.3	41.8 ± 4.3	1.0	0.57	0.39	0.17
WT	3.3 ± 0.2	16.7 ± 1.2	24.7 ± 0.5	41.8 ± 0.5	1.0	0.56	0.39	0.16

Die Spannungsabhängigkeit der relativen Amplituden der drei Deaktivierungskomponenten (A_1, A_2 und C) hängt sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante D4/5flag in gleicher charakteristischer Weise von den Anionen der externen Lösung ab (Abb.3.15).

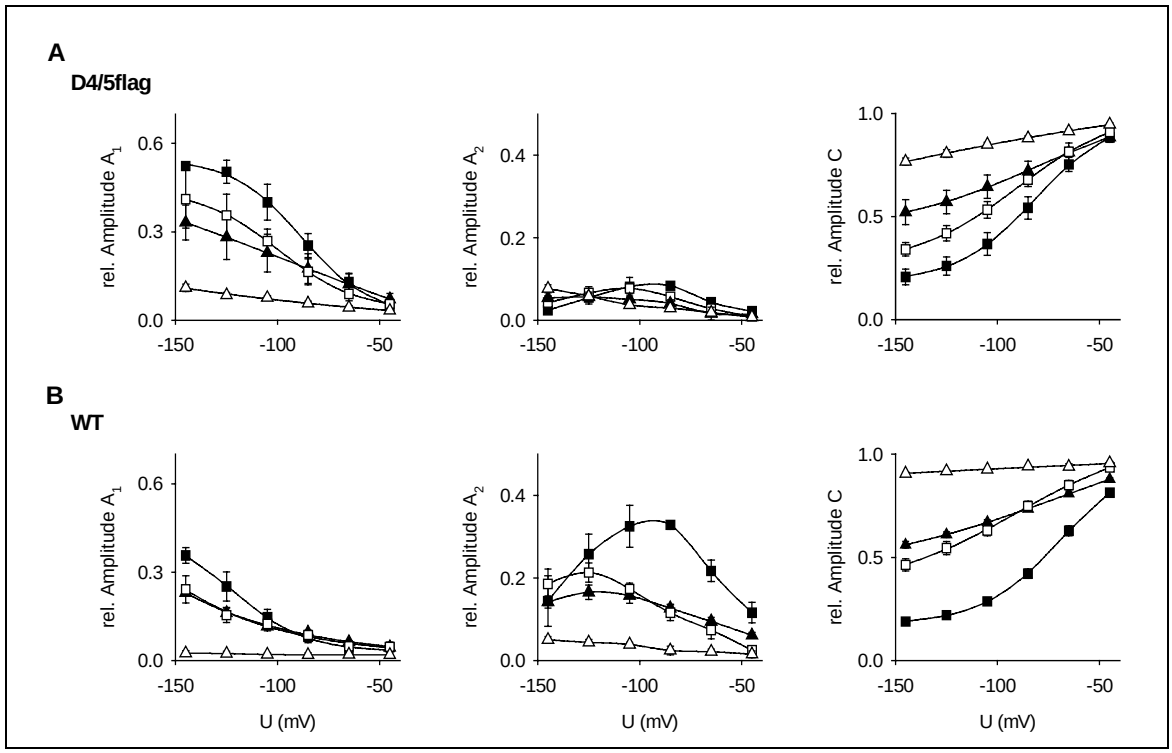


Abb.3.15: Einfluß extrazellulärer Anionen auf die Deaktivierungskinetik

Die Spannungsabhängigkeit der relativen Amplituden A_1, A_2 und C in Gegenwart der Anionen Cl^- (■), Br^- (□), NO_3^- (▲) oder I^- (△) wurde entsprechend Abb.3.14 bestimmt, wobei jeweils 140 mM Cl^- der externen Lösung gegen Br^-, NO_3^- und I^- ausgetauscht wurde; n ≥ 4.

Bei beiden, WT und Mutante, nehmen die Amplituden der schnellen (A_1) und der langsamen (A_2) Deaktivierungskomponente mit abnehmender Permeabilität der Anionen ($Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$) immer kleinere Werte an, während die Amplitude der konstanten Komponente entsprechend zunimmt. Dies hat zur Folge, daß die Deaktivierung insgesamt immer unvollständiger wird und bei I^--Ionen fast völlig verloren geht. Wie Abb.3.16 zeigt, ist der zunehmende Verlust des Deaktivierungsverhaltens bei D4/5flag jedoch nicht so stark ausgeprägt wie beim Wildtyp. Bei der Mutante nimmt die im Vergleich zum WT stark erhöhte Amplitude der schnellen Deaktivierungskomponente (A_1) nur um denselben Wert ab wie die des WT. Außerdem wird die im Vergleich zum WT bereits sehr kleine Amplitude der langsamen Deaktivierung (A_2) kaum noch weiter reduziert (Abb.3.15).

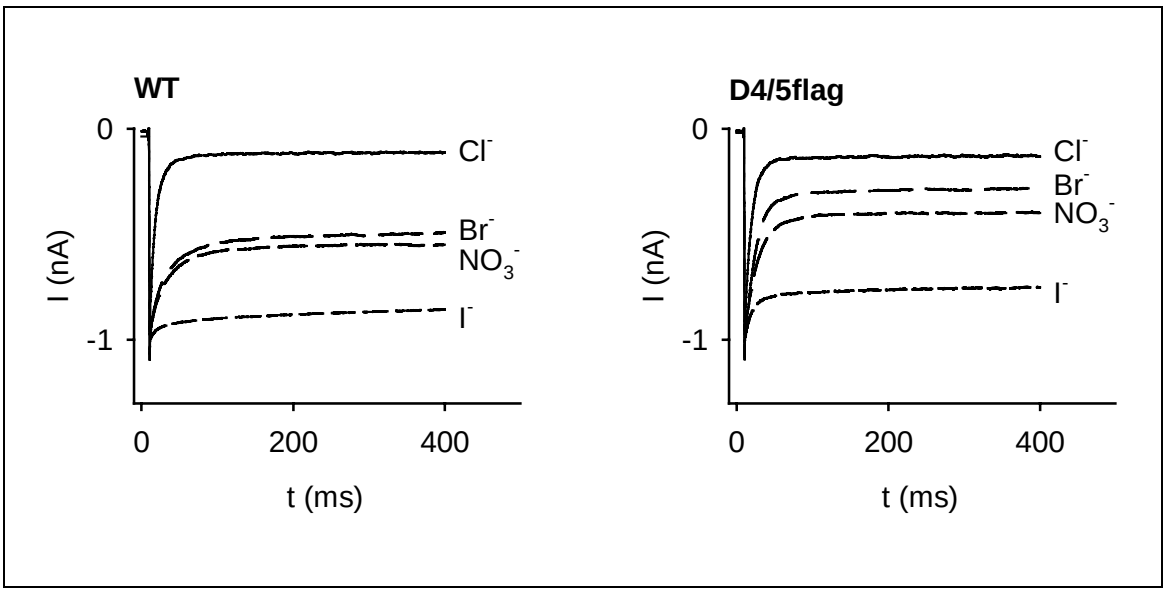


Abb.3.16: Stromkurven der Mutante D4/5flag in Gegenwart unterschiedlicher extrazellulärer Anionen im Vergleich zum WT

Stromantworten auf einen Spannungssprung von 0 mV (Haltepotential) auf –145 mV in Gegenwart von 140 mM externem Cl^- (——), Br^- (— —), NO_3^- (– – –) oder I^-(- - - -). Um die verschiedenen Ströme vergleichen zu können, wurden sie auf ihren instantanen Wert (I_{inst}) normalisiert.

3.4. Identifizierung extrazellulärer Zn^{2+}-Bindungsstellen im hClC-1

Externe Applikation von ZnCl führt bei tsA201 Zellen, die den humanen Chloridkanal hClC-1 exprimieren, zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Cl^--Ströme. An dieser Zn^{2+}-Blockade sind wahrscheinlich Cystein- und Histidinreste an der extrazellulären Oberfläche des Kanalproteins beteiligt. Die Identifizierung dieser potentiellen, extrazellulär lokalisierten Bindungsstellen könnte somit weitere Hinweise auf die Membrantopologie des Kanals geben.

3.4.1. Entfernung potentieller Bindungsstellen

Mit Hilfe der sequenzspezifischen Mutagenese wurden insgesamt sechs, in Anlehnung an das Topologiemodell nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997) hauptsächlich extrazellulär lokalisierten Cysteine (C179, C242, C254, C271, C481 und C546), durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt (Abb.3.17).

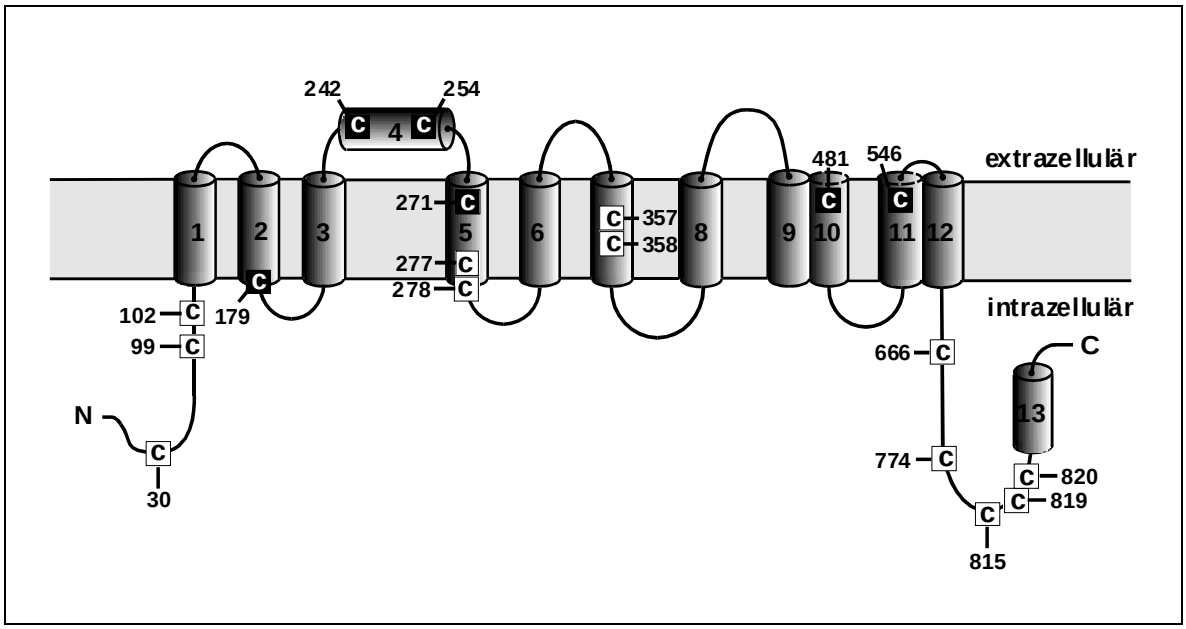


Abb.3.17: Topologiemodell von hClC-1

Gekennzeichnet sind alle Cysteinreste des Kanals; schwarz unterlegt die Cysteine, die gegen Alanin ausgetauscht wurden (C179, C242, C254, C271, C481 und C546).

Die zur Mutagenese verwendeten Primer sind in Tab.3.7 aufgeführt. Um das Auffinden positiver Mutanten zu erleichtern, enthielten sie neben dem Codonaustausch eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle. Klone, bei denen die Mutagenese erfolgreich war, konnten somit durch einen Restriktionsverdau identifiziert werden. Im Fall von C546 wurde zur Identifizierung die vorhandene Restriktionsschnittstelle für das Enzym Bsp119I durch einen Basenaustausch so verändert, daß sie von dem Enzym nicht mehr erkannt wird.

Tab.3.7: Mutageneseprimer zur Entfernung potentieller Zn^{2+}-Bindungsstellen

Position	**Nukleotidsequenz** (hervorgehoben das Codon für Alanin GCN sowie die zusätzliche Restriktionsschnittstelle; Kleinbuchstaben stellen „Mismatch" Basen dar)
C179 (D2)	5' C GCC CTC TTC **gcC** CAC CT**g ATa TC**T$_{Eco32I}$ CCC CAG 3' 5' CTG GGG A**GA tAT c**$_{Eco32I}$AG GTG **Ggc** GAA GAG GGC G 3'
C242 (D4)	5' ATT GCC AGC ATC **gcT GCa G**$_{PstI}$CT GTC CTC AGC 3' 5' GCT GAG GAC AG**C tGC Ag**$_{PstI}$**c** GAT GCT GGC AAT 3'
C254 (D4)	5' C ATG TCT GTG TTC **gcC** GGG **GTA TAc**$_{AccI}$ GAG CAG C 3' 5' G CTG CTC **gTA TAC**$_{AccI}$ CCC **Ggc** GAA CAC AGA CAT G 3'
C271 (D5)	5' C CTG ACG GTG GGC **gcT GCa G**$_{PstI}$TG GGA GTC GG 3' 5' CC GAC TCC CA**C tGC Ag**$_{PstI}$**c** GCC CAC CGT CAG G 3'
C481 (D10)	5' CT ATG CCC ATA C**Cg gcC G**$_{Eco52I}$GA GGC TTC ATG CC 3' 5' GG CAT GAA GCC TC**C Ggc cG**$_{Eco52I}$G TAT GGG CAT AG 3'
C546 (D11)	5' GCT GTG ATT **gcC TTt GAA**$_{Bsp119I}$ TTA ACG GGT CAG 3' 5' CTG ACC CGT TAA **TTC aAA**$_{Bsp119I}$ **ggc** AAT CAC AGC 3'

Die einzelnen Cysteinmutanten, die im folgenden entsprechend dem Aminosäureaustausch mit C179A, C242A, usw. bezeichnet werden, wurden in tsA201 Zellen exprimiert, und

deren Blockade durch Zn^{2+}-Ionen mit Hilfe von Ganzzellableitungen überprüft. Wenn einer der ausgetauschten Cysteinreste an der Bindung von Zn^{2+} und damit an der Stromblokkade durch dieses Molekül beteiligt ist, muß es nach dem Austausch der Aminosäure zu einer Abnahme der Stromreduktion durch Zn^{2+} kommen.

