

**Struktur-Funktionsuntersuchungen an
CLC-Chloridkanälen
am Beispiel des humanen Skelettmuskelkanals
hClC-1**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemiker

Thomas Schmidt-Rose

geboren am 6. Juli 1964

in Lüneburg

1998

Referent: Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch, Universität Hamburg
Koreferent: Prof. Dr. Dr. B. Tümmler, Medizinische Hochschule Hannover
Tag der Promotion: 27. Januar 1998
Datum der Veröffentlichung: 20. Februar 1998

**Dein Weltbild, Zwerg, wie du auch sinnst,
Bleibt ein Phantom, ein Hirngespinnst.
Dein Ich - das Glas, darin sich Schatten spiegeln,
Das „Ding an sich“ - ein Buch mit sieben Siegeln.**

MASCHA KALÉKO

Aus: Wo sich berühren Raum und Zeit...

für Monika

Zusammenfassung

Chloridkanäle der CLC-Superfamilie stellen eine neue Klasse von Ionenkanälen dar, deren Öffnung durch das Membranpotential gesteuert wird. Sie sind evolutionär sehr konserviert, und kommen bei Bakterien, Hefen, Pflanzen und diversen Tierstämmen vor. Bei Säugetieren kennt man bisher neun Vertreter. Diese werden zum Teil gewebsspezifisch (CIC-1, CIC-Ka/b) zum Teil aber auch ubiquitär (CIC-2, CIC-6, CIC-7) exprimiert. Ihre physiologischen Funktionen reichen von der Stabilisierung des Membranpotentials über Elektrolyttransport bis zur Beteiligung an der Zellvolumenregulation. Genetisch bedingte Defekte einiger CLC-Familienmitglieder führen zu Erbkrankheiten, wie den *Thomsen-* und *Becker-*Myotonien in Falle des humanen Skelettmuskelkanals hCIC-1. Die CLC-Kanäle sind mit keinem bisher bekannten Membranprotein strukturell verwandt. Ihre Potentialabhängigkeit wird nicht wie bei Natrium- oder Kaliumkanälen durch einen proteinintrinsic Spannungssensor hervorgerufen, sondern durch das permeierende Chloridion selbst. Beim CIC-0 aus dem elektrischen Rochen *Torpedo marmorata* bilden sich Dimere mit je einer Pore pro Polypeptidkette. Für hCIC-1 werden sowohl dimere als auch tetramere Kanäle diskutiert. Da es sich hier um einen völlig neuartigen Typ von Ionenkanälen handelt, dem auch eine medizinische Bedeutung zukommt, ist die Kenntnis seiner Tertiär- und Quartärstruktur sowohl zur Beurteilung krankheitsauslösender Mutationen, als auch zum allgemeinen Verständnis von Ionenkanälen wichtig.

In der vorliegenden Arbeit konnte das bislang nur auf Hydrophobizitätsanalysen beruhende topologische Modell durch experimentelle Techniken überprüft und verifiziert werden. Um die Ergebnisse abzusichern, wurden mehrere unabhängige Methoden angewendet. Nachdem zunächst extrazelluläre Proteinabschnitte durch Einfügen von Glykosylierungsstellen identifiziert wurden, erfolgte eine Detektion zytoplasmatischer Bereiche durch proteolytische Untersuchungen („Proteinase Protection Assays“). Einige Regionen wurden zusätzlich nach Cystein-Austauschmutagenese auf ihre Zugänglichkeit durch Sulfhydrylgruppen-spezifische MTS-Reagenzien untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Amino- und Carboxytermini des Proteins zytoplasmatisch liegen. Insgesamt finden sich 10 oder 11 Transmembrandomänen, wobei noch unklar ist, ob die hydrophoben Domänen D9/D10 die Membran zusammen ein- oder zweimal durchqueren. D4 ist keine Transmembrandomäne, denn beide Enden sind vom Extrazellulärraum aus zugänglich; D13 liegt vollständig intrazellulär.

Mindestens drei Regionen von hCIC-1 sind topologisch autonom. Wie durch Koexpression von partiellen Kanalproteinen in *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden konnte, sind die Transmembrandomänen D1 bis D8, der hydrophobe Block D9-D12 und der zytoplasmatische C-Terminus als separate Polypeptide in der Lage, die korrekte Raumstruktur einzunehmen und miteinander funktionelle Kanäle mit Wildtypeigenschaften zu bilden. Bei der Assoziation zwischen dem löslichen C-Terminus und den membranintegrierten Abschnitten spielen spezifische Wechselwirkungen zwischen den sogenannten CBS-Domänen eine Rolle. Im Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionstest zeigte sich, daß CBS1 und CBS2 wechselseitig aneinander binden können, es existiert aber auch eine homophile Affinität zwischen CBS2-Domänen. Zusätzlich haben C-terminale Kanalabschnitte, die CBS2 beinhalten, eine hohe Affinität zu Lipiddoppelschichten, was unter Umständen die effektive Reassoziierung der Fragmente erklären könnte. Weiterhin wurden mehrere Aminosäurepositionen in den Domänen D3-D4, D10 und D11/D12 identifiziert, deren Modifikation mit MTSES zu einer Verringerung der Chloridströme führte. Dies legt deren räumliche Nähe zur Pore nahe. Austausch der Domänen D3 und D4 in hCIC-1 gegen die entsprechende Sequenz von hCIC-5 führte zur Übertragung porenintrinsic Rektifizierung, nicht aber zu einer veränderten Ionenselektivität.

Schlüsselworte: CLC-Chloridkanäle, Topologie, Elektrophysiologie

Abstract

CLC chloride channels represent a new class of voltage gated ion channels. They can be found in organisms as diverse as bacteria, yeast, plants, and animals. In mammals nine members are known so far. Some of these channels are expressed ubiquitously (CIC-2, CIC-6, CIC-7) others are tissue specific (CIC-1, CIC-Ka/b). Their physiological functions range from stabilization of the resting membrane potential in muscle to epithelial ion transport and cell volume regulation. Mutations in some CLC genes lead to inherited diseases like Thomsen- and Becker-type myotonias in case of the skeletal muscle channel hCIC-1. CLC proteins are not structurally related to any other known ion channel. Their voltage dependent gating is not caused by an intrinsic potential sensor, as it is present in sodium and potassium channels, but rather by the permeant chloride ion itself. CIC-0 from the electric ray *Torpedo mamorata* consists of dimers with two pores, each formed entirely by a single polypeptide. For hCIC-1 models with dimeric and tetrameric structures have been proposed. As CLC channels are a novel class of ion channels, and as they have clinical importance, knowledge of their three-dimensional structure and subunit composition is important, not only to assess the role of disease-causing mutations, but also to understand their function in general.

In this work an existing preliminary model, which was based mainly on hydrophobicity analysis, could be verified and strengthened by experimental techniques. To increase the reliability of the results, several independent methods were applied. First, loops between hydrophobic stretches were probed for extracellular orientation by insertion of glycosylation sites. Then, intracellular loops were identified by the susceptibility of fused reporter epitopes to added proteases. Selected regions were additionally tested by cystein-scanning-mutagenesis and probed for accessibility by SH-group-specific MTS-reagents. The results indicate that both the amino- and the carboxyterminus reside in the cytoplasm. The number of transmembrane domains amounts to 10, if the hydrophobic domains D9/D10 are considered to span the lipid bilayer once, or alternatively 11. D4 is not a transmembrane domain, since it is accessible from the extracellular space on either side. By contrast, D13 is completely cytosolic.

At least three regions of hCIC-1 are topologically autonomous. As could be shown by coexpression of partial proteins in *Xenopus* oocytes, transmembrane domains D1 through D8, the hydrophobic block D9-D12, and the cytoplasmic carboxyterminus can independently fold into the proper three-dimensional structure and reconstitute functional channels with wildtype properties. Interactions of the so-called CBS-domains, which are present in pairs in eucaryotic CLC-channels, are important for association of the membrane embedded and the soluble cytosolic part of the channel. In a yeast two-hybrid-assay it turned out that CBS1 and CBS2 mutually bind each other. However, also homophilic interactions of CBS2, but not of CBS1, could be found. Moreover, the carboxyterminus of hCIC-1 seems to have a high affinity to the lipid bilayer, possibly explaining the effective association of channel fragments.

Several amino acid positions in D3/D4, D10, and D11/D12 were identified which are obviously near the ion conduction pathway, since after cystein-substitution mutagenesis their modification by MTSES reduced chloride currents. Exchange of domains D3/D4 of hCIC-1 with equivalent stretches of hCIC-5 transferred the outward rectification properties, of the latter channel to hCIC-1, however, the ion selectivity was not changed.

From the analysis of mutations found in patients suffering from myotonia we found that the resulting voltage-dependence of coexpressed hCIC-1 mutants varies according to the respective pair of channel proteins, a result that can not be explained by linear superposition. For the first time a partially additive effect of mutations in different mutant monomers was shown to affect gating.

Keywords: CLC-chloride-channels, topology, electrophysiology

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Arginin	R	Arg
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung	CIC-n	individueller Vertreter n der
ABC	<u>A</u> TP- <u>B</u> inding- <u>C</u> assette		CLC-Familie
AS	Aminosäure	cRNA	komplementäre
ATP	Adenosintriphosphat		Ribonukleinsäure
bp	Basenpaare	C-Terminus	Carboxyterminus
BSA	Albumin aus Kälberserum	DEPC	Diethylpyrocarbonat
bzw.	beziehungsweise	DNase	Desoxyribonuklease
cAMP	zyklisches	dNTP	Mischung aller vier
	Adenosinmonophosphat		Nukleosidtriphosphate
cDNA	komplementäre	DMEM	Dulbecco's modified Eagle
	Desoxyribonukleinsäure		Medium
CFTR	Cystische-Fibrose-	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	Transmembran-	EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
	Leitfähigkeits-Regulator	ER	Endoplasmatisches
CIP	alkalische Phosphatase aus		Retikulum
	Rinderdarm	FCS	Fötales Kälberserum
CLC	Protein der Überfamilie	GABA	g-Aminobuttersäure
	spannungsgesteuerter	h	Stunde
	Chloridkanäle	kBp	Kilobasenpaare
		kDa	Kilodalton