3.4.2. Funktionsuntersuchung der Cysteinmutanten

Um auszuschließen, daß der Aminosäureaustausch die Struktur und Funktion der Chloridkanäle beeinflußt, wurden auch hier zuerst die Effekte der einzelnen Mutationen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals untersucht (Abb.3.18).

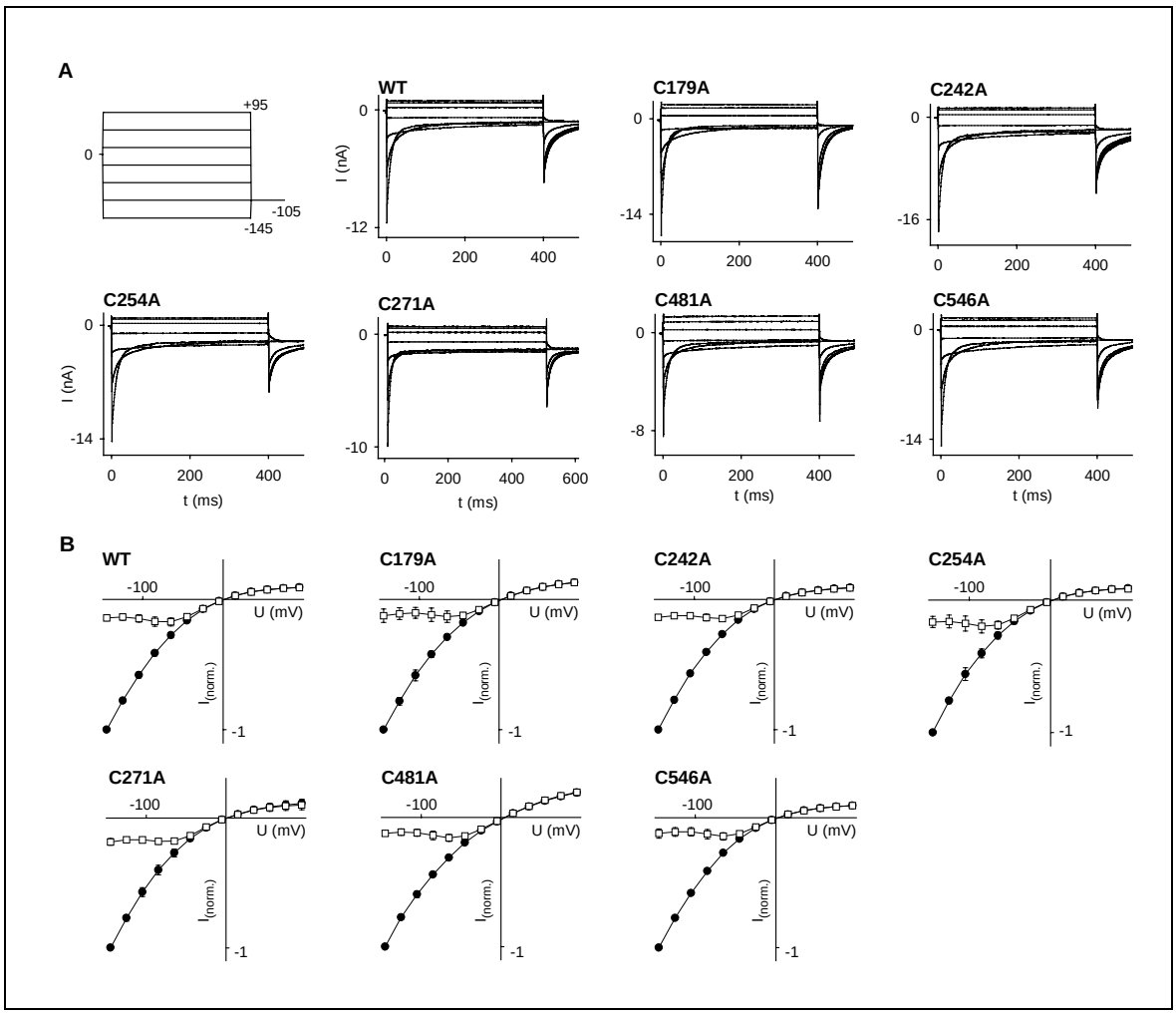


Abb.3.18: Elektrophysiologische Charakterisierung der Cysteinmutanten

A, Stromantworten der Cysteinmutanten auf das Standard-Pulsprotokoll (oben links)
B, Spannungsabhängigkeit der instantanen (●) und späten (□) Stromamplituden zu Beginn und am Ende der Testpulse, normalisiert auf den Wert der maximalen Amplitude bei –145 mV; n ≥ 4.

Tab.3.8: Maximale Amplituden (bei –145 mV) und Umkehrpotentiale der Cysteinmutanten

	max. Amplitude (nA)	Umkehrpotential (mV)	n
WT	-10.36 ± 3.6	5.76 ± 1.0	6
C179A	-9.0 ± 6.1	6.21 ± 1.0	4
C242A	-10.90 ± 5.3	4.66 ± 1.3	5
C254A	-10.50 ± 4.4	4.24 ± 0.9	5
C271A	-9.26 ± 5.9	4.78 ± 0.9	5
C481A	-9.62 ± 6.2	4.72 ± 1.4	5
C546A	-11.67 ± 2.1	5.46 ± 1.6	5

Alle Mutanten zeigen typische Cl^--Ströme, die sich in der Größe ihrer maximalen Amplitude (Tab.3.8), ihrem charakteristischen Deaktivierungsverhalten und der Einwärtsrektifizierung nicht wesentlich vom Wildtyp unterscheiden. Auch die Umkehrpotentiale zeigen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (Tab.3.8).

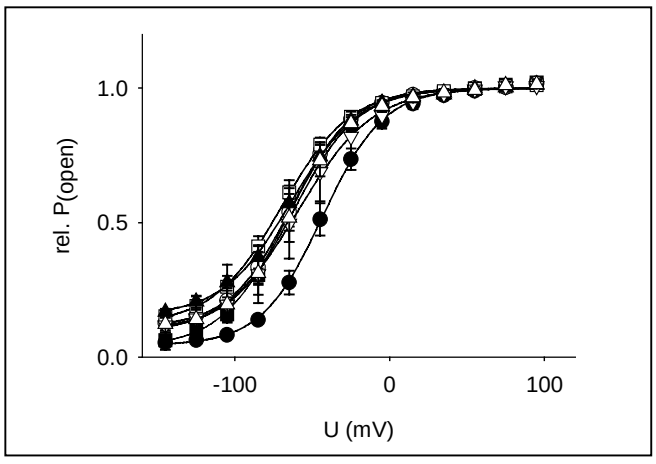


Abb.3.19: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit ($P_{(open)}$) der Cysteinmutanten

$P_{(open)}$ wurde anhand der in Abb.3.18 A dargestellten Stromkurven bestimmt. Die durchgezogenen Linien stellen die Angleichung der Daten durch eine Boltzmann-Funktion dar. WT (■), C179A (●), C242A (○), C254A (□), C271A (▲), C481A (▽), C546A (△); n ≥ 4.

Die aus den „tail currents“ der in Abb.3.18 dargestellten Ströme erhaltenen Aktivierungskurven der einzelnen Cysteinmutanten lassen sich alle durch die Boltzmann-Funktion $I(V) = Amp\{1 + \exp[(V - V_{0.5})/k_v]\}^{-1} + c$ angleichen. Die daraus resultierenden Parameter der halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeit $V_{1/2}$ und des Steigungsfaktors k_v sind in Tab.3.9 zusammengefaßt. Mit Ausnahme der Mutante C179A, bei der die Offenwahr-

scheinlichkeit zu positiveren Werten verschoben ist, treten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Cysteinmutanten und dem Wildtyp auf.

Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, daß sowohl die Struktur als auch die Funktion der Kanäle durch den Austausch der Cysteine nicht wesentlich verändert wird.

Tab.3.9: Parameter der Angleichung der Aktivierungskurven durch eine Boltzmann-Funktion

	k_v (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	n
WT	-21.26 ± 3.5	-66.34 ± 2.3	6
C179A	-19.66 ± 0.3	-43.44 ± 6.3*	3
C242A	-20.14 ± 1.6	-63.57 ± 6.2	5
C254A	-22.17 ± 2.2	-69.79 ± 1.4	3
C271A	-22.09 ± 1.3	-63.78 ± 8.1	2
C481A	-24.16 ± 1.3	-59.33 ± 1.2	3
C546A	-20.56 ± 1.8	-61.63 ± 6.8	8

** signifikante Abweichung*

3.4.3. Zn^{2+}-Blockade der Cysteinmutanten

Die Blockade der einzelnen Cysteinmutanten durch Zn^{2+}-Ionen wurde durch Ganzzellmessungen mit Hilfe eines Spannungsprotokolls überprüft, das das Membranpotential der Zellen zuerst für 100 ms auf +50 mV und dann für 400 ms auf –125 mV hält. Dieses Pulsprotokoll wurde in 15-Sekunden-Abständen solange wiederholt, bis sich nach der Zn^{2+}-Applikation konstante Stromwerte eingestellt hatten. In Abb.3.20 sind die Stromantworten des Wildtyps auf dieses Pulsprotokoll vor und nach Applikation von 1 mM Zn^{2+} gezeigt.

Zur Quantifizierung der Zn^{2+}-Blockade wurde die Stromamplitude bei +50 mV nach Zn^{2+}-Applikation in Relation zum Ausgangswert I_{max} vor der Zn^{2+}-Applikation gesetzt. Der Ausgangswert wurde dabei gleich 100 % gesetzt.

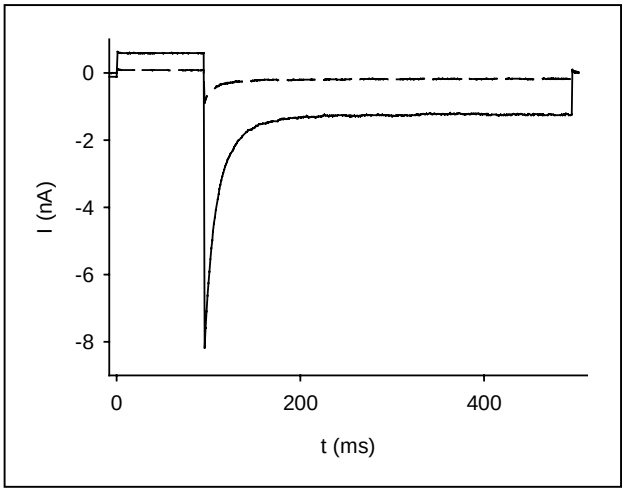


Abb.3.20: Stromblockade durch externe Applikation von 1 mM Zn^{2+}

Stromantworten des WT vor (—) und nach (--) externer Applikation von 1 mM Zn^{2+} auf ein Pulsprotokoll, das das Membranpotential der Zelle zuerst für 100 ms auf +50 mV und dann für 400 ms auf –125 mV hält.

Wie Abb.3.21 zeigt, entspricht das Ausmaß der Zn^{2+}-Blockade bei den Mutanten C179A, C271A und C481A mit ~ 83 % Stromreduktion der des Wildtyps. Bei C546A werden die Ausgangsströme dagegen nur um 17 % reduziert, die Blockade geht faßt völlig verloren. Eine ebenfalls signifikante, jedoch wesentlich geringere Abnahme der Zn^{2+}-Blockade ist bei den Mutanten C242A und C254A zu beobachten. Hier werden die Ströme durch 1 mM Zn^{2+} um 66 – 67 % verringert.

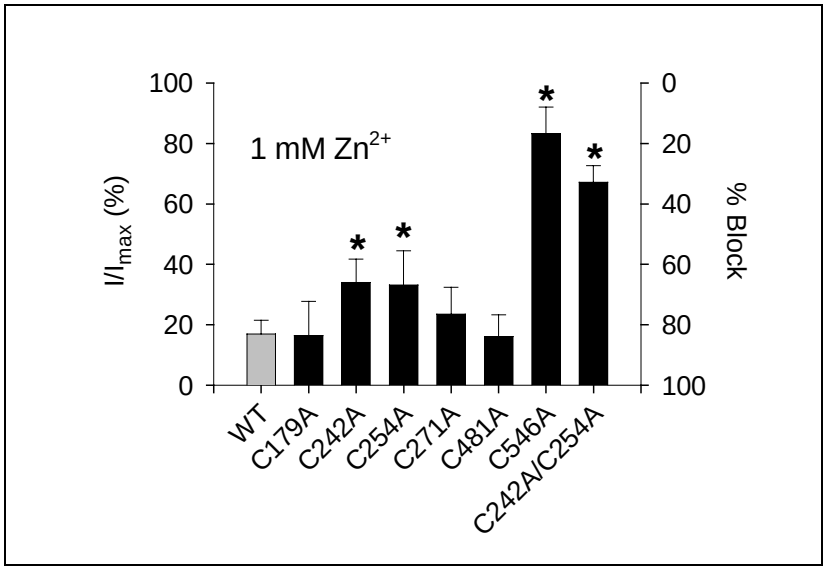


Abb.3.21: Blockade der Cysteinmutanten durch 1 mM externes Zn^{2+}

Auf der linken Achse ist die maximale Stromreduktion in Form des verbleibenden Stroms bei +50 mV dargestellt, wobei die maximale Amplitude vor Applikation von Zn^{2+} gleich 100 % gesetzt wird. Auf der rechten Achse ist das Ausmaß des Blocks dargestellt; * signifikante Abweichung, $n \geq 4$.

3.4.4. Die Doppelmutante C242A/C254A

Da Zn^{2+}-Ionen in vielen Fällen mit mehreren Bindungspartnern interagieren und ein Hillkoeffizient von 2,6 mindestens zwei Bindungspartner für die Zn^{2+}-Blockade der hClC-1 Kanäle fordert, wurde zusätzlich eine Mutante hergestellt, bei der sowohl C242 als auch C254 gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Die elektrophysiologische Charakterisierung dieser Doppelmutante (Abb.3.22) zeigt, daß auch der gemeinsame Austausch dieser Aminosäuren keinen Einfluß auf die Funktion des Chloridkanals hat. Auch hier ist die maximale Stromamplitude (I_{max} = -12.5 ± 7.2 nA) ebenso wie das Umkehrpotential (E_{rev} = 6.35 ± 0.4 mV) gegenüber dem WT nicht signifikant verändert. Die Parameter der relativen Offenwahrscheinlichkeit $V_{1/2}$ = -68.37 ± 2.3 mV und k_v = -19.88 ± 1.0 mV entsprechen ebenfalls denen des Wildtyps.

Nach Zugabe von 1 mM Zn^{2+} werden die Ströme dieser Doppelmutante jedoch nur um 33 % verringert. Die Zn^{2+}-Blockade ist bei C242A/C254A also wesentlich geringer als bei den Einzelmutanten C242A und C254A (Abb.3.21).

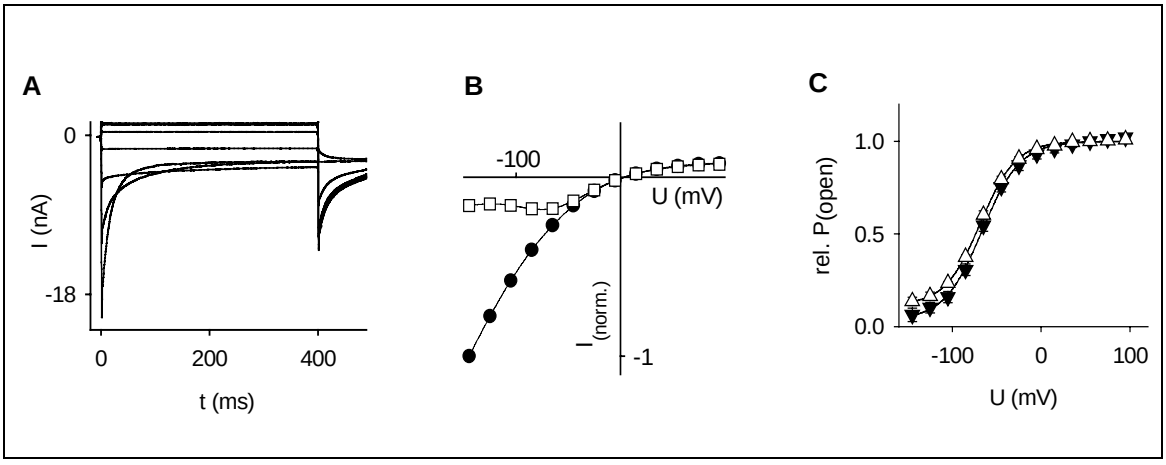


Abb.3.22: Elektrophysiologische Charakterisierung der Doppelmutante C242A/C254A

A, Stromantwort auf das Standard-Pulsprotokoll; B, Spannungsabhängigkeit der instantanen (●) und späten (□) Stromamplituden zu Beginn und am Ende der Testpulse, normalisiert auf den Wert der maximalen Amplitude bei –145 mV, n = 9; C, Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit von C242A/C254A (△), n = 7 im Vergleich zum WT (▼), n = 9. Die durchgezogenen Linien stellen die Angleichung durch eine Boltzmann-Funktion dar.

3.4.5. Konzentrationsabhängigkeit der Zn^{2+}-Blockade

Um die Reduktion der Zn^{2+}-Blockade bei den Mutanten C242A, C254A und C546A genauer zu verifizieren, wurde ihre Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Hierzu wurde bei den drei Einzelmutanten sowie bei der Doppelmutante C242A/C254A die durch verschiedene Zn^{2+}-Konzentrationen (0,01 mM bis 4,0 mM) verursachte Stromreduktion bestimmt.

Wie Abb.3.23 zeigt, ist auch hier eine deutlich geringere Sensitivität der Mutanten gegenüber Zn^{2+} zu erkennen. Während beim Wildtyp ~ 200 µM Zn^{2+} ausreichen, um eine halbmaximale Reduktion der Ströme hervorzurufen, werden bei den Mutanten C242A und C254A ~ 700-800 µM Zn^{2+} benötigt. Bei der entsprechenden Doppelmutanten sind es sogar ~1200 µM. Für C564A ist der IC_{50}-Wert mit ~ 1900 µM am höchsten.

Mit den Cysteinen C242, C254 und C546 konnten also drei Aminosäuren identifiziert werden, die als Bindungspartner an der Stromblockade durch extrazellulär appliziertes Zn^{2+} beteiligt sind.

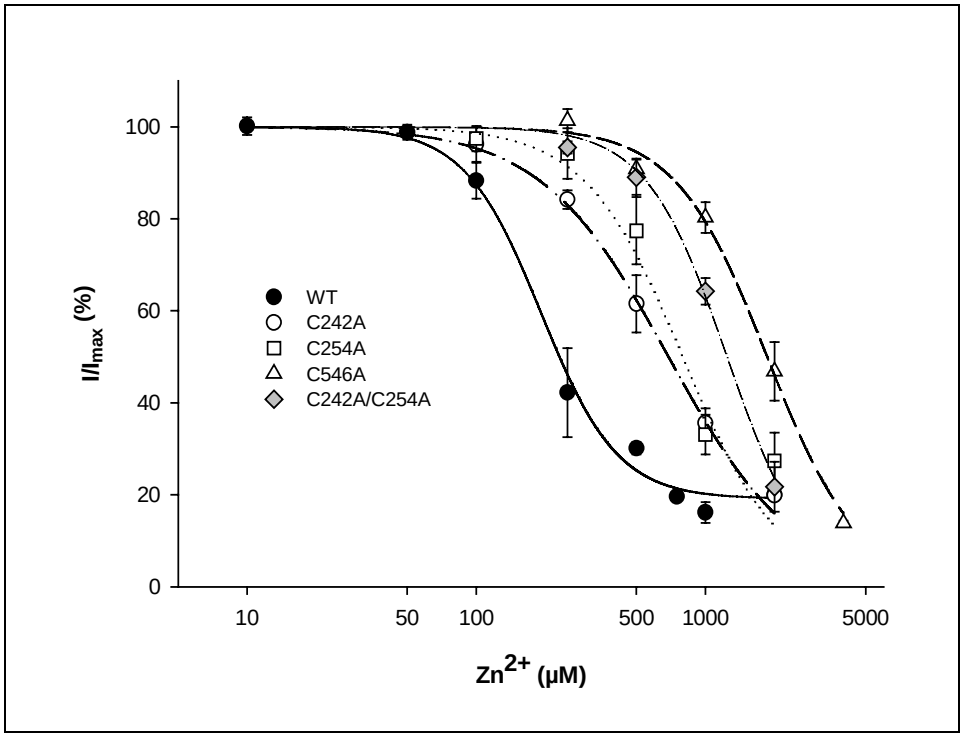


Abb.3.23: Konzentrationsabhängigkeit des Zn^{2+}-Blocks

Abhängigkeit der Stromamplituden (bei +50 mV) der einzelnen Cysteinmutanten von der externen Zn^{2+}-Konzentration; n = 1-11.

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, verschiedenen Linkerregionen des humanen skelettmuskulären Chloridkanals hClC-1 eine extra- bzw. intrazelluläre Lokalisation zuzuweisen und damit weitere experimentelle Grundlagen für das zum Teil sehr kontrovers diskutierte Topologiemodell dieses Kanals zu schaffen.

In der Literatur ist eine Vielzahl von Methoden zur Untersuchung der Topologie eines Transmembranproteins beschrieben (Traxler *et al.*, 1993). Hierzu gehören u.a. Glykosylierungsstudien, das „Cysteine Scanning“, „Protease Protection Assays“ und die Lokalisierung von Transmembranlinkern mit Hilfe von sequenzspezifischen oder epitopspezifischen Antikörpern. Alle diese Methoden besitzen Vor- und Nachteile und haben in einigen Fällen auch zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Deshalb ist es für die Erstellung eines Topologiemodells sehr wichtig, aus möglichst vielen, unterschiedlichen Studien Informationen zu sammeln.

4.1. Lokalisierung von Transmembranlinkern des hClC-1 mit Hilfe spezifischer Antikörper

In dieser Arbeit sollte die Lokalisation verschiedener Transmembranlinker u.a. mit Hilfe von Antikörpern bestimmt werden. Im Gegensatz zu *in vitro* Studien, wie sie in der Topologieuntersuchung von Schmidt-Rose & Jentsch (1997) gemacht wurden, erfolgt bei dieser Methode die Lokalisationsbestimmung in einem eukaryotischen Expressionssystem, so daß weitgehend physiologische Bedingungen gewährleistet sind. Außerdem bleibt die funktionelle Form des Kanalproteins erhalten.

Zur Durchführung wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen sollten sequenzspezifische Antikörper, die bestimmte Linkerregionen des Kanalproteins erkennen, selbst hergestellt werden. Zum anderen wurden in verschiedene Regionen des Kanals antigene Epitope eingebaut, die von kommerziell erhältlichen Antikörpern erkannt werden. Die Verwendung sequenzspezifischer Antikörper hat den Vorteil, daß zur Lokalisationsbestimmung der Wildtypkanal verwendet werden kann und so die Erhaltung der Topologie sichergestellt ist. Die Erfolgschancen der Peptidimmunisierung zur Herstellung solcher

Antikörper lassen sich jedoch schlecht vorhersagen. Anders sieht es beim Einbau antigener Epitope aus. Hier stellen die Antikörper keinen kritischen Punkt dar, die Insertionen können aber zu drastischen Topologieveränderungen führen.

4.1.1. Herstellung sequenzspezifischer Antikörper

Der Versuch, die Lokalisation der Transmembranlinker des hClC-1 mit Hilfe sequenzspezifischer Antikörper zu bestimmen, blieb erfolglos. Es gelang nicht, die benötigten Antikörper herzustellen. Zwar zeigten vier der durch die Peptidimmunisierung von Hühnern erhaltenen Antikörperfraktionen im ELISA eine erhöhte Immunoreaktivität, deren Spezifität ließ sich jedoch durch Western Blot Analysen bzw. Immunofluoreszenzfärbungen nicht bestätigen.

Eine Ursache für den fehlenden Erfolg der Peptidimmunisierung könnte die Auswahl der Proteinabschnitte gewesen sein. Obwohl es Anderer und Schlumberger bereits 1966 gelang, mit Hilfe eines synthetischen Peptids Antikörper gegen das native Hüllprotein des Tabakmosaikvirus herzustellen (Anderer & Schlumberger, 1966) und die Peptidimmunisierung seit den achtziger Jahren zu den Standardmethoden der Biologie gehört (Walter, 1986), beruht die Auswahl geeigneter Peptide immer noch weitgehendst auf empirischen Erkenntnissen. Zusätzlich war die Auswahlmöglichkeit für die Peptidsequenzen dadurch sehr eingeschränkt, daß die hydrophilen Transmembranlinker des ClC-1 häufig nur wenige Aminosäuren umfassen.

Da nur Peptidsequenzen auf der Oberfläche eines Kanalproteins für Antikörper zugänglich sind, ist ein hydrophiler Charakter der ausgewählten Peptide eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Antikörperherstellung gegen derartige Proteine. Hydrophilie ist jedoch keine Garantie für eine erfolgreiche Immunisierung. Welche zusätzlichen Eigenschaften einer Peptidsequenz eine Rolle für ihre Immunogenität spielen, ist unbekannt. Für bestimmte Proteinabschnitte des Myoglobins, des Lysozyms und der Hülle des Tabakmosaikvirus wurde ein Zusammenhang zwischen der Flexibilität der Konformation und der Immunogenität beschrieben. (Westhof *et al.,* 1984). Dieser Befund ließ sich jedoch nicht verallgemeinern. Sicherlich spielt auch das Trägermolekül eine wichtige Rolle bei der Immunogenität. Die Verwendung von KLH ist dabei jedoch eine sehr gängige Standardmethode.