kV	Kilovolt	PCR	Polymerasekettenreaktion
LB	Luria Broth	<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
M	molar	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
mA	Milliampere	P_o	apparente Offenwahrscheinlichkeit
mg	Milligramm	pS	Picosiemens
mg	Mikrogramm	rpm	Umdrehungen pro Minute
min	Minuten	RT	Raumtemperatur
ml	Milliliter	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
μ l	Mikroliter	s.	siehe
mM	millimolar	SA	Signalanker
μ M	mikromolar	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	Sek.	Sekunde
MTS	Methanthiosulfonat	SP	Signalpeptid
MTSES	Methanthiosulfonato- ethylsulfat	SR	SRP-Rezeptor
mV	Millivolt	SRP	signal recognition particle
N	normal	ST	Stop-Transfer-Sequenz
ND96	Puffer mit 96 mM NaCl (siehe Materialien und Methoden)	Tab.	Tabelle
ng	Nanogramm	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
NMDA	N-Methyl-D-aspartat	Tris	Trishydroxymethyl- aminoethan
N-Terminus	Aminoterminus	V	Volt
PAA	Polyacrylamid	vergl.	vergleiche
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese	v/v	Volumen pro Volumen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	vs.	versus
		WT	Wildtyp
		w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	5
1.1 Zellmembran, selektiver Stofftransport und Membranpotential	5
1.2 Ionenkanäle	7
1.2.1 Spannungsgesteuerte Kationenkanäle	7
1.2.2 Chloridkanäle im Überblick	9
1.2.3 Spannungsgesteuerte CLC-Chloridkanäle	10
1.2.4 Die Eigenschaften des humanen Skelettmuskelkanals hClC-1	12
1.3 Grundlagenwissen zu Membranproteinen	13
1.3.1 Sekundär- und Tertiärstruktur	13
1.3.2 Biosynthese von Proteinen am endoplasmatischen Retikulum	16
1.3.2.1 Sezernierte Proteine	16
1.3.2.2 Integrale Proteine mit einer Transmembrandomäne	18
1.3.2.3 Polytope Membranproteine	19
1.3.3 Experimentelles Methodenspektrum zur Aufklärung der Topologie	21
1.4 Aufgabenstellung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Chemikalien und Enzyme	25
2.2 Filmmaterialien und bildgebende Verfahren	25
2.3 Puffer und Lösungen	25
2.4 Bakterienkultur	26
2.4.1 Stämme	26
2.4.2 Medien	27
2.5 Hefekultur	27
2.5.1 Stämme	27
2.5.2 Medien	27
2.6 Vektoren	27
2.7 Eukaryontische Kulturzellen	30
2.8 DNA- und RNA-Techniken	30
2.8.1 Phenol / Chloroform-Extraktion	30
2.8.2 Ethanol fällung	30
2.8.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	30
2.8.4 Agarosegelelektrophorese von DNA	31
2.8.5 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von cDNA	31
2.8.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA	31
2.8.7 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA	32
2.8.8 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA	32
2.8.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.8.10 Restriktionsspaltung von DNA	32
2.8.11 Dephosphorylierung von Vektoren	32
2.8.12 Ligationen	33
2.8.13 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	33
2.8.14 Transformation von Bakterien	33
2.8.15 Kontrolle von transformierten Bakterien	33
2.8.16 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	34
2.8.16.1 Mini-Präparation	34

2.8.16.2 Midi-Präparation.....	34
2.8.17 DNA-Sequenzierung.....	34
2.8.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.8.18.1 Standardreaktionsbedingungen.....	35
2.8.18.2 Einzelkolonie-PCR	35
2.8.18.3 Einführung von Punktmutanten durch zweifach rekombinante PCR.....	36
2.8.18.4 Erzeugung von Proteinfusionen und chimären Proteinen durch rekombinante PCR	37
2.8.18.5 Insertion größerer DNA-Abschnitte durch dreifach rekombinante PCR.....	37
2.8.18.6 RT-PCR	38
2.8.19 Isolierung von Gesamt-RNA aus der Rinderhypophyse.....	39
2.8.20 Gewinnung von PolyA ⁺ -RNA	39
2.8.21 Synthese von cDNA	39
2.8.22 <i>In vitro</i> -Transkription	39
2.9 Konstruktion der Mutanten im einzelnen	40
2.9.1 Glykosylierungsmutanten	40
2.9.1.1 C-terminal verkürzte Varianten von hCIC-1: WTΔC und NQΔC.....	40
2.9.1.2 Punktmutanten	41
2.9.1.3 Transplantation der Wildtyp-Glykosylierungsstelle	41
2.9.2 Prolaktin-Fusionen.....	42
2.9.3 Cystein-Austausch-Mutanten	43
2.9.4 Trunkierte Kanäle	45
2.9.5 Punktmutanten in trunkierten Kanälen	45
2.9.6 Chimäre Kanäle und Deletion von D4.....	45
2.10 Protein-Techniken.....	47
2.10.1 <i>In vitro</i> -Translation.....	47
2.10.2 Proteinase-Protection-Assay.....	47
2.10.3 Herstellung von Oozyten-Homogenisat.....	47
2.10.4 Membranpräparation von Oozyten und Zellkulturzellen.....	48
2.10.5 Carbonatpuffer-Extraktion von Membranpräparationen	48
2.10.6 Protein Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
2.10.7 Westernblots	49
2.11 Techniken in Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems	49
2.11.1 Kultivierung von Hefezellen auf Platten und in Schüttelkultur.....	49
2.11.2 Transformation von Hefen.....	49
2.11.3 Fusionen von CBS1/CBS2 mit GAL4 im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	50
2.11.4 β-Galaktosidase-Aktivitätstest auf Filterpapier.....	51
2.12 Zellkultur	51
2.12.1 Haltung von Säugerzelllinien.....	51
2.12.2 Transfektion von Zellkulturzellen	51
2.13 Elektrophysiologische Techniken.....	52
2.13.1 Präparation von Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	52
2.13.2 Injektion von cRNA in <i>Xenopus</i> -Oozyten	52
2.13.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	52
2.13.4 Messung des Effektes von MTS-Reagenzien	53
2.13.5 Datenauswertung	54
2.13.5.1 Berechnung der Leitfähigkeiten („slope-conductance“).....	54
2.13.5.2 Ermittlung von relativen Permeabilitätskoeffizienten	54
2.13.5.3 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit	54

3	ERGEBNISSE	56
3.1	Vergleichende Hydrophobizitätsanalyse der CLC-Kanäle.....	56
3.2	Anwendung von Strukturvorhersage-Algorithmen	58
3.3	Glykosylierungsstudien	60
3.3.1	Punktmutationen im hydrophilen Abschnitt D1-D2	60
3.3.2	Transplantierte WT-Glykosylierungssequenz	61
3.3.2.1	Analyse der <i>in vitro</i> -Translationen.....	61
3.3.2.2	Funktionelle Kontrolle der Glykosylierungsmutanten	63
3.3.2.3	Bestimmung des Expressionsniveaus von Glykosylierungskonstrukten im <i>Xenopus</i> -Oozytensystem	65
3.4	Proteinase-Protection-Assay	67
3.5	Untersuchung ausgewählter Regionen durch Cystein-Austauschmutanten	73
3.6	Weitere Charakterisierung der Region D3/D4	79
3.6.1	Chimäre Kanäle im Bereich D3/D4	79
3.6.2	Deletion von D4	83
3.6.3	Glykosylierungsversuche innerhalb D4	83
3.7	Amino- und carboxyterminale Trunkationen bei hClC-1	85
3.8	Rekonstitution des Kanals durch Koexpression von Fragmenten.....	86
3.8.1	Trennung von membrangebundenen und zytoplasmatischen Teilen	86
3.8.2	Trennung zwischen Transmembranabschnitten	87
3.8.3	Der hydrophobe Block D9-D10 kann sich auch ohne Signalpeptid korrekt in die Membran einbauen	90
3.8.4	Domäne D8 ist essentiell, ihre Duplikation wird aber toleriert.....	91
3.8.5	Carboxyterminale Kanalhälften können die homologen Regionen im Protein voller Länge nicht verdrängen	91
3.9	Membranaffinität des Carboxyterminus.....	92
3.9.1	Proteinchemische Untersuchung	92
3.9.2	Immunzytochemische Lokalisation.....	95
3.10	Untersuchung der Interaktionen zwischen CBS-Domänen mit dem „Hefe-Zwei- Hybrid“-System	97
3.11	Charakterisierung von Myotonie-Mutationen	102
4	DISKUSSION	107
4.1	Identifizierung von Transmembrandomänen	107
4.1.1	Vorhersagen anhand der Aminosäuresequenz	107
4.1.2	Anwendung experimenteller Techniken	110
4.1.3	Topologische und funktionelle Besonderheiten in der Region D3/D4/D5	113
4.1.4	Die Region D9-D12 ist eine topologisch selbständige Proteinregion.....	115
4.1.5	Duplikation von D8 und Teilen von D9-D12	118
4.1.6	Intra- und intermolekulare Wechselwirkungen im C-Terminus unter Beteiligung der CBS-Domänen.....	118
4.2	Variable elektrophysiologische Dominanz und Kontextabhängigkeit bei Myotoniemutationen.....	121
4.3	Ausblick	124
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	126
6	ANHANG: SEQUENZEN DER VERWENDETEN PRIMER.....	147

7 DANKSAGUNG	152
8 LEBENSLAUF	153
9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	154

1 Einleitung

1.1 Zellmembran, selektiver Stofftransport und Membranpotential

Zellen als kleinste selbständige Einheiten lebender Organismen sind von einer Membran umgeben, die von Bakterien bis hin zu Säugern einen prinzipiell gleichartigen Aufbau besitzt. Sie besteht aus einer Doppelschicht von Lipiden, in die Proteine eingelagert sind. Die Lipide aller biologischen Membranen sind amphiphil, d.h. sie bestehen aus einem wasserlöslichen (hydrophilen) Teil und einer fettlöslichen (lipophilen oder hydrophoben) Region. Derartige Moleküle bilden in wässriger Umgebung geordnete Strukturen aus, wobei die hydrophilen Anteile dem Wasser zugewandt sind und die hydrophoben Regionen untereinander Kontakt haben.

Zellmembranen sind zweilagige Schichten solcher Lipidmoleküle, die aufgrund ihres wasserabweisenden Inneren für die meisten Substanzen eine Barriere darstellen. Während unpolare Gase, wie Sauerstoff und Kohlendioxid, sowie einige kleine Moleküle, wie Wasser, Harnstoff und Ethanol, durch sie hindurch diffundieren können, sind biologische Membranen für Ionen und polare Substanzen, wie Glukose oder Aminosäuren, impermeabel. Dadurch ist der Aufbau eines spezifischen intrazellulären Milieus sowie ein gerichteter Stoff-, Energie- und Informationsaustausch der Zelle mit der Umgebung möglich. Der selektive Transport als wichtigste Funktion der Membran wird durch Proteine ermöglicht, die in die etwa 5 nm dicke Lipiddoppelschicht eingelagert sind. Auch diese Membranproteine haben amphiphile Eigenschaften. Dort, wo sie mit dem Inneren der Zellmembran in Kontakt stehen, sind sie hydrophob, während die Anteile, die ins Zytoplasma oder den extrazellulären Raum ragen, hydrophil sind.