Ein weiterer Grund für den fehlenden Erfolg könnte bei den verwendeten Versuchstieren liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunisierung an Hühnern durchgeführt, da die Immunantwort eines Tieres um so stärker ausfallen soll, je entfernter die phylogenetische Verwandtschaft zwischen ihm und der Spezies ist, aus der das verwendete Antigen stammt (Walter, 1986). Trotzdem konnte nicht einmal gegen den C-Terminus des hClC-1 eine Immunantwort induziert werden. Normalerweise ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, mit Peptiden, deren Sequenz dem N- oder C-Terminus eines Proteins entspricht, eine gute Immunantwort zu erhalten (Walter, 1986). In Kaninchen konnten C. Gurnett *et al.* (1995) mit einem Peptid, dessen Aminosäuresequenz P567 entspricht, erfolgreich spezifische Antikörper gegen den C-Terminus des ClC-1 herstellen. Möglicherweise wäre es also erfolgversprechender gewesen, Kaninchen den Hühnern vorzuziehen. Unabhängig von der Spezies bestehen aber auch von Tier zu Tier Unterschiede in der Fähigkeit, auf ein bestimmtes Antigen mit einer adäquaten Immunantwort zu reagieren. So war die Immunisierung von nur zwei Tieren pro Peptid vielleicht nicht ausreichend und das Immunisierungsprotokoll hätte eventuell besser auf die Tiere abgestimmt werden müssen. Als großes Problem bei der Antikörpergewinnung aus Hühnereiern erwies sich außerdem die Tatsache, daß die Legeleistung der immunisierten Tiere großen Schwankungen unterlag. Einige Antikörperfraktionen lagen deshalb nur in sehr geringen Mengen und zusätzlich schlechter Aufreinigungsqualität vor. Dies führte zu dem Schluß, daß die Immunisierung von Hühnern eine Methode darstellt, die noch nicht ausreichend etabliert ist.

Weshalb vier Antikörperfraktionen im ELISA eine erhöhte Immunoreaktivität zeigen, die jedoch im Western Blot bzw. bei Immunofluoreszenzfärbungen nicht reproduzierbar ist, kann zwei Gründe haben. Da die Bindung der Antikörper an das entsprechende Peptid im ELISA nur bei geringen Verdünnungen der Antikörperfraktionen erfolgte, ist es fraglich, ob es sich wirklich um spezifische Signale handelt. Ist die Bindung an das Peptid jedoch spezifisch, muß dies nicht zwangsläufig bedeuten, daß der Antikörper die entsprechende Sequenz auch im Western Blot oder der Immunofluoreszenzfärbung erkennt. Eine bestimmte Aminosäuresequenz kann unter Umständen als Peptid eine völlig andere Konformation einnehmen als im denaturierten bzw. nativen Protein, so daß das Epitop von den Antikörperfraktionen nur in seiner Form als Peptid erkannt wird, und nicht als Bestandteil eines Proteins (Walter, 1986).

4.1.2. Epitopinsertion durch sequenzspezifische Mutagenese

Die sequenzspezifische Mutagenese unter Verwendung des Quik-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit erwies sich als hervorragendes Hilfsmittel, um Veränderungen in die cDNA Sequenz des Chloridkanals einzubringen. Die Methode ermöglicht eine Vielzahl von Manipulationen wie den Austausch von Aminosäurecodons, den Einbau von zusätzlichen Restriktionsschnittstellen und die Insertion bzw. Deletion von Nukleotidsequenzen. Sie konnte deshalb nicht nur erfolgreich für den Austausch von Aminosäurecodons eingesetzt werden, sondern auch für den Einbau der verschiedenen antigenen Epitope.

Neben der großen Flexibilität ist das seltene Auftreten ungewollter Mutationen ein weiterer Vorteil dieser Methode. Da das Template bei der Mutagenesereaktion nur linear amplifiziert wird, fallen Lesefehler der Polymerase in geringerem Maße ins Gewicht, als bei Methoden, die auf PCR basieren und solche Lesefehler in exponentieller Weise amplifizieren.

Für die Insertion längerer Nukleotidabschnitte (flag-Epitop) wurde die eigentliche Methode etwas abgewandelt (siehe Abschnitt 3.2.1). Dadurch verringerte sich zwar die Effizienz der Reaktion, jedoch in einem Ausmaß, das weiterhin ein effektives Arbeiten ermöglichte. Die im Fall des HSV-Epitops gewählte Strategie, das Epitop in zwei Schritten einzubauen, umgeht diesen Effizienzverlust durch das Einfügen von Restriktionsschnittstellen, in die anschließend das Epitop in Form eines synthetischen Oligonukleotiddimers inseriert werden kann. Für den Einbau der Restriktionsschnittstellen müssen nur wenige Basen ausgetauscht werden, was mit der ursprünglichen und effizienteren Methode möglich ist. Außerdem können in die Schnittstellen verschiedene, beliebig lange Nukleotidsequenzen eingebaut werden. Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß ein zweiter Schritt, der der Ligation, notwendig ist.

4.1.3. Expression der flag-Epitop-Mutanten

Die einzelnen Insertionskonstrukte konnten erfolgreich in tsA201 Zellen exprimiert werden, wobei die Menge an translatiertem Kanalprotein von Mutante zu Mutante sehr unterschiedlich war. Dies kann mehrere Ursachen haben.

Zum einen können die einzelnen Insertionen unterschiedliche Effekte auf die Translationseffizienz haben, zum anderen könnten sie aber auch den Proteinabbau fördern. Eine weite-

re Möglichkeit besteht darin, daß nicht die Insertion die Ursache für den unterschiedlichen Proteingehalt ist, sondern Mutationen in regulatorischen Elementen innerhalb des Plasmidvektors, die während der Mutagenesereaktion durch Lesefehler der Polymerase entstehen können. Bei der Überprüfung der Mutagenese wären solche Veränderungen nicht aufgefallen, da nur die modifizierten Bereiche innerhalb des Chloridkanals sequenziert wurden. Um dieses Problem zu umgehen, wurden mit Ausnahme von D1/2flag stets mehrere unabhängige Klone hergestellt und untersucht.

4.1.4. Funktionalität der flag-Epitop-Mutanten

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung der Mutanten zeigte sich, daß die Epitopinsertion in einigen Bereichen des Kanals dazu führt, daß keine Chloridströme mehr meßbar sind, obwohl das Kanalprotein in Western Blot Analysen nachgewiesen werden kann.

Ein solcher Funktionsverlust kann dadurch verursacht werden, daß die Epitope möglicherweise in funktionelle Abschnitte des Kanals eingebaut wurden und dadurch die Porenregion oder den Schließmechanismus behindern. So ist zu erwarten, daß die Insertion eines Epitops, das aus acht Aminosäuren besteht, von denen sieben eine Ladung tragen, in unmittelbarer Nähe der Porenregion zu einer sterischen oder elektrostatischen Behinderung der Chloridströme führt. Diese Annahme könnte für die beiden nicht-funktionellen Konstrukte D3/4flag und D5/6flag zutreffen, deren Insertionen an den Positionen K231 und F297 erfolgten. „Cysteine Scanning“ Experimente, die in der Arbeitsgruppe von C. Fahlke gemacht wurden (Fahlke *et al.*, 1997d), weisen darauf hin, daß die benachbarten Aminosäuren 230-237 und 265-290 einen Teil der Pore bilden.

Die Epitopinsertion kann außerdem dazu führen, daß das Kanalprotein nicht oder nicht korrekt in die Membran inseriert. So ist zu erwarten, daß das Einfügen eines hydrophilen Epitops in eine Transmembrandomäne die Struktur eines Proteins sehr stark verändert bzw. zerstört (Manoil & Traxler, 1995). Besonders schwierig war es deshalb, in der sehr großen hydrophoben Region D9-D12 eine geeignete Position für die Insertion des Epitops zu finden. In diesem wenig erforschten Bereich sind die hydrophilen Linkerregionen nur sehr kurz und die Gefahr groß, das Epitop in eine Transmembrandomäne einzubauen. Mögli-

cherweise ist dies die Ursache für den Funktionsverlust der Insertionsmutanten D9/10flag und D10/11flag.

Eine weitere Möglichkeit für den Funktionsverlust der Kanäle ist die Tatsache, daß die fünf negativ geladenen Aspartatreste des flag-Epitops die „positive-inside“ Regel (von Heijne, 1989, 1992) verletzen könnten. Diese Regel besagt, daß die Orientierung von Transmembrandomänen häufig durch die bevorzugt cytoplasmatische Lokalisierung positiv geladener Aminosäurereste am intrazellulären Ende dieser Domänen festgelegt wird. Werden an einer solchen Stelle zusätzlich negative Aminosäurereste eingebaut, kann es zu einer gestörten Lokalisierung kommen.

In einigen Linkerregionen führt die Epitopinsertion zwar nicht zum Verlust der Kanalfunktion, ruft jedoch Veränderungen der Kanaleigenschaften hervor. Bei D1/2flag geht eine starke Reduktion der maximalen Amplitude mit einem sehr geringen Gehalt an Kanalprotein in den Zellen einher, an denen die Ströme gemessen wurden. Die maximale Amplitude bei Ganzzellableitungen hängt von drei Parametern ab, der Anzahl von Kanälen, der Einzelkanalamplitude und der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle. Aufgrund der Tatsache, daß der Gehalt an Kanalprotein in den Zellen sehr gering ist und die relative Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle nur in ihrer Steigung signifikante Unterschiede zum Widtyp zeigt, ist die Ursache für die Stromreduktion von D1/2flag sehr wahrscheinlich die verminderte Anzahl der Kanäle.

Schwer zu interpretieren ist die veränderte Deaktivierungskinetik der Mutanten D6/7flag und D11/12flag, da für den hClC-1 kein allgemein anerkanntes Schaltmodell existiert. Eine Aktivierung bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen wie sie D6/7flag zeigt, sowie eine biphasische Offenwahrscheinlichkeit, die im negativen und positiven Bereich ihre Maxima besitzt, wurde bereits für die zwei Myotoniemutanten D136G (Fahlke *et al.*, 1995) und G499R (Zhang *et al.*, 1996) beschrieben. Auch der WT Kanal antwortet unter bestimmten Bedingungen, genauer gesagt bei einem externen pH von 5,5, im negativen Spannungsbereich mit einer Aktivierung (Rychkov *et al.*, 1996). Welche Ursache diesen Phänomenen zugrunde liegt, konnte jedoch in keinem der Fälle geklärt werden. Die Deaktivierungskinetik der Mutante D11/12 entspricht, mit Ausnahme des unveränderten Umkehrpotentials, dem Verhalten des WT Kanals in Anwesenheit von externem Iodid, einem Anion mit sehr geringer Permeabilität (Fahlke *et al.*, 1997b, Rychkov *et al.*, 1998).

4.1.5. Einbau des HSV-Epitops

Um auszuschließen, daß die Beschaffenheit des Epitops, sprich Länge, Ladung oder Aminosäurezusammensetzung, die Funktionalität des Kanals beeinflußt, wurde an vier Positionen, bei denen die Insertion des flag-Epitops zum Funktionsverlust bzw. zu Veränderungen der Kanaleigenschaften führt, das HSV-Epitop QPELAPEDPED eingebaut. Im Gegensatz zum flag-Epitop tragen hier nur fünf der 11 Aminosäuren eine Ladung.

Doch wie bereits die Insertion des flag-Epitops führt auch der Einbau des HSV-Epitops in den Bereichen D3/4 und D5/6 zum Funktionsverlust der Kanäle. Ein solcher Funktionsverlust wurde auch in der Arbeit von Schmidt-Rose & Jentsch (1997) beobachtet, wo eine Glykosylierungsstelle in dieselben Linkerregionen eingebaut wurde. Dies deutet darauf hin, daß diese Proteinabschnitte eine wichtige Funktion, möglicherweise die der Porenregion, besitzen (Fahlke *et al.*, 1997a,d, Steinmeyer *et al.*,1994) und deshalb bereits geringe Veränderungen ihrer Aminosäuresequenz zum Funktionsverlust führen.

Auch die Insertion des HSV-Epitops in der Region D6/7 führt zu denselben Veränderungen der Kanaleigenschaften wie der Einbau des flag-Epitops. Beide Mutanten antworten auf hyperpolarisierende Spannungssprünge mit einer Aktivierung, wobei diese bei D6/7HSV ausgeprägter ist als bei D6/7flag. Dies wird in der größeren Differenz zwischen instantanem und spätem Strom deutlich (vergleiche Abb.3.8 und Abb.3.11). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Mutanten betrifft die relative Offenwahrscheinlichkeit. Während bei der flag-Epitop-Mutante stets fast die Hälfte der Kanäle geöffnet ist, liegen bei der HSV-Epitop-Mutante im Minimum der relativen Offenwahrscheinlichkeit wesentlich mehr Kanäle im geschlossenen Zustand vor. Da die Verhaltensweisen der beiden Mutanten jedoch qualitativ gleich sind, kann man auch hier davon ausgehen, daß die Insertion an sich, und nicht die Beschaffenheit des Epitops, Ursache für das besondere Schaltverhalten der Kanäle ist.

Anders scheint es in der Linkerregion D1/2. Hier zeigt die HSV-Epitop-Mutante keine signifikanten Unterschiede zum WT, während bei D1/2flag die maximale Amplitude sehr stark reduziert ist und in transfizierten tsA201 Zellen nur ein sehr geringer Gehalt an translatiertem Kanalprotein zu finden ist. Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 erwähnt, kann bei D1/2flag jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Mutationen im Plasmidvektor selbst,

die während der Mutagenesereaktion durch Lesefehler der Polymerase entstehen können, für die geringe Menge an translatiertem Kanalprotein verantwortlich sind. In diesem Fall wäre auch hier die Beschaffenheit des Epitops von keiner Relevanz.

4.1.6. Lokalisation der Epitope

Eine Veränderung der Topologie ist ein sehr drastischer Eingriff in die Struktur eines Proteins und sollte zwangsläufig zu dessen Funktionsverlust führen (Manoil & Traxler, 1995). Deshalb wurde trotz der veränderten Kanaleigenschaften einiger Mutanten davon ausgegangen, daß D1/2HSV (D1/2flag), D4/5flag, D6/7flag (D6/7HSV), D8/9flag und D11/12flag funktionelle Kanäle darstellen, deren Topologie weitgehend unverändert ist. Von der Lokalisation der Epitope wurden so Rückschlüsse auf die Lokalisation der entsprechenden Kanalabschnitte im WT gezogen.

Werden Zellen bei einer Immunofluoreszenzfärbung vor Permeabilisierung ihrer Zellmembran mit Antikörpern behandelt, so können die Antikörper die Membran nicht passieren und erkennen nur solche Sequenzen, die auf der Oberfläche der Zellen liegen (Canfield & Levenson, 1993; Kast *et al.*, 1995). Dies war der Fall für die Epitope in den Regionen D1/2, D6/7 und D8/9, und es wurde daraus geschlossen, daß auch beim WT die entsprechenden Linker auf der extrazellulären Seite der Membran liegen.

Dieses Ergebnis bestätigt das aktuelle Topologiemodell nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997), das die Linkerregionen D1/2, D6/7 und D8/9 ebenfalls auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert. Die Position von D8/9 wird zusätzlich dadurch untermauert, daß N430 in mehreren Studien als Glykosylierungsstelle des Kanals identifiziert wurde (Kieferle *et al.*, 1994, Middleton *et al.*, 1994).

Die Epitope in den Regionen D4/5 und D11/12 werden dagegen erst dann von ihren Antikörpern erkannt, nachdem die Zellmembran mit Triton® X100 behandelt wurde. Dasselbe gilt für den im Cytoplasma lokalisierten C-Terminus des Kanals, der ebenfalls erst nach Permeabilisierung der Zellmembran von seinem sequenzspezifischen Antikörper erkannt wird. Dies scheint für eine intrazelluläre Lokalisation dieser Epitope und damit auch der Linkerregionen D4/5 und D11/12 zu sprechen. Trotzdem kann durch die Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, daß die Epitope auch auf der extrazellulären Seite des Kanalproteins lokalisiert sein können. Befindet sich ihre Insertionsstelle nicht exponiert an der

Oberfläche des Proteins, sondern an einer für den Antikörper unzugänglichen Engstelle, wie z.B. dem Eingang der Pore, so kann das Epitop von den Antikörpern trotz extrazellulärer Lokalisation nicht erkannt werden. Bei der Solubilisierung der Membran durch Triton® X100 könnte die Struktur der Engstelle jedoch aufgelöst und dadurch der Zugang für die Antikörper ermöglicht werden.

Eine intrazelluläre Lokalisation der beiden Transmembranlinker D4/5 und D11/12 steht im Widerspruch zu der Studie von Schmidt-Rose & Jentsch (1997), die die beiden Regionen extrazellulär lokalisiert. Bezüglich D4/5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung jedoch uneinheitlich. Während die Glykosylierungsstudie, der in diesem Fall größere Relevanz eingeräumt wurde, eine extrazelluläre Lokalisation von D4/5 zeigt, ergibt der „Protease Protection Assay“ eine intrazelluläre Lokalisation. Letztere wird auch von dem Alternativmodell nach Fahlke *et al.* (1997d) gefordert. In der Region D11/12 konnte von Schmidt-Rose & Jentsch (1997) gezeigt werden, daß L549 nach dem Austausch gegen ein Cystein mit extrazellulär appliziertem MTSES reagieren kann. MTSES ist eine sulfhydrylreaktive Substanz, die die Zellmembran nicht passieren kann, was recht deutlich für eine extrazelluläre Lokalisation der Aminosäureposition L549 spricht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch den Einbau antigener Epitope den Transmembranlinkern D1/2, D6/7 und D8/9 eine extrazelluläre Lokalisation zugewiesen werden konnte, während die Ergebnisse für die Linker D4/5 und D11/12 keine eindeutige Zuordnung erlauben. Die Insertion der Epitope in weiteren Bereichen des Kanals führte zum Funktionsverlust der Proteine und konnte deshalb nicht zur Bestimmung der Lokalisation dieser Regionen herangezogen werden.

4.2. Der hydrophile Abschnitt D4/5 und die Bildung der Porenregion

Der Kanalabschnitt zwischen den Transmembrandomänen D3 und D5 des ClC-1 wird in mehreren Arbeiten als mögliche Porenregion diskutiert (Fahlke *et al.*, 1997a, Steinmeyer *et al.*, 1994). Zwei sehr konservierte Regionen am N-terminalen Ende des Transmembranlinker D3/4 und in der Mitte der Transmembrandomäne D5 scheinen dabei den Durchgang der Pore zu bilden und sind an der Vermittlung der Ionenselektivität beteiligt (Fahlke *et al.*,

1997a, 2000). Genauere Details über die Pore sind jedoch, auch aufgrund fehlender Topologiedaten, nicht bekannt.

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen der Mutante D4/5flag in dieser Arbeit schließen die unmittelbare Umgebung der Aminosäureposition P260 von der direkten Bildung der Pore aus. P260 liegt in der Mitte des Transmembranlinker D4/5 und damit in der potentiellen Porenregion. Von der Insertion eines Epitops, das aus mehreren geladenen Aminosäuren besteht, ist in unmittelbarer Nähe der Porenregion eine sterische oder elektrostatische Behinderung der Chloridströme zu erwarten. Da die Insertion des flag-Epitops an der Position P260 jedoch keinen Einfluß auf die Chloridströme des hClC-1 hat und auch die Ionenselektivität ($Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$) des Kanals nicht verändert, kann dieser Bereich nicht direkt an der Porenbildung beteiligt sein.

Die veränderte Deaktivierungskinetik von D4/5flag ist schwer zu interpretieren, da für den hClC-1 kein allgemein anerkanntes Schaltmodell existiert. In Anlehnung an das „ball-and-chain“ Modell von Fahlke *et al.* (1995, 1996, 1997b) bedeutet die bei der Mutante zu beobachtende Reduktion der Amplitude der langsamen Deaktivierungskomponente (A_2), daß das Kanalprotein nur sehr selten den Zustand der langsamen Deaktivierung einnimmt. Dies könnte dadurch hervorgerufen werden, daß die zusätzlichen Aminosäurereste des Epitops die dabei auftretenden Konformationsänderungen entweder sterisch oder elektrostatisch behindern. Es scheint, als könne der Kanal nur noch in der Konformation der schnell deaktivierenden und der nicht-deaktivierenden Form existieren, während der langsam deaktivierende Zustand fast gar nicht vorkommt. Unwahrscheinlich ist es, daß die Effekte der Insertion das Tor selbst betreffen, da nur die langsame und nicht die schnelle Zeitkonstante verändert ist.

Die Ionenselektivität des ClC-1 erfolgt nicht durch den Ausschluß von Ionen aufgrund ihres Radius, sondern wird durch mindestens zwei Anionenbindungsstellen innerhalb der Pore des Kanals vermittelt (Fahlke *et al.*, 1997a, 1996, Rychkov *et al.*, 1998). Die Bindungsstellen zeigen unterschiedliche Bindungseigenschaften und unterliegen unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Da die Anionen Cl^-, Br^-, NO_3^- und I^- alle qualitativ ähnliche Effekte auf die (De)Aktivierung der Kanäle haben, geht man davon aus, daß sie auch in ähnlicher Weise mit den Bindungsstellen interagieren. Bei der Überprüfung der Ionenselektivität der Mutante D4/5flag zeigte sich, daß weder die Qualität der Effekte dieser

Anionen auf die Deaktivierung noch die Umkehrpotentiale verändert sind. Deshalb können die zusätzlichen Aminosäuren des Epitops keinen Einfluß auf die Bindungsstellen in der Pore haben und auch nicht in deren räumlichen Nähe lokalisiert sein.

Bei der Selektivitätsuntersuchung fällt auf, daß der mit abnehmender Permeabilität der Anionen zunehmende Verlust des Deaktivierungsverhaltens bei der Mutante nicht so stark ausgeprägt ist wie beim WT. Dies kommt daher, daß die im Vergleich zum WT stark erhöhte Amplitude der schnellen Deaktivierungskomponente (A_1) von D4/5flag nur um denselben Wert reduziert wird wie die des WT. Zusätzlich wird die im Vergleich zum WT bereits sehr kleine Amplitude der langsamen Deaktivierung (A_2) von D4/5flag kaum noch weiter reduziert. Dies führt in der Summe zu einem im Vergleich zum WT geringeren Verlust des Deaktivierungsverhaltens von D4/5flag in Abhängigkeit der vorhandenen Anionen.

Die detaierten elektrophysiologischen Untersuchungen der Mutante D4/5flag führen zu dem Schluß, daß die unmittelbare Umgebung der Aminosäure P260 nicht direkt an der Porenbildung beteiligt sein kann, obwohl benachbarte Aminosäuren in anderen Studien als wichtige Porenabschnitte identifiziert wurden (Fahlke *et al.*, 1997d).

4.3. Identifizierung extrazellulärer Zn^{2+}-Bindungsstellen

Die Applikation von externem Zn^{2+} führt beim hClC-1 zu einer Reduktion der Chloridströme um ~80 %, so daß der Reststrom nur noch etwa ein Fünftel des Ausgangsstroms beträgt (Kürz *et al.*, 1997). Um mögliche Bindungsstellen zu identifizieren, die diese Zn^{2+}-Blockade vermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit Kanäle hergestellt, bei denen verschiedene Cysteinreste gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die Mutanten stellen funktionelle Kanäle dar, deren elektrophysiologische Eigenschaften sich, mit Ausnahme der relativen Offenwahrscheinlichkeit von C179A, nicht vom WT unterscheiden. Es wurde deshalb davon ausgegangen, daß trotz des Aminosäureaustausches die Integrität der Kanalproteine erhalten blieb.

Bei den Mutanten C242A, C254A und C546A führt der Austausch der Cysteinreste zu einer Abschwächung der Zn^{2+}-Blockade, d.h. bei diesen Mutanten ist die Amplitude des verbleibenden Reststroms nach Zn^{2+}-Applikation deutlich größer als beim WT. Bei den

restlichen Mutanten hatte der Aminosäureaustausch keinen Einfluß auf die Zn^{2+}-Blockade. Daraus wurde geschlossen, daß die Cysteinreste C242, C254 und C546 an der Bindung von Zn^{2+} und damit an der Vermittlung der Stromblockade beteiligt sind. Dies wird zusätzlich durch die Dosis-Wirkungs-Kurve untermauert.

Um die im Gegensatz zu C546A wesentlich schwächeren Effekte der Mutanten C242A und C254A zusätzlich zu überprüfen, wurde eine Doppelmutante hergestellt, bei der beide Cysteine gleichzeitig gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die Zn^{2+}-Blockade war bei dieser Doppelmutante wesentlich schwächer als bei den Einzelmutanten, was zeigt, daß beide Cysteine an der Zn^{2+}-Bindung beteiligt sein müssen. Ob die drei identifizierten Cysteine gemeinsam eine Zn^{2+}-Bindungsstelle bilden oder ob sie unabhängig von einander Zn^{2+}-Ionen binden, kann jedoch nicht beantwortet werden.

Es ist bekannt, daß Zn^{2+}-Bindungsstellen häufig eine tetraedrische Geometrie aufweisen und die Zn^{2+}-Ionen dabei mit unterschiedlichen Bindungspartnern interagieren. Als Bindungspartner kommen Cysteine, Histidine und saure Aminosäuren in Frage (Tainer *et al.*, 1991). Deshalb wurden parallel zu dieser Arbeit in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe mögliche Histidinreste auf ihre Fähigkeit, Zn^{2+}-Ionen zu binden, überprüft. Die pH-Abhängigkeit der Zn^{2+}-Blockade des hClC-1 weist einen pK_a-Wert von 6,9 auf (Kürz *et al.*, 1999). Dieser pK_a-Wert deutet eher auf Histidinreste ($pK_a \approx 6\text{-}7$) als Bindungspartner der Zn^{2+}-Ionen hin, als auf Cysteinreste ($pK_a \approx 8\text{-}9$). Deshalb war es überraschend, daß bei der Untersuchung der Histidine keine zusätzlichen Aminosäurereste gefunden wurden, die zusammen mit den hier identifizierten Cysteinen die Zn^{2+}-Bindung vermitteln. Es ist jedoch möglich, daß der pK_a-Wert einer Aminosäure im Kontext eines Proteins deutlich verschoben wird.

In einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Kürz *et al.*, 1997) konnte gezeigt werden, daß durch die Zn^{2+}-Blockade lediglich die Amplitude der Chloridströme reduziert wird, während alle anderen Eigenschaften wie die Einwärtsrektifizierung und das charakteristische Deaktivierungsverhalten unverändert sind. Deshalb wurde vermutet, daß die Reduktion der Chloridströme dadurch verursacht wird, daß die Zn^{2+}-Ionen die Pore blockieren. Die als Zn^{2+}-Bindungspartner identifizierten Cysteinreste C242 und C254 liegen in einem Kanalabschnitt, der mit der Porenbildung in Zusammenhang gebracht wird (Fahlke *et al.*, 1997a,d, Steinmeyer *et al.*, 1994). Sie sind Teil des Segments D4, das sich in der potenti-

ellen Porenregion zwischen den Transmembrandomänen D3 und D5 befindet. Dieser Befund stützt die Hypothese, daß die Zn^{2+}-Ionen direkt die Pore blockieren und keine weiteren Mechanismen an der Stromreduktion beteiligt sind. Andererseits bedeutet ein direkter Porenblock, daß auch die Aminosäure C546 in einem porenbildenden Bereich des Kanals liegen muß.

Die Zn^{2+}-Blockade des hClC-1 wird nur durch externe und nicht durch interne Zn^{2+}-Applikation hervorgerufen (Kürz *et al.*, 1997). Dies bedeutet, die Cysteine C242, C254 und C546 müssen auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert sein. Dafür spricht auch, daß die Aminosäure L549, die in enger Nachbarschaft zu C546 liegt, in der Topologiestudie von Schmidt-Rose & Jentsch (1997) durch „Cysteine Scanning“ auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert wurde. Da die Zn^{2+}-Blockade des hClC-1 spannungsunabhängig ist und der Kanal eine anionenselektive Pore besitzt, erscheint es sehr unwahrscheinlich, daß die Zn^{2+}-Ionen den Kanal durchdringen können und so zu Bindungsstellen auf der intrazellulären Seite des Kanals oder im Lumen der Pore gelangen. In einer Arbeit am GABA-Rezeptor, einem Chloridkanal, der ebenfalls eine Sensitivität gegenüber Zn^{2+} zeigt, wird allerdings nicht ausgeschlossen, daß sich Zn^{2+}-Ionen in Form eines $(ZnCl)_4^{2-}$-Komplexes Zugang zum Lumen einer Anionenkanalpore verschaffen können (Wooltorton *et al.*, 1997).

Die Lokalisation der identifizierten Bindungsstellen ist besonders interessant in Bezug auf das Segment D4, in dem die beiden Cysteine C242 und C254 liegen. Die Lage von D4 wird derzeit noch sehr kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe um T. Jentsch sieht diese Domäne auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert (Jentsch *et al.*, 1995, Middleton *et al.*, 1994, Schmidt-Rose & Jentsch, 1997), während C. Fahlke davon ausgeht, daß dieses Segment die Membran durchquert und von der intrazellulären Seite zugänglich ist (Fahlke *et al.*, 1997a, 2000). Die Identifizierung der Cysteine C242 und C254 als Bindungsstellen für extern appliziertes Zn^{2+} sprechen für eine extrazelluläre Lokalisation der Domäne D4 und unterstützen damit das aktuelle Topologiemodell nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997). Eine extrazelluläre Lage von C242 und C254 ist dagegen sehr schwer mit den Befunden von Fahlke *et al.* in Einklang zu bringen, der mit Hilfe von „Cysteine Scanning“ Untersuchungen zeigt, daß die Aminosäuren P234, H237 und A244 sowie D265 und L267 nur von der intrazellulären Seite zugänglich sind (Fahlke *et al.*, 1997d).

Durch die Identifizierung der Cysteine C242, C254 und C546 als Bindungsstellen für extern appliziertes Zink wurde diesen Aminosäuren eine extrazelluläre Lokalisation in der Zellmembran zugewiesen. Dadurch konnten nicht nur neue Informationen zur Topologie des hClC-1 gewonnen werden, sondern auch die Hypothese untermauert werden, daß beim hClC-1 die Blockierung der Pore die Ursache für die Stromreduktion durch Zn^{2+}-Ionen ist. Die Beteiligung von C546 an diesem Porenblock deutet außerdem auf eine Beteiligung dieser Aminosäure an der Porenbildung hin.

4.4. Das Topologiemodell und mögliche Porenregionen

Erfolgreich konnte in dieser Arbeit die Lokalisation verschiedener Linkerregionen des humanen skelettmuskulären Chloridkanal hClC-1 bestimmt werden. Welche Konsequenzen haben diese Ergebnisse nun für das Topologiemodell des hClC-1?

Durch den Einbau antigener Epitope konnte eine extrazelluläre Lokalisation der Transmembranlinker D1/2, D6/7 und D8/9 eindeutig bestimmt werden. Dies steht im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über die Topologie des hClC-1 und bestätigt das aktuelle Topologiemodell nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997). Die Lage dieser Regionen kann somit als gesichert angesehen werden (Abb.4.1A).

Nicht so einfach sieht es mit der Lokalisierung der Cysteinreste C242 und C254 aus. Diese Aminosäuren liegen in der Domäne D4, einem Kanalabschnitt, über dessen Topologie noch sehr viel Unklarheit herrscht. Unter der Annahme, daß Zn^{2+} als zweiwertiges Kation nicht in der Lage ist, die Pore des anionenselektiven hClC-1 zu durchqueren, spricht die Identifizierung der Cysteine C242 und C254 als Bindungsstellen von extern appliziertem Zn^{2+} für eine extrazelluläre Lage von D4, und damit auch im Fall dieser Region für das derzeitig aktuelle Topologiemodell. In einer Arbeit von Fahlke *et al.* (1997d) wird allerdings gezeigt, daß die Aminosäuren P234, H237 und A244 sowie D265 und L267 nur von der intrazellulären Seite für sulfhydrylreaktive Substanzen zugänglich sind. Dies läßt sich im Grunde nicht mit einer extrazellulären Lage von C242 und C254 vereinbaren. Aus ihren Ergebnissen leiten Fahlke *et al.* das in Abb.4.1B dargestellte Alternativmodell der Kanalregion zwischen D3 und D5 ab. Die darin postulierte Lokalisation von D4 steht nicht nur im Konflikt mit einer extrazellulären Lokalisation der Aminosäuren C242 und C254, son-

dern auch mit der Lage des Transmembranlinkers D6/7, dessen extrazelluläre Lokalisation als weitgehend gesichert gilt. Um endgültige Klarheit über die Topologie dieser Region zu schaffen, sind deshalb weitere Untersuchungen notwendig, die eventuell einen Weg bereiten, der die beiden alternativen Topologiemodelle vereinen kann. Möglicherweise ist die Struktur der Region zwischen D3 und D5 sehr komplex und kann nicht einfach durch zwei oder drei Transmembrandomänen dargestellt werden, die die Zellmembran komplett durchqueren.

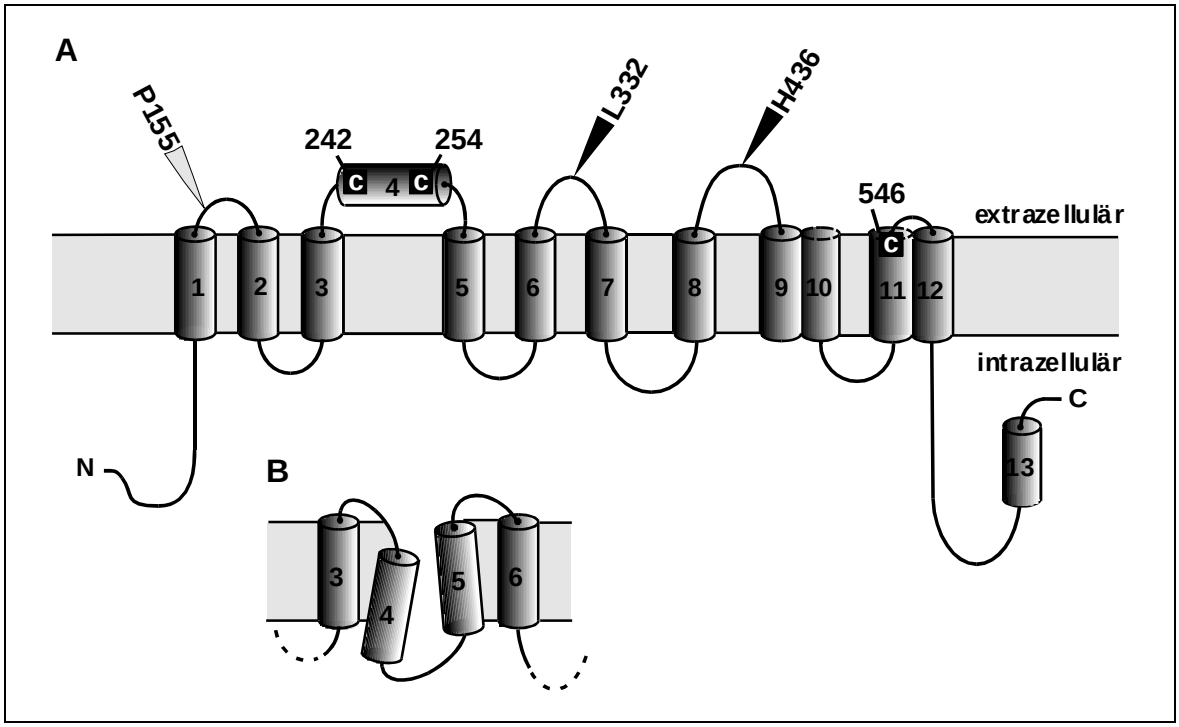


Abb.4.1: Das Topologiemodell des hClC-1

A, Aktuelles Topologiemodell des hClC-1 nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997). Durch Dreiecke sind die Epitopinsertionen gekennzeichnet (schwarz: flag-Epitop; grau: HSV-Epitop), mit deren Hilfe die Lokalisation der entsprechenden Kanalabschnitte in dieser Arbeit bestimmt werden konnte. Die Zahlen vor den Dreiecken geben die Aminosäureposition an, an der die Insertion erfolgte. Ebenfalls gekennzeichnet sind die Cysteinreste, die als Zn^{2+}-Bindungsstellen identifiziert wurden.
B, Alternativmodell der Region D3-D5 nach Fahlke *et al.* (1997d)

In einer weiteren Region, über deren Topologie sehr wenig bekannt ist, liegt die Aminosäure C546. Ihre extrazelluläre Lokalisation, die durch ihre Identifizierung als Bindungsstelle für extern appliziertes Zn^{2+} bestimmt wurde, erscheint recht eindeutig und wird dadurch untermauert, daß der benachbarten Aminosäure L549 in der Arbeit von Schmidt-

Rose & Jentsch (1997) ebenfalls eine extrazelluläre Lage zugewiesen wurde. Dieses Ergebnis stellt damit einen ersten Anhaltspunkt zur genaueren Erforschung der sehr großen hydrophoben Region D9-D12 dar. Dabei wird es u.a. zu klären sein, wieviele Transmembransegmente wirklich zwischen den extrazellulären Linkern D8/9 und D11/12 liegen.

Neben den Erkenntnissen über die Transmembrantopologie des hClC-1, liefert diese Arbeit auch Informationen über die potentielle Porenregion des Kanals. So konnte anhand der flag-Epitop-Mutante D4/5flag gezeigt werden, daß der Kanalabschnitt in unmittelbarer Nachbarschaft der Aminosäure P260 nicht direkt an der Bildung des Porendurchgangs beteiligt sein kann. Dies ist insofern überraschend, da P260 mitten in der potentiellen Porenregion des Kanals liegt und u.a. durch die Identifizierung der Zn^{2+}-Bindungsstellen C242 und C254, Aminosäuren in unmittelbarer Nähe von P260, mit der Porenbildung in Zusammenhang gebracht wird. Außerdem scheint die Transmembrandomäne D11 oder der Linker D11/12 an der Bildung der Pore beteiligt zu sein, da außer C242 und C254 auch C546 an der Vermittlung der Zn^{2+}-Blockade beteiligt ist. Geht man davon aus, daß bei der Zn^{2+}-Blockade die Reduktion der Chloridströme durch einen direkten Block der Pore verursacht wird, muß auch C546 in der Nähe der Pore lokalisiert sein.

Zusammenfassend kann man sagen, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen in vielen Punkten das derzeit aktuelle Topologiemodell (Abb.4.1A) nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997), so daß dieses Modell durch immer mehr experimentelle Ergebnisse gestützt wird. Trotzdem steht hinter der Topologie der zwei großen Kanalabschnitte D3-D5 und D9-D12 weiterhin ein Fragezeichen. Zwar spricht sehr viel für eine extrazelluläre Lokalisation der Domäne D4, ein Alternativmodell, das diese Domäne als Transmembransegment die Zellmembran durchqueren läßt, konnte jedoch nicht vollkommen entkräftet werden. Ein erster Ansatzpunkt zur Aufklärung der Topologie des sehr großen hydrophoben Bereichs D9-D12 konnte durch die Lokalisierung der Aminosäure C546 geliefert werden.

5. Zusammenfassung

Der Chloridkanal ClC-1 gehört zur Familie der ClC-Kanäle, einer Genfamilie, deren Mitglieder im gesamten Reich der Lebewesen vertreten sind und dort sehr unterschiedliche physiologische Funktionen übernehmen. Der ClC-1 ist ein Vertreter, der fast ausschließlich im Skelettmuskel von Säugetieren gefunden wird und für die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials der Muskelzellen verantwortlich ist. Ein Defekt im Gen dieses Chloridkanals ist die Ursache der Muskelerkrankung Myotonia congenita.

Im Gegensatz zur physiologischen Funktion ist die Topologie des ClC-1 und die damit eng verbundene Zuordnung von Struktur-Funktions-Beziehungen noch in sehr vielen Bereichen des Kanals ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die extra- bzw. intrazelluläre Lokalisation verschiedener Abschnitte des Kanalproteins zu bestimmen und somit weitere experimentelle Grundlagen für die Erstellung eines Topologiemodells für diesen Kanal zu schaffen.