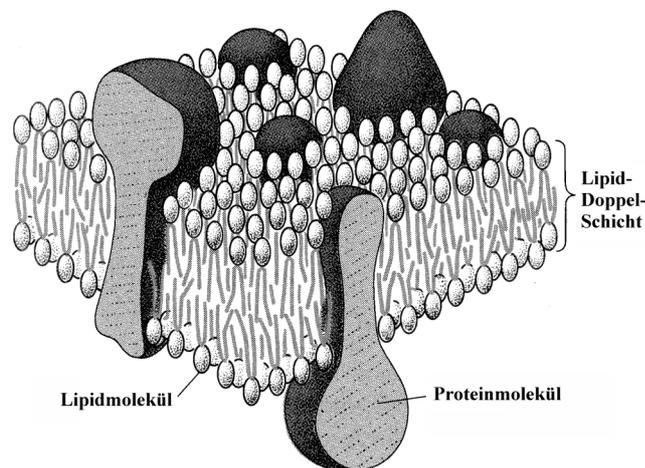


Abb. 1 Schematische Darstellung der semipermeablen Zellmembran mit Lipiden und eingelagerten Proteinen (Grafik aus: Alberts *et al.*, 1991).

Bei den Transportprozessen unterscheidet man zwischen passivem Transport, bei dem Stoffe aufgrund ihres Konzentrationsgefälles wandern, und aktivem Transport, der unter Energieaufwand gegen einen Gradienten erfolgt. Bei Ionen und geladenen Molekülen ist zusätzlich das elektrische Feld zwischen Zellinnerem und Extrazellulärraum zu

berücksichtigen, so daß die physikalische Größe des elektrochemischen Gradienten darüber entscheidet, ob eine Substanz aktiv oder passiv transportiert werden kann.

Die intra- und extrazellulären Konzentrationen der verschiedenen Ionen sind sehr unterschiedlich und werden durch ATP-abhängige Pumpprozesse aufrechterhalten. Als wichtigster aktiver Transporter sorgt die Na^+/K^+ -ATPase für eine niedrige intrazelluläre Natrium- und eine hohe Kaliumkonzentration. Der hierdurch gewonnene Gradient stellt die Triebkraft für die Anreicherung vieler weiterer Substanzen im Zellinneren dar, man spricht dann von sekundär aktivem Transport. Auch Kalzium wird energieabhängig transportiert, so sorgen Ca^{2+} -ATPasen für eine gegenüber der Umgebung rund 10.000fach niedrigere Konzentration dieses Ions im Zellinneren (siehe Zahlenbeispiele in Tabelle 1).

Tab. 1 Übersicht der Konzentrationen und Gleichgewichtspotentiale der physiologisch wichtigsten Ionensorten in einer Säugerzelle (nach West, 1991, und Alvarez-Leefmans, 1990).

Ion	intrazellulär [mM]	extrazellulär [mM]	Gleichgewichtspotential [mV]
Na^+	12	145	+67
K^+	140	4	-95
Ca^{2+}	0,0001	1,8	+131
Cl^-	ca. 4-40	115	ca. -90 bis -30

Die asymmetrische Verteilung von Ionen hat zur Folge, daß sich eine elektrische Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum ausbildet. Diese errechnet sich für eine einzelne Ionensorte X nach der *Nernst'schen Gleichung*.

$$\Delta\phi_X = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[X]_{\text{außen}}}{[X]_{\text{innen}}} \quad (1)$$

Hierbei ist R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, F die Faraday-Konstante und z die Ladung des Ions. Bei Anwesenheit mehrerer Ionensorten mit unterschiedlichen Membranpermeabilitäten, P , gehen deren Konzentrationen mit P gewichtet in die *Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung* ein, die das resultierende Membranpotential beschreibt.

$$E_{\text{Membran}} = \sum_X \Delta\phi_X = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{\sum P_K [K^+]_{\text{außen}} + \sum P_A [A^-]_{\text{innen}}}{\sum P_K [K^+]_{\text{innen}} + \sum P_A [A^-]_{\text{außen}}} \quad (2)$$

Obige Gleichung gilt in dieser Form nur für einwertige Kationen (K) und Anionen (A), so daß z gleich eins ist.

Die tatsächlichen Werte für Membranpotentiale sind je nach Organismus sehr unterschiedlich (s. Tab. 2), der Intrazellulärraum ist dabei immer negativ gegenüber der Zelumgebung. Bei Pflanzen werden z.T. Werte unterhalb von -200 mV erreicht.

Tab. 2 Beispiele für Ruhemembranpotentiale in verschiedenen Zelltypen (nach Richter, 1979).

Organismus	Gattung/Art	Zelltyp	Ruhepotential [mV]
Bakterien	<i>Bacillus subtilis</i>		-60 bis -75
Pflanzen	Acetabularia	Stielzelle	-140 bis -200
	Mimose	Parenchymzelle	-160
	Elodea	Blattparenchymzelle	-278
Invertebraten	Helix	Riesenneuron	-53
	Hirudo	glatte Muskelzelle	-27
	Vertebraten	Ratte	Speicheldrüsenzelle
	Katze	spinales Motoneuron	-60 bis -80

1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle bilden eine spezielle Klasse von Transportproteinen, welche die passive Diffusion von anorganischen Ionen durch die Membran erlauben. Sie bilden einen hydrophilen Kanal durch die Lipiddoppelschicht, der sich in regulierbarer Weise öffnen und schließen kann.

Durch ein Selektivitätsfilter, das nur bestimmte Ionen permeieren läßt, sind einige Kanäle spezifisch für eine Ionensorte. So herrscht eine strikte Trennung zwischen Kationen- und Anionenkanälen. Vertreter innerhalb dieser Gruppen zeigen variables Diskriminierungsvermögen. Während etwa Kalziumkanäle praktisch impermeabel für monovalente Kationen sind, lassen sie auch zweiwertige Barium- und Strontiumionen passieren.

Unterschiedliche externe Stimuli können über eine Konformationsänderung im Protein den Öffnungsmechanismus auslösen. Daraus ergibt sich eine Einteilung der Ionenkanäle nach ihrem Aktivierungsmechanismus. Man kennt Liganden-gesteuerte Kanäle, wie den nikotinischen Azetylcholinrezeptor oder den Glyzinrezeptor, die durch extrazelluläre Neurotransmitter geöffnet werden. Von zytoplasmatischer Seite aus werden z. B. der IP₃-Rezeptor durch Inositol-1,4,5-Trisphosphat oder der Kalium-Einwärtsgleichrichter GIRK durch G-Proteine reguliert. Eine weitere große Gruppe bilden diejenigen Ionenkanäle, deren Öffnung durch das Membranpotential bestimmt wird. Hierzu gehören auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Chloridkanäle der CLC-Familie.

Im folgenden sollen kurz die spannungsgesteuerten Kationenkanäle vorgestellt werden, weil sie durch den gleichen physikalischen Reiz geöffnet werden wie die CLC-Kanäle, nämlich durch Membranpotentialänderungen. Anschließend werden jene Chloridkanäle vorgestellt, über die bislang am meisten strukturelle Informationen vorhanden sind. Schließlich wird genauer auf die Gruppe der CLC-Kanäle eingegangen.

1.2.1 Spannungsgesteuerte Kationenkanäle

Seit Beginn der elektrophysiologischen Forschung standen zunächst Kationenkanäle im Mittelpunkt des Interesses. So gehen die grundlegenden Arbeiten zum Aktionspotential und der Reizleitung an Nerv und Muskel auf Studien an Natrium- und Kaliumkanälen zurück, deren Öffnen durch das Membranpotential gesteuert wird (Hodgkin und Huxley, 1952). Der erste Natriumkanal wurde 1984 kloniert (Noda *et al.*, 1984), es folgten die Klonierung eines Kalziumkanals (Tanabe *et al.*, 1987) und eines Kaliumkanals (Kamb *et al.*, 1987).

Kationenkanäle gehören zu einer Genfamilie, die sich wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläuferkanal entwickelt hat.

Beim Kaliumkanal vom sogenannten *shaker*-Typ, benannt nach einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, bilden vier Monomere mit je sechs Transmembrandomänen den porenbildenden Hauptteil. Eine haarnadelförmige Schleife, der sogenannte „P-loop“, auch H5-Region genannt, taucht von extrazellulär in die Plasmamembran ein und bildet die Kanalpore und das Selektivitätsfilter. Das spannungsabhängige Schalten ist auf die vierte Transmembranhelix zurückzuführen, die zahlreiche positiv geladene Aminosäuren trägt und dadurch zu einem intrinsischen Spannungssensor wird. Änderungen des elektrischen Feldes in der Zellmembran führen zu einer Verschiebung dieser „S4-Helix“, und diese Konformationsänderung überträgt sich auf das Tor.

Spannungsgesteuerte Natrium- und Kalziumkanäle besitzen denselben prinzipiellen Aufbau, allerdings sind hier - wahrscheinlich durch Genduplikation - die Untereinheiten im selben Polypeptid kovalent verknüpft (s. Abb. 2).

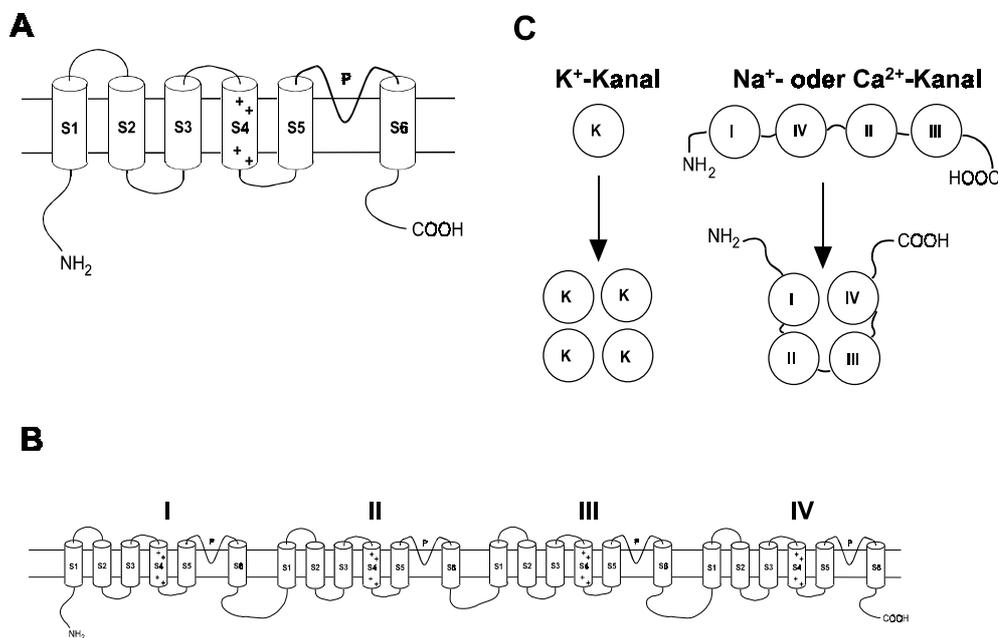


Abb. 2 Topologische Modelle der spannungsabhängigen Kalium- (A) und Natrium- bzw. Kalziumkanäle (B). Zeichnung nach (Aidley und Stanfield, 1996). In (C) wird die tetramere Struktur des Kaliumkanals aus vier separaten Untereinheiten gezeigt und mit der vierfachen Wiederholung homologer Domänen innerhalb eines Polypeptids bei Natrium- und Kalziumkanälen verglichen.