In einem ersten Ansatz sollten polyklonale Antikörper hergestellt werden, die bestimmte Linkerregionen des Kanalproteins erkennen. Die Immunisierung mit sechs verschiedenen Peptiden, deren Sequenz diesen Linkerregionen entsprach, löste jedoch bei keinem der zur Antikörperproduktion eingesetzten Hühnern eine adäquate Immunantwort aus. Deshalb sollten in einem zweiten Ansatz Epitope für kommerziell erhältliche Antikörper in verschiedene Regionen des Kanalproteins eingebaut werden, um mit deren Hilfe die Lokalisation dieser Proteinabschnitte zu bestimmen.

Nachdem es gelungen war, eine molekularbiologische Methode zu etablieren, mit deren Hilfe kurze Aminosäuresequenzen in beliebige Positionen eines Proteins eingebaut werden können, wurde diese zur Insertion der Epitope benutzt. In einer Immunofluoreszenzfärbung wurde dann die Lokalisation der Epitope und damit auch die Lokalisation der Kanalabschnitte, in die die Epitope inseriert wurden, bestimmt. Erfolgreich konnte auf diese Weise den Linkerregionen D1/2, D6/7 und D8/9 eine extrazelluläre Lage zugewiesen werden.

In einer elektrophysiologischen Studie gelang es außerdem, die Cysteinreste C242, C254 und C546 als Bindungsstellen zu identifizieren, die an einer Reduktion der hClC-1 Ströme durch extern appliziertes Zn^{2+} beteiligt sind. Da diese Stromreduktion nur durch extern

appliziertes Zn^{2+} hervorgerufen wird und nicht durch intern appliziertes, konnte damit drei weiteren Regionen eine ebenfalls extrazelluläre Lokalisation zugewiesen werden.

Letztendlich konnten so insgesamt sechs Regionen des hClC-1 auf der extrazellulären Seite der Zellmembran lokalisiert werden und dadurch das derzeitige Topologiemodell des hClC-1 nach Schmidt-Rose & Jentsch (1997) in vielen Punkten experimentell gestützt werden.

Neben den Erkenntnissen zur Topologie des hClC-1 liefern die Ergebnisse dieser Arbeit auch Informationen über potentielle Porenregionen des Kanals. So konnte ausgeschlossen werden, daß die unmittelbare Umgebung der Aminosäure P260 direkt an der Bildung des Porendurchgangs beteiligt ist. P260 liegt in der Mitte einer von mehreren Arbeitsgruppen postulierten Porenregion und es wäre zu erwarten gewesen, daß die Insertion mehrerer geladener Aminosäuren, wie sie dem flag-Epitop entsprechen, in einer solchen Region zu einer elektrostatischen oder sterischen Behinderung der Pore führen. Da dies jedoch nicht der Fall war, wurde daraus geschlossen, daß P260 nicht direkt an der Porenbildung beteiligt sein kann, obwohl Aminosäuren in unmittelbarer Nähe eindeutig mit der Bildung der Pore in Zusammenhang gebracht werden. Zu diesen benachbarten Aminosäuren gehören auch C242 und C254, die an der Zn^{2+}-Blockade des hClC-1 beteiligt sind. Da die Stromreduktion bei dieser Zn^{2+}-Blockade sehr wahrscheinlich durch einen direkten Block der Pore verursacht wird, müssen die daran beteiligten Aminosäuren C242, C254 und C546 in der räumlichen Nähe der Pore lokalisiert sein.

Damit ist in dieser Arbeit, durch die Kombination mehrerer molekularbiologischer und elektrophysiologischer Methoden, nicht nur ein weiterer Schritt auf dem Weg zur Erstellung eines Topologiemodell für den Chloridkanal hClC-1 gelungen, sondern es konnte auch zur Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen in diesem Kanal beigetragen werden.

6. Literatur

ADACHI, S., UCHIDA, S., ITO, H., HATA, M., HIROE, M., MARUMO, F., SASAKI, S. (1994). Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J.Biol.Chem.* **269**, 17677-17683.

ADRIAN, R.H. & BRYANT, S.H. (1974). On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J.Physiol. (Lond.)* **240**, 505-515.

ANDERER, F. A. & SCHLUMBERGER, H. D. (1966). Cross-reactions of antisera against the terminal amino acid and dipeptide of tobacco mosaic virus. *Biochim.Biophys.Acta* **115**, 222-224.

ARMSTRONG, C.M. & BEZANILLA, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J.Gen.Physiol.* **70**, 567-590.

ASTILL, D.S., RYCHKOV, G.Y., CLARKE, J.D., HUGHES, B.P., ROBERTS, M.L., BRETAG, A.H. (1996). Characteristics of skeletal muscle chloride channel C1C-1 and point mutant R304E expressed in Sf-9 insect cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1280**, 178-186.

BAR-JOSEPH, M. & MALKINSON, M. (1980). Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. *J.Virol.Methods* **1**, 179-183.

BECK, C.L., FAHLKE, Ch., GEORGE, A.L., Jr. (1996). Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 11248-11252.

BECKER, P.E. (1957). Zur Frage der Heterogenie der erblichen Myotonien. *Nervenarzt* **28**, 455-460.

BECKER, P. E. (1977). Myotonia congenita and syndromes associated with myotonia. Clinical genetic studies of nondystrophic myotonias. Georg Thieme, Stuttgart.

BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.

BRANDT, S. & JENTSCH, T.J. (1995). ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett.* **377**, 15-20.

BRETAG, A.H. (1987). Muscle chloride channels. *Physiol.Rev.* **67**, 618-724.

BRYANT, S.H. (1969). Cable properties of external intercostal muscle fibres from myotonic and nonmyotonic goats. *J.Physiol. (Lond.)* **204**, 539-550.

BRYANT, S.H. & MORALES AGUILERA, A. (1971). Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J.Physiol. (Lond.)* **219**, 367-383.

BRYANT, S.H. (1976). Altered membrane properties in myotonia. In: Membranes and Disease, Bolis, L., Hoffman, L.P., Leaf, A. (Hrsg.), Raven, New York. pp 197-206.

BUYSE, G., TROUET, D., VOETS, T., MISSIAEN, L., DROOGMANS, G., NILIUS, B., EGGERMONT, J. (1998). Evidence for the intracellular location of chloride channel (ClC)-type proteins: co-localization of ClC-6a and ClC-6c with the sarco/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pump SERCA2b. *Biochem.J.* **330**, 1015-1021.

CANFIELD, V.A. & LEVENSON, R. (1993). Transmembrane organization of the Na,K-ATPase determined by epitope addition. *Biochemistry* **32**, 13782-13786.

CHEN, T.Y. & MILLER, C. (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl^- channel. *J.Gen.Physiol.* **108**, 237-250.

CHEN, T.Y. (1998). Extracellular zinc ion inhibits ClC-0 chloride channels by facilitating slow gating. *J.Gen.Physiol.* **112**, 715-726.

CLARK, S., JORDT, S.E., JENTSCH, T.J., MATHIE, A. (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J.Physiol. (Lond.)* **506**, 665-678.

CONTE, C., DE LUCA, A., MAMBRINI, M., VRBOVA, G. (1989). Membrane ionic conductances in normal and denervated skeletal muscle of the rat during development. *Pflügers Arch.* **413**, 568-570.

DEVUYST, O., CHRISTIE, P.T., COURTOY, P.J., BEAUWENS, R., THAKKER, R.V. (1999). Intra-renal and subcellular distribution of human chloride channel, ClC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum.Mol.Genet.* **8**, 247-257.

DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.

DUANE, D., WINTER, C., COWLEY, S., HUME, J.R., HOROWITZ, B. (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* **390**, 417-421.

DUANE, D., COWLEY, S., HOROWITZ, B., HUME, J.R. (1999). A serine residue in ClC-3 links phosphorylation-dephosphorylation to chloride channel regulation by cell volume. *J.Gen.Physiol.* **113**, 57-70.

FAHLKE, Ch., RÜDEL, R., MITROVIC, N., ZHOU, M., GEORGE, A.L., Jr. (1995). An aspartic acid residue important for voltage-dependent gating of human muscle chloride channels. *Neuron* **15**, 463-472.

FAHLKE, Ch., ROSENBOHM, A., MITROVIC, N., GEORGE, A.L., Jr., RÜDEL, R. (1996). Mechanism of voltage-dependent gating in skeletal muscle chloride channels. *Biophys.J.* **71**, 695-706.

FAHLKE, Ch., BECK, C.L., GEORGE, A.L., Jr. (1997a). A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 2729-2734.

FAHLKE, Ch., DURR, C., GEORGE, A.L., Jr. (1997b). Mechanism of ion permeation in skeletal muscle chloride channels. *J.Gen.Physiol.* **110**, 551-564.

FAHLKE, Ch., KNITTLE, T., GURNETT, C.A., CAMPBELL, K.P., GEORGE, A.L., Jr. (1997c). Subunit stoichiometry of human muscle chloride channels. *J.Gen.Physiol.* **109**, 93-104.

FAHLKE, Ch., YU, H.T., BECK, C.L., RHODES, T.H., GEORGE, A.L., Jr. (1997d). Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels. *Nature* **390**, 529-532.

FAHLKE, Ch., RHODES, T.H., DESAI, R.R., GEORGE, A.L., Jr. (1998). Pore stoichiometry of a voltage-gated chloride channel. *Nature* **394**, 687-690.

FAHLKE, C. (2000). Molecular mechanisms of ion conduction in ClC-type chloride channels: lessons from disease-causing mutations. *Kidney Int.* **57**, 780-786.

FRIEDRICH, T., BREIDERHOFF, T., JENTSCH, T.J. (1999). Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J.Biol.Chem.* **274**, 896-902.

GRENNINGLOH, G., RIENITZ, A., SCHMITT, B., METHFESSEL, C., ZENSEN, M., BEYREUTHER, K., GUNDELFINGER, E.D., BETZ, H. (1987). The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* **328**, 215-220.

GRUBER, A.D., ELBLE, R.C., JI, H.L., SCHREUR, K.D., FULLER, C.M., PAULI, B.U. (1998). Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca^{2+}-activated Cl^- channel proteins. *Genomics* **54**, 200-214.

GRÜNDER, S., THIEMANN, A., PUSCH, M., JENTSCH, T.J. (1992). Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* **360**, 759-762.

GÜNTHER, W., LUCHOW, A., CLUZEAUD, F., VANDEWALLE, A., JENTSCH, T.J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 8075-8080.

GURNETT, C.A., KAHL, S.D., ANDERSON, R.D., CAMPBELL, K.P. (1995). Absence of the skeletal muscle sarcolemma chloride channel ClC-1 in myotonic mice. *J.Biol.Chem.* **270**, 9035-9038.

HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100.

HANKE, W. & MILLER, C. (1983). Single chloride channels from *Torpedo electroplax*. Activation by protons. *J.Gen.Physiol.* **82**, 25-45.

HILLE, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, p 19 und p 66.

HOSHI, T., ZAGOTTA, W.N., ALDRICH, R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533-538.

HUTTER, O.F. & WARNER, A.E. (1967a). Action of some foreign cations and anions on the chloride permeability of frog muscle. *J.Physiol. (Lond.)* **189**, 445-460.

HUTTER, O.F. & WARNER, A.E. (1967b). The effect of pH on the 36-Cl efflux from frog skeletal muscle. *J.Physiol. (Lond.)* **189**, 427-443.

JENTSCH, T.J., STEINMEYER, K., SCHWARZ, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**, 510-514.

JENTSCH, T.J. (1994). Molecular physiology of anion channels. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**, 600-606.

JENTSCH, T.J., GÜNTHER, W., PUSCH, M., SCHWAPPACH, B. (1995). Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J.Physiol. (Lond)* **482**, 19S-25S.

JENTSCH, T.J., FRIEDRICH, T., SCHRIEVER, A., YAMADA, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch.* **437**, 783-795.

KAST, C., CANFIELD, V., LEVENSON, R., GROS, P. (1995). Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3. *Biochemistry* **34**, 4402-4411.

KAWASAKI, M., UCHIDA, S., MONKAWA, T., MIYAWAKI, A., MIKOSHIBA, K., MARUMO, F., SASAKI, S. (1994). Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* **12**, 597-604.

KIEFERLE, S., FONG, P., BENS, M., VANDEWALLE, A., JENTSCH, T.J. (1994). Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 6943-6947.

KINOSITA, K.J. & TSONG, T.T. (1977). Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**, 1923-1927.

KLOCKE, R., STEINMEYER, K., JENTSCH, T.J., JOCKUSCH, H. (1994). Role of innervation, excitability, and myogenic factors in the expression of the muscular chloride channel ClC-1. A study on normal and myotonic muscle. *J.Biol.Chem.* **269**, 27635-27639.

KNAPPIK, A. & PLÜCKTHUN, A. (1994). An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *Biotechniques* **17**, 754-761.

KOCH, M.C., STEINMEYER, K., LORENZ, C., RICKER, K., WOLF, F., OTTO, M., ZOLL, B., LEHMANN-HORN, F., GRZESCHIK, K.H., JENTSCH, T.J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* **257**, 797-800.

KÜRZ, L.L., WAGNER, S., GEORGE, A.L., Jr., RÜDEL, R. (1997). Probing the major skeletal muscle chloride channel with Zn^{2+} and other sulfhydryl-reactive compounds. *Pflügers Arch.* **433**, 357-363.