Im weiteren wurden zahlreiche Kationenkanäle kloniert, die Variationen dieser Struktur darstellen. So gibt es einwärtsgerichtete K⁺-Kanäle, deren Monomere nur aus dem „P-Loop“ mit beiderseits je einer flankierenden Transmembrandomäne bestehen, wie „ROMK“ (Ho *et al.*, 1993), oder die „TWIK“-Kanäle (Lesage *et al.*, 1996), die eine Verdopplung dieses Motifs darstellen. Bei den „TOK“-Kanälen (Ketchum *et al.*, 1995) ist praktisch ein *shaker*-Kaliumkanal am Carboxyterminus mit einem „Einwärtsgerichteter“ fusioniert. Allen gemeinsam ist aber der „P-Loop“ als porenformende Struktur.

Die durch zyklische Nucleotide aktivierten Kanäle entsprechen strukturell im wesentlichen den *shaker*-Kaliumkanälen (Henn *et al.*, 1995; Yau, 1994), während der Amilorid-sensitive, epitheliale Natriumkanal wiederum ein Multimer aus Untereinheiten mit zwei Transmembrandomänen ist (Canessa, 1994).

1.2.2 Chloridkanäle im Überblick

Da Chlorid das häufigste kleine Anion ist, wird der Hauptionenfluß durch Anionenkanäle von Cl^- getragen, auch wenn die Permeabilität für andere negativ geladene Ionen größer sein sollte. Die meisten Anionenkanäle können daher als Chloridkanäle bezeichnet werden.

In fast allen Zellen lassen sich Chloridkanäle in der Plasmamembran nachweisen. Eine Vielzahl von ihnen ist in den letzten 20 Jahren mit elektrophysiologischen Methoden charakterisiert worden, und ihre Leitfähigkeitseigenschaften, Aktivierungsmechanismen und ihre Pharmakologie sind zum Teil gut bekannt. Einer genaueren molekularbiologischen Untersuchung sind seit einigen Jahren diejenigen Chloridkanäle zugänglich, die kloniert und in ihrer Aminosäuresequenz aufgeklärt sind. Sie lassen sich in drei Klassen einteilen:

1. ligandengesteuerte Glycin- und γ -Aminobuttersäure(GABA)_A-Rezeptoren
2. der nukleotidabhängige CFTR
3. spannungsregulierte Kanäle der CLC-Familie

1. Glycin- und GABA_A -Rezeptoren

Diese beiden ligandengesteuerten Chloridkanäle gehören zur gleichen Proteinfamilie wie auch die kationenselektiven Acetylcholin- und Serotoninrezeptoren (5-HT_3). Ihnen gemeinsam ist der pentamere Aufbau aus fünf homolog aufgebauten Untereinheiten in der Zusammensetzung $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (GABA_A -Rez.) bzw. $\alpha_3\beta_2$ (Glyzin-Rez.). Die Ligandenbindungsstelle befindet sich auf den α -Untereinheiten. Jedes Monomer besitzt extrazelluläre N- und C-Termini und enthält vier Transmembrandomänen (s. Abb. 3). Jeweils die zweite (M2) ist an der Bildung der Pore beteiligt und für das Selektivitätsfilter verantwortlich (Barnard *et al.*, 1987; Betz, 1992; Langosch *et al.*, 1988).

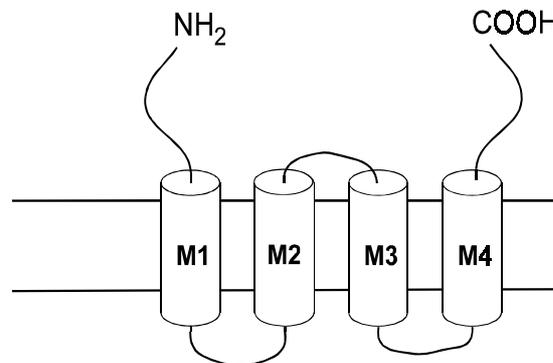


Abb. 3 Topologiemodell einer Untereinheit von GABA_A - oder Glycin-Rezeptoren.

Beide Rezeptoren sind für schnelle, inhibitorische Signale an Synapsen im Zentralnervensystem verantwortlich. Durch die Kanalöffnung erhöht sich die Chloridleitfähigkeit und gemäß Gleichung (2) wird das Membranpotential dann stärker durch das Chlorid-Gleichgewichtspotential (ca. -30mV) bestimmt. Die zur Auslösung von Aktionspotentialen notwendige Depolarisation ist somit erschwert. Es existieren jedoch auch Neurone, bei denen durch eine ungewöhnlich hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentration GABA als exzitatorischer Transmitter wirkt (Cherubini *et al.*, 1991; Staley *et al.*, 1996; Staley *et al.*, 1995).

Funktionszerstörende Mutationen in der α -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors führen wegen des dann fehlenden inhibitorischen Einflusses (Rajendra und Schofield, 1995) zu einer

seltenen Form erblicher Übererregbarkeit des Nervensystems (Hyperekplexie / „startle disease“).

2. Der „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)

Der CFTR gehört in die funktionell sehr heterogene Klasse der ABC-Transportproteine (Higgins, 1992; Riordan, 1993). Ihr gemeinsames Merkmal sind zytosolische ATP-Bindungsdomänen (ATP-Binding-Cassette). Diese treten beim CFTR jeweils nach sechs transmembranen α -Helices auf (s. Abb. 4), so daß man zwei homologe, aber nicht identische, Hälften des Proteins vorfindet, zwischen denen eine regulatorische (R)-Domäne liegt (Higgins, 1992; Riordan *et al.*, 1989). Die Regulation von CFTR erfolgt über die cAMP-abhängige Phosphorylierung der R-Domäne durch Proteinkinase A sowie Anlagerung von ATP an die Nukleotidbindungsstellen.

Mutationen im Gen für CFTR, die zum Funktionsverlust führen, verursachen die zystische Fibrose (Mukoviszidose). Diese häufigste angeborene, autosomal rezessive Erkrankung unter Menschen europiden Typs beruht auf einer Störung der epithelialen Elektrolyttransportvorgänge. Die Patienten leiden vor allem an der Retention zähflüssigen Schleims im Respirationstrakt. Dessen bakterielle Infektion führt in der Folge zu Gewebsdestruktion und Funktionsverlust der Lunge. Auch im exokrinen Pankreas kommt es zu Sekretionsstörungen. Die weitaus häufigste CFTR-Mutation ist die Deletion von Phenylalanin 508, die zu einer Prozessierungsstörung des Proteins führt (Lukacs *et al.*, 1993; Welsh *et al.*, 1993). Zusätzlich zu seiner Funktion als cAMP-aktivierter Chloridkanal reguliert CFTR möglicherweise auswärtsgerichtete Chloridkanäle (Schwiebert *et al.*, 1995) und inhibiert Natriumkanäle (Ismailov *et al.*, 1996; Stutts *et al.*, 1995). Hierbei wird eine Beteiligung von extrazellulärem ATP in Betracht gezogen (Schwiebert *et al.*, 1995). Ob CFTR selbst eine ATP-Leitfähigkeit besitzt wird derzeit kontrovers diskutiert (al-Awqati, 1995; Cantiello, 1997; Devidas und Guggino, 1997; Prat *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996).

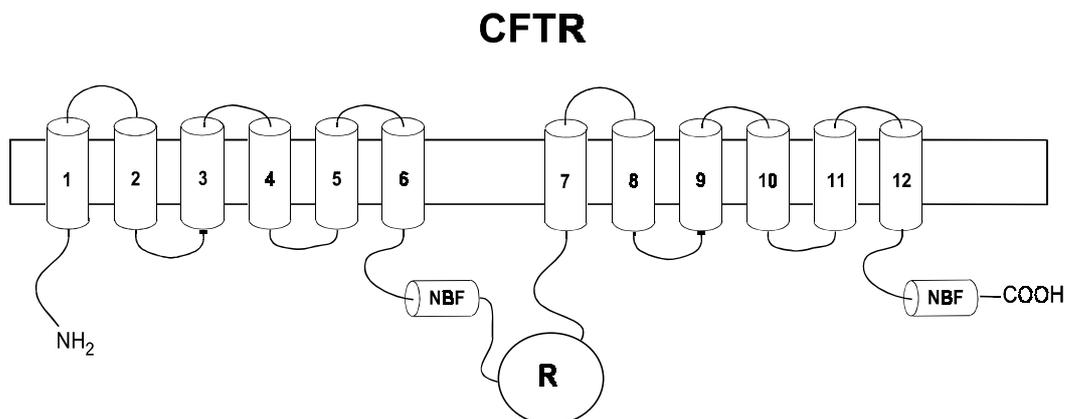


Abb. 4 Topologiemodell von CFTR. NBF (nucleotide binding fold) = Nukleotid-Bindungsdomäne, R = regulatorische Domäne.

1.2.3 Spannungsgesteuerte CLC-Chloridkanäle

Bereits Ende der siebziger Jahre wurde ein spannungsregulierter Chloridkanal im elektrischen Organ des Rochens *Torpedo marmorata* durch elektrophysiologische Techniken

charakterisiert (Miller und White, 1980; White und Miller, 1979). Die molekulare Identifizierung gelang aber erst 1990 durch Expressionsklonierung dieses CIC-0 genannten Kanals (Jentsch *et al.*, 1990). Mittlerweile sind CLC-Kanäle auch bei Prokaryonten (Fujita *et al.*, 1994), Hefen (Greene *et al.*, 1993), Pflanzen (Hechenberger *et al.*, 1996) und diversen Tierstämmen (Jentsch, 1996) gefunden worden.

Die Suche nach Homologen bei Säugern begann zunächst mit dem Durchmustern von cDNA-Bibliotheken und ergab als ersten Vertreter CIC-1, den Hauptchloridkanal des Skelettmuskels (Steinmeyer *et al.*, 1991), und den ubiquitär exprimierten CIC-2 (Thiemann *et al.*, 1992). Da der humane CIC-1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, wird er ausführlicher in einem separaten Abschnitt beschrieben.

In elektrophysiologischen Experimenten ließ sich CIC-2 nur durch unphysiologische Hyperpolarisation aktivieren und lieferte einwärts gerichtete Ströme. Doch zeigte sich dann, daß er auch bei hypo-osmotischem Streß und folgendem Anschwellen der Zelle öffnet. Eine aminoterminal, zytoplasmatische Region konnte als Inaktivierungsdomäne identifiziert werden, die die Pore von der intrazellulären Seite her verschließt (Gründer *et al.*, 1992; Jordt und Jentsch, 1997). Diese Funktion übt sie auch nach Transplantation an den Carboxyterminus, also positionsunabhängig, aus. In Analogie zu einem äquivalenten Mechanismus beim *shaker*-K⁺-Kanal wird dieses als „Ball-und-Kette“-Modell bezeichnet. Für CIC-2 wird eine wichtige Funktion bei der zellulären Volumenregulation angenommen, wofür auch sein ubiquitäres Vorkommen in unterschiedlichsten Zelltypen spricht.

Ausgehend von den ersten drei CLC-Kanälen (CIC-0, -1, -2) konnten evolutionär konservierte Aminosäuresequenzen identifiziert werden. Durch Synthese degenerierter Primer für diese Regionen und „Reverse-Transkriptase-PCR“ ließen sich weitere Homologe identifizieren. Von den nierenspezifisch exprimierten Kanälen CIC-Ka, -Kb (in Ratte CIC-K1 und K2) (Kieferle *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1993) und CIC-5 (Fisher *et al.*, 1995; Steinmeyer *et al.*, 1995) ist nur der letzte bisher reproduzierbar heterolog exprimiert worden. Er ist streng auswärtsgleichrichtend und aktiviert nur bei starker Depolarisation. Seine physiologische Rolle bei der Bereitstellung eines Chloridstroms in Endozytosevesikeln als Ladungsausgleich für die elektrogene H⁺-Pumpe in Nierentubuluszellen wird diskutiert. Ein Defekt dieses Kanals führt zu einer seltenen erblichen Form von Nierensteinen (*Dent's Disease*), die mit Hyperkalziurie und niedermolekularer Proteinurie einhergeht (Lloyd *et al.*, 1996; Lloyd *et al.*, 1997).

Obwohl bislang nur eine Arbeitsgruppen angibt, Chloridströme an CIC-K-Kanälen messen zu können (Uchida *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1995), ist zumindest für CIC-Kb eine Beteiligung am Ionentransport in der Niere sehr wahrscheinlich, denn erbliche Defekte dieses Kanals führen zur Elektrolytresorptionsstörung *Bartter-Syndrom* (Simon *et al.*, 1997).

Aufgrund ihrer Sequenzhomologie sind bisher CIC-3 (Borsani *et al.*, 1995), CIC-4 (van Slegtenhorst *et al.*, 1994), CIC-6 und CIC-7 (Brandt und Jentsch, 1995) als Chloridkanäle postuliert worden. Ähnlich wie bei CIC-5 könnte eine Lokalisation in intrazellulären Kompartimenten der Grund dafür sein, daß an der Zellmembran keine Ströme meßbar sind. Weiterhin ist es möglich, daß der richtige Aktivierungsmodus bisher nicht gefunden wurde, oder daß weitere akzessorische Untereinheiten notwendig sind, wie es für viele Kationenkanäle bereits gezeigt wurde (Adelman, 1995; Isom *et al.*, 1994). Die bisher publizierten elektrophysiologischen Messungen an CIC-3 (Kawasaki *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*, 1994) werden derzeit noch kontrovers diskutiert.

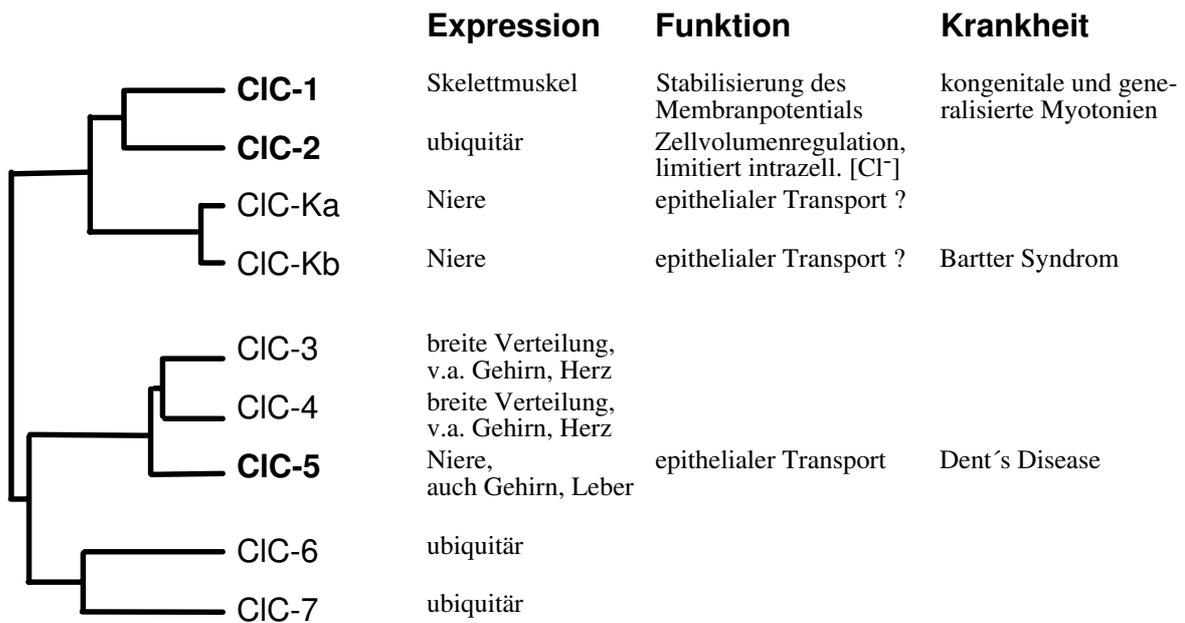


Abb. 5 Dendrogramm der Mitglieder der CLC-Familie in Säugern. Drei Subfamilien lassen sich abgrenzen, die weniger als 30% Sequenzhomologie zueinander aufweisen. Funktionen oder assoziierte Krankheiten sind nur aufgelistet, wo sie bekannt sind. Proteine mit nachgewiesener Kanalfunktion sind fett dargestellt. Für CIC-Kb liegt wegen der Beteiligung am Bartter-Syndrom eine Kanalfunktion nahe.

Bei elektrophysiologischen Messungen am CIC-0 zeigt sich ein Verhalten, daß auf die Anwesenheit von zwei Poren pro Kanal schließen läßt und zum „double-barrel“-Modell führte (Miller, 1982; Miller und White, 1984). Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß ein Kanal tatsächlich aus der Kombination zweier Monomeren besteht, von denen jedes eine separate Pore bildet (Ludewig *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 1996). Frühe Untersuchungen an CIC-1 mit dominant negativen Mutanten legten zunächst eine tetramere Struktur dieses Kanals nahe (Steinmeyer *et al.*, 1994). Neuere Daten ließen jedoch Zweifel aufkommen, und auch für CIC-1 werden jetzt Dimere diskutiert (Fahlke *et al.*, 1997). Weitergehende Studien - auch an anderen Familienmitgliedern - müssen noch zeigen, ob alle CLC-Kanäle die gleiche Untereinheitenstruktur aufweisen.

Zumindest im heterologen *Xenopus*-Oozyten-System konnte auch eine Heteromerisierung von Kanälen demonstriert werden. Bei Koexpression von CIC-1 und CIC-2 ergaben sich Ströme mit neuen Eigenschaften, die nicht durch bloße Addition der Einzelströme erklärt werden konnten (Lorenz *et al.*, 1996).

Einen intrinsischen Spannungssensor, entsprechend der S4-Helix in K⁺-, Na⁺- oder Ca²⁺-Kanälen findet man bei CIC-Kanälen nicht. Zumindest für CIC-0 konnte gezeigt werden, daß das permeierende Anion selbst für das potentialabhängige Schalten verantwortlich ist (Pusch *et al.*, 1995).

1.2.4 Die Eigenschaften des humanen Skelettmuskelkanals hCIC-1

Der humane CIC-1 (hCIC-1) besteht aus 988 Aminosäuren und wird praktisch ausschließlich im Skelettmuskel exprimiert. Die entsprechende mRNA-Synthese steigt (bei Mäusen) nach der Geburt an (Steinmeyer *et al.*, 1991) und sinkt bei Denervation des Muskels ab (Klocke *et al.*, 1994). Die Aufgabe von hCIC-1 ist es, das Ruhemembranpotential der Muskelzellen zu stabilisieren. Da hier etwa 70-85% der Leitfähigkeit durch Chloridkanäle erzeugt wird,

entspricht die Membranspannung in etwa dem Gleichgewichtspotential von Cl⁻ (Bretag, 1987). ClC-1 trägt dadurch wesentlich zur Repolarisation des muskulären Aktionspotentials bei. Ein Defekt dieses Kanals durch funktionszerstörende Mutationen führt zum Krankheitsbild der Myotonie¹. Diese Muskelsteifigkeit tritt vor allem nach willkürlichen Kontraktionen auf und beruht auf wiederholten Aktionspotentialen („myotonic runs“), die zur Tetanisierung führen.

Man unterscheidet zwischen der dominant vererbten Myotonie (*myotonia congenita*), die nach dem Erstbeschreiber auch als *Thomsen*-Typ bezeichnet wird, und der rezessiven *Becker'schen* Myotonie (*myotonia generalisata*). Der dominante Effekt beruht darauf, daß bestimmte Mutationen (z. B. P480L in Thomsens eigener Familie) die potentialabhängige Öffnung der Kanäle zu sehr positiven Werten verschiebt. Im Kanalmultimer werden über einen bislang noch unbekanntem Mechanismus auch nichtmutierte Untereinheiten gleichsinnig beeinflusst, so daß es zu einer insgesamt verminderten Chloridleitfähigkeit im physiologischen Spannungsbereich kommt (Pusch *et al.*, 1995).

Rezessive vererbte Mutationen sind weitgehend auf einen kompletten Funktionsverlust des Kanals zurückzuführen oder entstehen durch stark reduzierte Einzelkanalströme (Meyer-Kleine *et al.*, 1995; Wollnik *et al.*, 1997), die für den Wildtyp bei etwa 1pS liegen. Sinkt die Chloridleitfähigkeit unter 30% des Normalwertes, so lassen sich klinische Symptome feststellen (Barchi, 1975; Kwiecinski *et al.*, 1988; Palade und Barchi, 1977). Auch bei Mäusen (Steinmeyer *et al.*, 1991) und Ziegen (Beck *et al.*, 1996) finden sich ClC-assoziierte Myotonien, so daß diese als Tiermodelle dienen können. Das Spektrum der Mutationen erstreckt sich dabei von Aminosäureaustauschen über Insertionen bis hin zu Trunkationen des Kanalproteins (Meyer-Kleine *et al.*, 1995), hierauf wird im Verlauf dieser Arbeit an passender Stelle weiter eingegangen.