KÜRZ, L.L., KLINK, H., JAKOB, I., KUCHENBECKER, M., BENZ, S., LEHMANN-HORN, F., RÜDEL, R. (1999). Identification of three cysteines as targets for the Zn^{2+} blockade of the human skeletal muscle chloride channel. *J.Biol.Chem.* **274**, 11687-11692.

KYTE, J. & DOOLITTLE, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.* **157**, 105-132.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

LIPICKY, R.J., BRYANT, S.H., SALMON, J.H. (1971). Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J.Clin.Invest.* **50**, 2091-2103.

LLOYD, S.E., PEARCE, S.H., FISHER, S.E., STEINMEYER, K., SCHWAPPACH, B., SCHEINMAN, S.J., HARDING, B., BOLINO, A., DEVOTO, M., GOODYER, P., RIGDEN, S.P., WRONG, O., JENTSCH, T.J., CRAIG, I.W., THAKKER, R.V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**, 445-449.

LUDEWIG, U., PUSCH, M., JENTSCH, T.J. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature* **383**, 340-343.

LUDEWIG, U., PUSCH, M., JENTSCH, T.J. (1997). Independent gating of single pores in CLC-0 chloride channels. *Biophys.J.* **73**, 789-797.

LUYCKX, V.A., GODA, F.O., MOUNT, D.B., NISHIO, T., HALL, A., HEBERT, S.C., HAMMOND, T.G., YU, A.S. (1998). Intrarenal and subcellular localization of rat CLC5. *Am.J.Physiol.* **275**, F761-F769

MANOIL, C. & TRAXLER, B. (1995). Membrane protein assembly: genetic, evolutionary and medical perspectives. *Annu.Rev.Genet.* **29**, 131-150.

MARGOLSKEE, R.F., MCHENDRY-RINDE, B., HORN, R. (1993). Panning transfected cells for electrophysiological studies. *Biotechniques* **15**, 906-911.

MARTY, A. & NEHER, E. (1995). Tight-seal whole-cell recording. In: Neher, E., Sakmann, B. (Hrsg.) Single channel recording, Plenum press, 2nd edition, New York pp 31-52.

MIDDLETON, R.E., PHEASANT, D.J., MILLER, C. (1994). Purification, reconstitution, and subunit composition of a voltage-gated chloride channel from *Torpedo electroplax*. *Biochemistry* **33**, 13189-13198.

MIDDLETON, R.E., PHEASANT, D.J., MILLER, C. (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature* **383**, 337-340.

PALADE, P.T. & BARCHI, R.L. (1977a). Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm. *J.Gen.Physiol.* **69**, 325-342.

PALADE, P.T. & BARCHI, R.L. (1977b). On the inhibition of muscle membrane chloride conductance by aromatic carboxylic acids. *J.Gen.Physiol.* **69**, 879-896.

POLSON, A., VON WECHMAR, M.B., VAN REGENMORTEL, M.H. (1980). Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol.Commun.* **9**, 475-493.

PUSCH, M., STEINMEYER, K., JENTSCH, T.J. (1994). Low single channel conductance of the major skeletal muscle chloride channel, ClC-1. *Biophys.J.* **66**, 149-152.

PUSCH, M., LUDEWIG, U., REHFELDT, A., JENTSCH, T.J. (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527-531.

REYMANN, S., FLORKE, H., HEIDEN, M., JAKOB, C., STADTMULLER, U., STEINACKER, P., LALK, V.E., PARDOWITZ, I., THINNES, F.P. (1995). Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy. *Biochem.Mol.Med.* **54**, 75-87.

RIORDAN, J.R., ROMMENS, J.M., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELENSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J.L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.

RÜDEL, R., RICKER, K., LEHMANN-HORN, F. (1988). Transient weakness and altered membrane characteristic in recessive generalized myotonia (Becker). *Muscle Nerve* **11**, 202-211.

RYCHKOV, G.Y., PUSCH, M., ASTILL, D.S., ROBERTS, M.L., JENTSCH, T.J., BRETAG, A.H. (1996). Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *J.Physiol. (Lond.)* **497**, 423-435.

RYCHKOV, G.Y., ASTILL, D.S., BENNETTS, B., HUGHES, B.P., BRETAG, A.H., ROBERTS, M.L. (1997). pH-dependent interactions of Cd^{2+} and a carboxylate blocker with the rat ClC-1 chloride channel and its R304E mutant in the Sf-9 insect cell line. *J.Physiol. (Lond.)* **501**, 355-362.

RYCHKOV, G.Y., PUSCH, M., ROBERTS, M.L., JENTSCH, T.J., BRETAG, A.H. (1998). Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, ClC-1, by foreign anions. *J.Gen.Physiol.* **111**, 653-665.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**, 5463-5467.

SAUNDERS, J.A., SMITH, C.R., KAPER, J.M. (1989). Effects of electroporation pulse wave on the incorporation of viral RNA into tobacco protoplasts. *Biotechniques* **7**, 1124-1131.

SAVIANE, C., CONTI, F., PUSCH, M. (1999). The muscle chloride channel ClC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J.Gen.Physiol.* **113**, 457-468.

SCHMIDT-ROSE, T. & JENTSCH, T.J. (1997). Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 7633-7638.

SCHOFIELD, P.R., DARLISON, M.G., FUJITA, N., BURT, D.R., STEPHENSON, F.A., RODRIGUEZ, H., RHEE, L.M., RAMACHANDRAN, J., REALE, V., GLENCORSE, T.A. (1987). Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**, 221-227.

SHEPPARD, D.N. & WELSH, M.J. (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol.Rev.* **79**, S23-S45

SIMON, D.B., BINDRA, R.S., MANSFIELD, T.A., NELSON-WILLIAMS, C., MENDONCA, E., STONE, R., SCHURMAN, S., NAYIR, A., ALPAY, H., BAKKALOGLU, A., RODRIGUEZ-SORIANO, J., MORALES, J.M., SANJAD, S.A., TAYLOR, C.M., PILZ, D., BREM, A., TRACHTMAN, H., GRISWOLD, W., RICHARD, G.A., JOHN, E., LIFTON, R.P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genet.* **17**, 171-178.

SMITH, R.L., CLAYTON, G.H., WILCOX, C.L., ESCUDERO, K.W., STALEY, K.J. (1995). Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J.Neurosci.* **15**, 4057-4067.

STALEY, K., SMITH, R., SCHAACK, J., WILCOX, C., JENTSCH, T.J. (1996). Alteration of GABA A receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* **17**, 543-551.

STEINMEYER, K., KLOCKE, R., ORTLAND, C., GRONEMEIER, M., JOCKUSCH, H., GRÜNDER, S. & JENTSCH, T.J. (1991 a). Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* **354**, 304-308.

STEINMEYER, K., ORTLAND, C., JENTSCH, T.J. (1991 b). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* **354**, 301-304.

STEINMEYER, K., LORENZ, C., PUSCH, M., KOCH, M.C., JENTSCH, T.J. (1994). Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J.* **13**, 737-743.

TAINER, J.A., ROBERTS, V.A., GETZOFF, E.D. (1991). Metal-binding sites in proteins. *Curr.Opin.Biotechnol.* **2**, 582-591.

THIEMANN, A., GRÜNDER, S., PUSCH, M., JENTSCH, T.J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* **356**, 57-60.

THOMSEN, J. (1876). Tonische Krämpfe in willkürlich bewegten Muskeln in Folge von ererbter psychischer Disposition. *Archiv für Psychatrie und Nervenkrankheiten* **6**, 702-718.

TRAXLER, B., BOYD, D., BECKWITH, J. (1993). The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins. *J.Membr.Biol.* **132**, 1-11.

UCHIDA, S., SASAKI, S., FURUKAWA, T., HIRAOKA, M., IMAI, T., HIRATA, Y., MARUMO, F. (1993). Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J.Biol.Chem.* **268**, 3821-3824.

UCHIDA, S., SASAKI, S., NITTA, K., UCHIDA, K., HORITA, S., NIHEI, H., MARUMO, F. (1995). Localization and functional characterization of rat kidney-specific chlorid channel, ClC-K1. *Am.Soc.Clin.Invest.* **95**, 104-134.

VALVERDE, M.A. (1999). CIC channels: leaving the dark ages on the verge of a new millennium. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 509-516.

VAN SLEGTENHORST, M.A., BASSI, M.T., BORSANI, G., WAPENAAR, M.C., FERRERO, G.B., DE CONCILIIS, L., RUGARLI, E.I., GRILLO, A., FRANCO, B., ZOGHBI, H.Y. (1994). A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels. *Hum.Mol.Genet.* **3**, 547-552.

VON HEIJNE, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**, 456-458.

VON HEIJNE, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J.Mol.Biol.* **225**, 487-494.

WALDEGGER, S. & JENTSCH, T.J. (2000 a). From tonus to tonicity: physiology of ClC chloride channels. *J.Am.Soc.Nephrol.* **11**, 1331-1339

WALDEGGER, S. & JENTSCH, T.J. (2000 b). Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J.Biol.Chem.*

WALTER, G. (1986). Production and use of antibodies against synthetic peptides. *J.Immunol.Methods* **88**, 149-161.

WANG, L., CHEN, L., JACOB, T.J.C. (2000). The role of ClC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition. *J.Physiol. (Lond.)* **524**, 63-75.

WATKINS, W.J. & WATTS, D.C. (1984). Developmental changes in lactate dehydrogenase and aldolase activity of the A2G-adr mouse with abnormal muscle function: further comparison with the 129Re-dy mutant. *J.Neurochem.* **43**, 517-521.

WESTHOF, E., ALTSCHUH, D., MORAS, D., BLOOMER, A.C., MONDRAGON, A., KLUG, A., VAN REGENMORTEL, M.H. (1984). Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* **311**, 123-126.

WOOLTORTON, J.R., MCDONALD, B.J., MOSS, S.J., SMART, T.G. (1997). Identification of a Zn^{2+} binding site on the murine GABA A receptor complex: dependence on the second transmembrane domain of beta subunits. *J.Physiol. (Lond.)* **505**, 633-640.

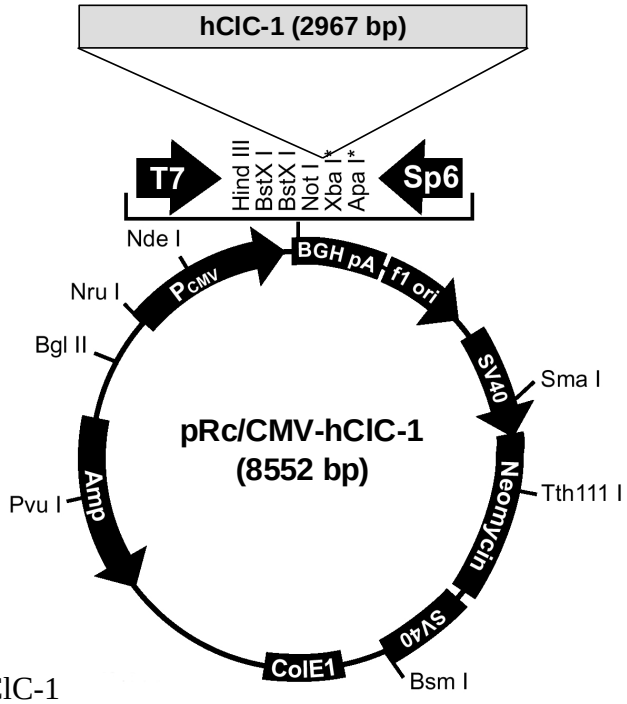
ZHANG, J., GEORGE, A.L., Jr., GRIGGS, R.C., FOUAD, G.T., ROBERTS, J., KWIECINSKI, H., CONNOLLY, A.M., PTACEK, L.J. (1996). Mutations in the human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) associated with dominant and recessive myotonia congenita. *Neurology* **47**, 993-998.

7. Anhang

7.1. Einbuchstabencode der Aminosäuren

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

7.2. Plasmidkarte



Name: pRc/CMV-ClC-1
Größe: 8552 bp
Vektor: pRc/CMV
Insert: hClC-1 cDNA (2967 bp)
Insertionsstellen im Vektor: Not I und XbaI
Selektionsmarker: Ampicillin- und Neomycinresistenz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Reinhardt Rüdel danke ich für die Bereitstellung des Themas sowie die fachliche und finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Lothar Kürz möchte ich mich für die Betreuung zu Beginn meiner Arbeit und die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen der Cysteinmutanten bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Stefan Grissmer, der stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und Herrn Dr. Michael Schiebe für seine hilfreiche Unterstützung im Medialab. Frau Silvia Gabriel, danke ich dafür, daß sie sich die Zeit genommen hat den Fehlerteufel in dieser Arbeit zu bekämpfen.

Ganz besonders hervorheben möchte ich die Unterstützung durch Herrn Dr. Bernhard Schu, der nicht nur Ansprechparntner bei zahlreichen molekularbiologischen Fragestellungen war, sondern durch seinen freundschaftlichen Rat und unzählige Gespräche immer wieder dazu beigetragen hat, auch schwierige Situationen zu meistern. Selbst wenn diese über das Thema der Arbeit hinausgingen.

Schließlich möchte ich mich noch bei allen Mitarbeitern der Allgemeinen Physiologie, allen voran bei Frau Christiane Buchholz, der „guten Seele“ unseres Labors, für ihre vielfältige Hilfe und freundliche Unterstützung bedanken.