1.3 Grundlagenwissen zu Membranproteinen

1.3.1 Sekundär- und Tertiärstruktur

Ein Verständnis der biologischen Aufgabe und Wirkungsweise von Proteinen läßt sich zwar teilweise durch indirekte experimentelle Ansätze erreichen, zu einem besseren Verständnis, insbesondere der molekularen Mechanismen ihrer spezialisierten Funktion, kommt man aber erst durch die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur. Letztendlich ist es möglich, einzelnen Aminosäuren, ja sogar einzelnen Atomen, eine definierte Aufgabe im Rahmen der Struktur oder biologischen Aktivität zuzuordnen.

Die detailliertesten Informationen über den Aufbau eines Biomoleküls erhält man derzeit durch die Röntgenstrukturanalyse, mit der eine Auflösung bis auf wenige Ångström erzielt werden kann. Hierzu muß ein Protein in Form dreidimensionaler Kristalle vorliegen, was für wasserlösliche, zytoplasmatische Proteine verhältnismäßig leicht erreicht werden kann und hier bereits zu einer großen Zahl von aufgeklärten Raumstrukturen geführt hat. Bei Membranproteinen gelingt dies wegen ihres hohen Anteils an hydrophoben Bereichen nur unter großen Schwierigkeiten, z.T. durch Kokristallisation mit Detergentien. Selbst wenn man Kristalle ausreichender Homogenität und Größe erhält, bleibt immer noch eine gewisse Unsicherheit, ob die vorliegende Tertiärstruktur der nativen Form entspricht. Aus diesem Grund sind erst

¹ Es existieren noch weitere Ursachen für Myotonien, wie z. B. Mutationen im spannungsabhängigen Natriumkanal bei *Paramyotonia congenita*, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Ebenso bleiben myotone Dystrophien unerwähnt.

für wenige Membranproteine exakte Strukturinformationen verfügbar. Für die atomare Aufklärung des photosynthetischen Reaktionszentrums aus dem Bakterium *Rhodospseudomonas viridis* (Deisenhofer *et al.*, 1985; Deisenhofer *et al.*, 1984) wurde der Nobelpreis vergeben. Weitere Beispiele für aufgeklärte Proteinstrukturen, die allerdings durch Elektronenmikroskopie und Elektronen- und Neutronenbeugung an zweidimensionalen Kristallen gewonnen wurden, sind das Bakteriorhodopsin (Henderson *et al.*, 1990; Henderson und Unwin, 1975; Popot *et al.*, 1989) und der „Light-Harvesting-Complex II“ (Kühlbrandt und Wang, 1991; Kühlbrandt *et al.*, 1994).

Bei diesen Proteinen wird der transmembranäre Anteil von Bündeln aus α -Helices mit überwiegend hydrophoben Aminosäuren gebildet. Diese Sekundärstruktur ist (neben der sogenannten „3(10)-Helix“) prädestiniert für eine apolare Umgebung, da alle Sauerstoff- und Stickstoffatome des Peptidrückgrats durch intramolekulare Wasserstoffbrücken abgesättigt werden können, eine essentielle Bedingung für die stabile Einlagerung in die Membran. Der Energieaufwand für das Lösen einer einzelnen H-Brücke in apolarer Umgebung liegt bei rund 20kJ/mol. Dadurch würde sich die Gleichgewichtskonstante für die Verteilung dieser Helix zwischen wässrigem und apolarem Milieu bereits um einen Faktor $\sim 10^{-4}$ verschieben (Engelman und Steitz, 1981). Noch ungünstiger wirken sich geladene Gruppen aus. Für das Einbringen eines protonierten Lysinrestes in die Lipidschicht wird der Energieaufwand mit ~ 35 kJ/mol angegeben (Engelman *et al.*, 1986).

Die Helices lagern sich lateral zusammen, wobei sie meist leicht schräg zur Membranoberfläche orientiert sind und auch zueinander einen Winkel ausbilden (s. Abb. 6B). Hierbei kommen sie sich so nahe, daß *van-der-Waals*-Kräfte zwischen ihnen wirksam werden. Wegen der kurzen Reichweite dieser Kräfte (Wechselwirkungsenergie $E_w \sim r^{-6}$) müssen dabei die Kontaktflächen sehr gut aufeinander abgestimmt sein, wobei die C...C-Abstände zwischen Helices bei etwa 0,4nm liegen (Karle, 1994). Zusätzliche starke Wechselwirkungen können durch interhelikale H-Brücken oder Ionenpaare geladener Aminosäuren erreicht werden.

Aus den genannten energetischen Beschränkungen ergeben sich direkte Konsequenzen für die Struktur von Transmembranhelices. Ihre Mindestlänge muß etwa 20 Aminosäuren betragen, wenn sie den hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht von etwa 3 nm senkrecht durchspannen soll². Tatsächlich gelang es aber auch künstliche Transmembranhelices zu erzeugen, die aus nur 9 bzw. 11 Valinen bestanden (Chen und Kendall, 1995; Kuroiwa *et al.*, 1991). Es sind jedoch 15 Alanine notwendig, so daß offenbar eine inverse Korrelation zwischen Gesamt-Hydrophobizität und minimal erforderlicher Aminosäureanzahl besteht. Wegen der heterogenen Zusammensetzung und des schrägen Verlaufs findet man meist 20-27 Aminosäuren pro Transmembranhelix in den bisher untersuchten Proteinen (Popot *et al.*, 1994). Weiterhin besitzen die Helices auf ihrer Lipid-zugewandten Seite ausschließlich hydrophobe Aminosäuren, während polare und geladene Reste ins Proteininnere weisen und durch geeignete Wechselwirkungen abgeschirmt werden.

Einen völlig anderen Aufbau zeigen Porine, Proteine der äußeren bakteriellen Membran (s. Abb. 6A). Sie bilden weite Poren mit einer Wandung aus β -Faltblattstrukturen, die z. B. bei *Rhodobacter capsulatus* aus 16 antiparallelen Strängen mit 6-17 Aminosäuren gebildet werden (Weiss *et al.*, 1991). Wegen des periodischen Wechsels zwischen apolaren und polaren bzw. geladenen Resten entlang des Peptidrückgrats, ist die Gesamthydrophobizität gering. Die faßartigen Protomere mit hydrophober Außen- und hydrophiler Innenseite lagern sich zu Oligomeren zusammen.

² bei 3,6 Aminosäuren pro Windung einer α -Helix mit 0,5nm Ganghöhe

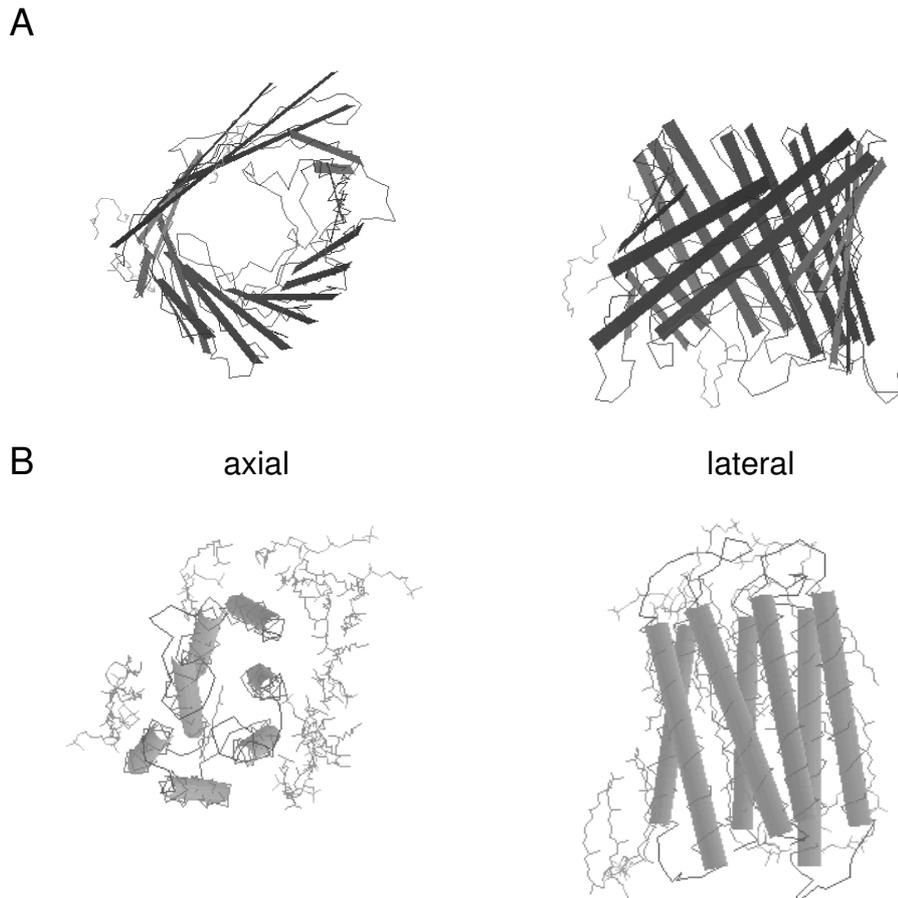


Abb. 6 Axiale und laterale Ansicht des Porins der bakteriellen äußeren Membran (A) und von Bakteriorhodopsin (B). Dargestellt ist das Peptidrückgrat; β -Faltblätter als dunkle Streifen. α -Helices als graue Zylinder (Grafiken aus GENE BANK mit NENTREZ dargestellt).

Bei Bakterien und Mitochondrien findet man β -Faltblatt-Membranproteine in der äußeren Membran (Elkeles *et al.*, 1995), nicht aber in der inneren Zellmembran von Prokaryonten oder der Plasmamembran von Eukaryonten. Die spezielle Struktur hängt wahrscheinlich mit dem besonderen Biosyntheseweg zusammen: Bakterielle Porine werden im Zytoplasma synthetisiert, müssen dann aber erst komplett die hydrophobe innere Membran überwinden, bevor sie den wässrigen periplasmatischen Raum passieren und *in toto* in die äußere Membran integrieren. Dies läßt sich mit β -Faltblättern offenbar leichter bewerkstelligen als mit Bündeln hydrophober Helices (Popot *et al.*, 1994).

Die Zahl der bisher detailliert untersuchten Proteine ist noch sehr gering. Obwohl es verlockend ist, aus den vorhandenen Daten bereits jetzt allgemeine Bauprinzipien abzuleiten, sollte man dabei sehr zurückhaltend sein. Dies ist nicht zuletzt wegen des begrenzten strukturellen Spektrums der analysierten Proteine angebracht. Gerade die Gruppe der Ionenkanäle mit der Aufgabe der Ionenpermeation stellt ganz andere Ansprüche an die Proteinstruktur als z. B. das Rhodopsin. So ist es nicht verwunderlich, in dieser Proteinklasse einen vergleichsweise hohen Gehalt an geladenen und polaren Aminosäuren in Transmembranbereichen zu finden. Gerade solche Strukturen, die für spezialisierte Funktionen, wie der Porenbildung oder der Bereitstellung eines Spannungssensors zuständig sind, weichen vom üblichen Bild der Helix ab. Dabei treten lokal offenbar auch β -Faltblatt-ähnliche Sekundärstrukturen auf, wie in der „H5-“ oder „S-loop“-Region in spannungsregulierten Kationenkanälen (Bogusz und Basath, 1992; Bogusz *et al.*, 1992; Lü und Miller, 1995; Yool und Schwarz, 1991) oder in den vier Transmembrandomänen des nikotinischen

Acetylcholinrezeptors, obwohl hier teilweise konträre experimentelle Daten publiziert wurden (Akabas *et al.*, 1992; Baenziger und Methot, 1995; Blanton und Cohen, 1994; Gorne-Tschelnokow *et al.*, 1994; Hucho *et al.*, 1994; Ortells und Lunt, 1996; Unwin, 1993). Wirkliche Mischformen aus α -Helices und größeren β -Faltblättern, wie bei zytoplasmatischen Proteinen, sind also bislang bei Membranproteinen nicht eindeutig bewiesen.

1.3.2 Biosynthese von Proteinen am endoplasmatischen Retikulum

1.3.2.1 Sezernierte Proteine

Erste mechanistische Erkenntnisse über die Synthese von Proteinen am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) stammen aus den 70er Jahren. Nach der Isolierung der wichtigsten beteiligten Proteinfaktoren waren *in vitro*-Rekonstitutionsexperimente möglich, die schließlich zur bis heute prinzipiell gültigen Signalthypothese führten (Blobel und Dobberstein, 1975; Blobel und Dobberstein, 1975; Blobel *et al.*, 1979). Hiernach werden sekretorische Proteine an ihrer spezialisierten N-terminalen Aminosäuresequenz erkannt, zum ER dirigiert und während der Synthese gleichzeitig in dessen Lumen transloziert. Auch integrale Membranproteine werden in der ersten Phase nach dem gleichen Schema synthetisiert.

Im folgenden werden zunächst die wichtigsten Schritte der Biosynthese rekapituliert, da dies zum Verständnis der Topologie bei Membranproteinen Voraussetzung ist. Detaillierte Überblicke neueren Datums finden sich z. B. bei (Rapoport *et al.*, 1996; Walter und Johnson, 1994). Abbildung 7 zeigt die wichtigsten Teilschritte dieses von Prokaryonten bis zu Säugern konservierten Vorgangs.

- a) Nach Synthese der ersten 50-70 Aminosäuren an freien Ribosomen erscheint das *Signalpeptid*, ein aminoterminaler Abschnitt von 15-30 Aminosäuren, von denen 6-12 aufeinanderfolgende hydrophob sind. Diese Sequenz wird zusammen mit dem Ribosom spezifisch von einem Ribonukleoprotein, dem *signal-recognition-particle (SRP)*, gebunden. Dadurch erhöht sich die Affinität des SRP für GTP, welches gegen das bereits vorhandene GDP ausgetauscht wird. Nach Bindung des SRP pausiert die Translation zunächst.
- b) Der gesamte Komplex lagert sich nun an die Membran des endoplasmatischen Retikulums an. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen des SRP mit dem SRP-Rezeptor (SR) einerseits und dem Ribosom mit dem *Translocon* andererseits. Um zu verhindern, daß es zu unspezifischen Interaktionen von Ribosom und Translocon kommt, existieren besondere heterodimere Proteine (*nascent chain associated complex, NAC*), die an wachsende Polypeptidketten ohne Signalsequenz binden und die Anlagerung an das ER verhindern (Wiedmann *et al.*, 1994).

Der SR ist ein heterodimeres Membranprotein. Während SR- β eine echte Transmembrandomäne besitzt, ist SR- α nur über seinen N-Terminus und SR- β ans ER geheftet. Beide Untereinheiten binden und spalten GTP.

Beim Translocon handelt es sich um einen multimeren Komplex integraler Membranproteine. Wesentlicher Bestandteil ist der aus drei Proteinen (α , β , γ) zusammengesetzte Sec61p-Komplex (SecYEGp bei Prokaryonten). Dieser bildet den Proteinkanal, durch den die wachsende Polypeptidkette ins ER-Lumen gelangt. Vor der Ribosomenbindung ist dieser Kanal auf der ER-Seite geschlossen.

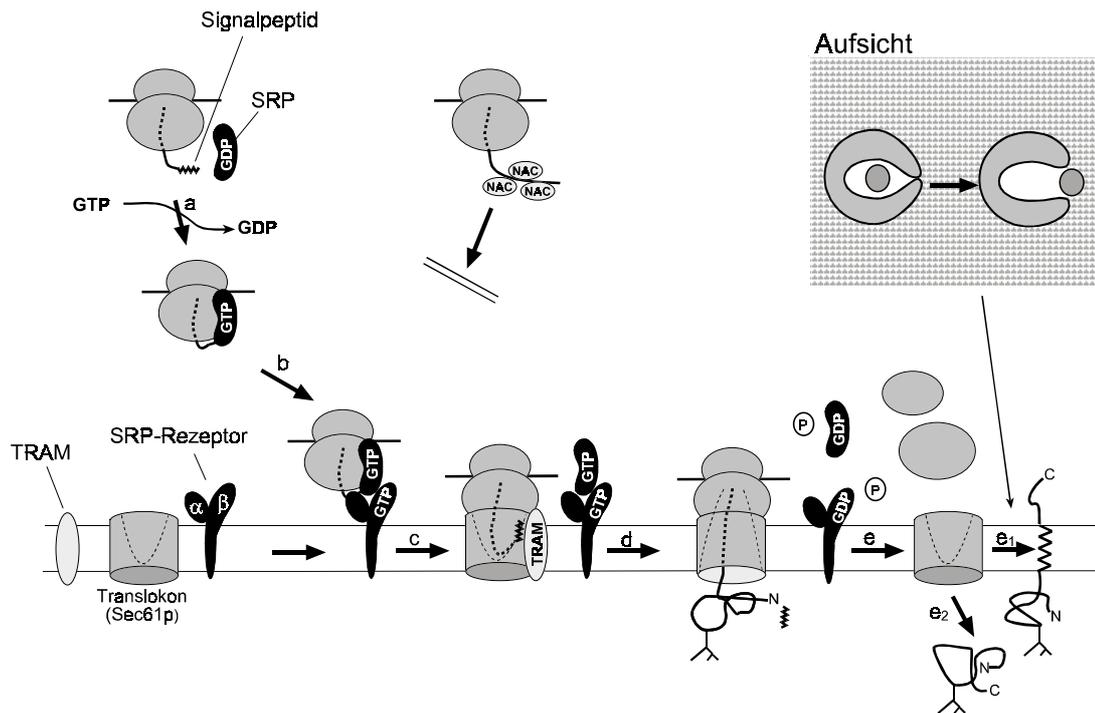


Abb. 7 Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese am rauhen endoplasmatischen Retikulum nach (Walter und Johnson, 1994). Zusatzgrafik: Aufsicht auf das sich lateral öffnende Translocon mit der seitlich in die Membran austretenden Helix (nach Martoglio *et al.*, 1995). Erläuterungen im Text.

- c) Nach der Anlagerung des Ribosoms an das Translocon dissoziieren SRP und SR ab und die Translationspause ist beendet. Ein weiteres Membranprotein, das *translocating chain associated membrane protein (TRAM)*, ist für die cotranslationale Translokation einiger, aber nicht aller Proteine erforderlich. TRAM kommt dabei in direkten Kontakt mit dem Signalpeptid, und offenbar entscheidet dessen Struktur darüber, ob TRAM benötigt wird (Dierks *et al.*, 1996; Voigt *et al.*, 1996). In jedem Fall scheint aber ein zweiter Erkennungsschritt - neben der Bindung des SRP - zu existieren, an dem das Signalpeptid beteiligt ist. Hierbei werden auch Wechselwirkungen mit Membranlipiden diskutiert ((Siegel, 1995) und Zitate darin).

Bei *in vitro*-Studien erwiesen sich Sec61p, SRP und TRAM als ausreichend für die Translation aller bisher getesteten sekretorischen Proteine, weitere Komponenten sind sicherlich für die Optimierung und Regulation *in vivo* notwendig.

- d) Erst wenn das Ribosom den zytoplasmatischen Eingang des Translocons abgedichtet hat, öffnet sich der Kanal zum ER-Lumen, ähnlich einem Liganden-gesteuerten Ionenkanal. Dabei entsteht eine durchgehende, wassergefüllte Verbindung bis zur Proteinsyntheseregion des Ribosoms. Tatsächlich konnten elektrophysiologisch Einzelkanalleitfähigkeiten von 220pS gemessen werden, nachdem die Polypeptidkette durch Puromycinbehandlung entfernt wurde (Simon und Blobel, 1991). Löst man jedoch durch Hochsalzbehandlung auch das Ribosom ab, so schließt sich der Kanal wieder.

Weitere katalytische Aktivitäten sind mit dem Translocon verbunden: Eine spezielle Peptidase spaltet das Signalpeptid ab. Das bei Säugern aus fünf Untereinheiten bestehende Enzym erkennt keine exakte Sequenz, die Schnittstelle liegt in der Regel aber an der Grenze zwischen hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren und zeichnet sich durch kleine ungeladene Reste an den Positionen -1 und -3 aus.

Bereits kotranslational findet u.a. eine Modifikation des Polypeptids mit Zuckerketten an Asparaginresten statt (Chen *et al.*, 1995; Imperiali und Rickert, 1995). Bei dieser Art der

Glykosylierung wird zunächst am Membranlipid Dolicholphosphat ein verzweigtes Kernglycosid durch Verkettung von Nucleosid-aktivierten N-Acetylglucosaminen und Mannosen erzeugt. Dieses wird dann *in toto* auf den Amidstickstoff von Asparaginen transferiert. Das Enzym, die Oligosaccharidtransferase, besteht bei Säugern aus mindestens drei Untereinheiten und erkennt die Aminosäuresequenz N X S/T, wobei X kein Prolin sein darf, auch hinter S/T sollte kein Prolin vorkommen (Gavel und von Heijne, 1990). Diese katalytische Aktivität ist ausschließlich auf der luminalen Seite der ER-Membran lokalisiert.

Nach dem Andocken des Ribosoms ans Translocon trennen sich das SRP und sein Rezeptor unter GTP-Spaltung und stehen für eine neue Translokationsrunde zur Verfügung.

- e) Für sezernierte Proteine endet die Translation mit der Verknüpfung der letzten Aminosäure. Die Polypeptidkette löst sich dann vom Ribosom, welches daraufhin vom Translocon abdissoziiert (e in Abb. 7).

1.3.2.2 Integrale Proteine mit einer Transmembrandomäne

Bei integralen Membranproteinen kommt ein weiterer Schritt zu den in 1.3.2.1 skizzierten hinzu, nämlich der Einbau der hydrophoben Transmembranhelix in die Lipiddoppelschicht. Durch Photocrosslinking-Experimente konnte gezeigt werden, daß hydrophobe Regionen der wachsenden Polypeptidkette nicht nur mit dem Sec61p Komplex, sondern auch mit Membranlipiden in Kontakt stehen (Martoglio *et al.*, 1995). Daraus entstand die Modellvorstellung eines sich seitlich öffnenden Translocons (Zusatz-Zeichnung in Abb. 7), aus dem sich die Membranhelix lateral herausbewegt. Membranproteine können aufgrund der Orientierung ihrer Amino- und Carboxytermini und der An- oder Abwesenheit eines abspaltbaren Signalpeptids in vier Klassen unterteilt werden (von Heijne und Gavel, 1988).

Proteine des Typ 1 besitzen Dank eines spaltbaren Signalpeptids einen extrazellulären Aminoterminus (s. Abb. 8). Das Erscheinen einer weiteren hydrophoben Helix im Translocon führt dazu, daß diese in die Membran eingebaut wird, und die im folgenden angehängten Aminosäuren auf zytoplasmatischer Seite verbleiben. Man bezeichnet daher diese Transmembrandomäne als *Stop-Transfer-Sequenz*.

Beim Typ 2 fungiert der erste hydrophobe Abschnitt als Signalsequenz. Diese wird aber nicht abgespalten, sondern verbleibt in der Membran und bildet eine Transmembranhelix, während alle folgenden Teile der Polypeptidkette ins ER-Lumen transloziert werden. Ein solcher *Signalanker* liegt meist nicht direkt am Aminoterminus, sondern folgt nach einem mehr oder weniger langen hydrophilen N-Terminus.

Es gibt auch Membranproteine (Typ 3), bei denen Signalanker-Sequenzen eine entgegengesetzte Orientierung einnehmen, so daß der N-Terminus extrazellulär liegt. Die Entscheidung, ob ein Protein vom Typ 2 oder Typ 3 ist, wird nach heutigen Erkenntnissen nicht vom Signalanker selbst, sondern von den flankierenden hydrophilen Sequenzen bestimmt. Ausführliche *in vitro*-Studien mit Modellpeptiden und Analysen natürlich vorkommender Membranproteine haben gezeigt, daß vor allem die Verteilung von geladenen Aminosäuren beiderseits der Transmembranhelix ausschlaggebend ist. Protonierte basische Reste, v.a. Lys⁺ und Arg⁺, führen zu einer intrazellulären Lage des entsprechenden Abschnitts. Hieraus wurde die sogenannte „*Positive-Inside*“-Regel abgeleitet (Beltzer *et al.*, 1991; Chen und Kendall, 1995; von Heijne, 1992; von Heijne und Gavel, 1988). Sie gilt insbesondere bei Bakterien, wo die Proteinsynthese an der Zellmembran stattfindet.

Dort steuert ein elektrischer Potentialgradient (innen negativ gegenüber außen) die Topologie. Obwohl an der ER-Membran bei Eukaryonten kein elektrischer Gradient vorzufinden ist, gilt diese Regel auch hier, wenn auch weniger streng (Sipos und von Heijne, 1993; von Heijne, 1989). Außerdem wird ein Einfluß von anionischen Membranlipiden diskutiert (van Klompenburg *et al.*, 1997). Auch kann eine stabile, voluminöse Raumstruktur des Aminoterminus dazu führen, daß dieser auf der zytoplasmatischen Seite verbleibt, da sich solche Domänen schlecht translozieren lassen (Denzer *et al.*, 1995; Spiess, 1995).

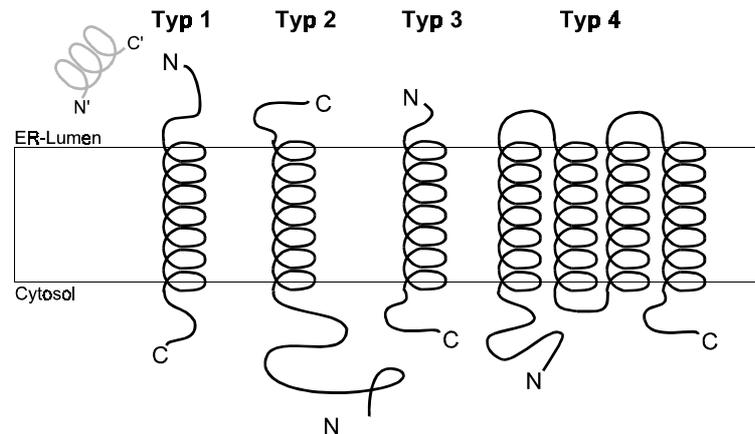


Abb. 8 Topologische Klassifizierung von Membranproteinen nach (von Heijne und Gavel, 1988). In grau ist das abgespaltene Signalpeptid angedeutet.

1.3.2.3 Polytope Membranproteine

Die Biosynthese von integralen Membranproteinen, die die Lipidschicht mehrfach durchspannen (Typ 4), verläuft initial genauso, wie in Abschnitt 1.3.2.2 beschrieben. Im weiteren kommt es aber durch abwechselnd auftretende Signalanker- und Stoptransfer-Sequenzen (s. 1.3.2.2) innerhalb der Polypeptidkette zur Ausbildung multipler Transmembrandomänen mit alternierender Orientierung. Bezüglich der Synthesemechanismen stellen sich insbesondere folgende Fragen, die bis heute kontrovers diskutiert werden:

1. Resultiert die Unterscheidung zwischen Signalanker und Stoptransfer-Signal aus der Aminosäuresequenz bzw. -zusammensetzung, d.h. gibt es jeweils einen spezifischen Rezeptor, oder ergeben sie sich zwangsläufig aus der sequentiellen Abfolge bei der Biosynthese?
2. Trennt sich das Ribosom nach einer Stoptransfer-Sequenz vom Translocon und erfolgt eine neue Assoziation ans ER mit dem nächsten Signalanker?
3. Verlassen die hydrophoben Transmembrandomänen das Translocon einzeln, paarweise oder in Bündeln?
4. Inserieren alle Transmembrandomänen kotranslational oder gibt es posttranslationale Mechanismen?

Diese Fragen werden etwa seit Mitte der 80er Jahre mit unterschiedlichen *in vitro*-, teilweise auch *in vivo*-Techniken untersucht. Grundlegende und systematische Arbeiten stammen insbesondere aus den Arbeitsgruppen um VON HEIJNE (Gafvelin *et al.*, 1997; von Heijne, 1992; von Heijne, 1994; von Heijne und Gavel, 1988; von Heijne und Manoil, 1990), RAPOPORT (Hartmann *et al.*, 1989; Rapoport *et al.*, 1996), LINGAPPA (Lingappa, 1992; Lingappa, 1991; Perara und Lingappa, 1985; Rothman *et al.*, 1988; Walter und Lingappa, 1986), DOBBERSTEIN (High und Dobberstein, 1992; High und Dobberstein, 1992; High *et al.*, 1991; Lipp *et al.*, 1989), SPIESS (Spiess, 1995; Wahlberg und Spiess, 1997; Wessels *et al.*,

1991; Wessels und Spiess, 1988) und SIMON (Simon und Blobel, 1993; Simon und Blobel, 1991). Hierbei wurden teils natürliche Proteine untersucht, teils artifizielle Proteine aus modulartig verketteten hydrophoben und hydrophilen Domänen verwendet. Die beteiligten Arbeitsgruppen arbeiteten oft bevorzugt mit bestimmten Modellproteinen, wie z. B. der *leader-peptidase* (von Heijne, 1989) und bevorzugten jeweils spezielle experimentelle Techniken (s. 1.3.3), so daß zunächst eine gewisse Einseitigkeit der Ergebnisse entstand. Mittlerweise zeigt sich jedoch ein variables mechanistisches Spektrum.

Eine frühe Modellvorstellung besagte, daß die am weitesten aminoterminal topogene Sequenz die Orientierung der ersten Transmembrandomäne determiniert und alle weiteren durch die sequentielle Abfolge automatisch zu Stoptransfer- (ST) oder Ankersignalen (AS) werden (Blobel, 1980; Wessels und Spiess, 1988).

Es ist möglich, ein Signalpeptid durch eine ST-Sequenz zu ersetzen (Szczesna-Skorupa *et al.*, 1988), aber nicht umgekehrt (Rothman *et al.*, 1988). Der Unterschied scheint im wesentlichen auf der allgemein größeren Länge/Hydrophobizität von ST's zu beruhen, wodurch diese im Translocon anders positioniert werden (Nilsson *et al.*, 1994).

In einigen Studien wurde auch gezeigt, daß man ST's und AS's gegeneinander austauschen kann, andere wiesen jedoch eine Spezifität für die jeweils eine oder andere Funktion nach (Audigier *et al.*, 1987; Friedlander und Blobel, 1985; Mize *et al.*, 1986). Auch die Existenz eines eigenen Rezeptors für ST's wurde postuliert (Lingappa, 1991).

Durch Deletion einer ungeraden Anzahl von Transmembrandomänen ändert sich die Topologie weiter C-terminal gelegener Bereiche häufig nicht (Bibi *et al.*, 1991; McGovern *et al.*, 1991), was für die autonome topogene Aktivität nachfolgender Sequenzabschnitte spricht. Das „Helical-Hairpin“-Modell (Engelman und Steitz, 1981) postuliert spezifische lokale Interaktionen zwischen aufeinanderfolgenden Helices, vor allem solchen mit polaren Aminosäuren, was die eingeschränkte Austauschbarkeit von Transmembrandomänen erklären könnte.

Mittlerweile herrscht jedoch weitgehender Konsens darüber, daß in allen Abschnitten polytooper Membranproteine die Ladungsverteilung in flankierenden hydrophilen Sequenzen eine Rolle für die Orientierung der Transmembrandomänen spielt. Eine positive Nettoladung in kurzen interhelicalen Abschnitten stellt ein Hemmnis für deren Translokation dar und führt bevorzugt zu einer zytoplasmatischen Lokalisation (Andersson *et al.*, 1992; Nilsson und von Heijne, 1990; von Heijne, 1989; von Heijne, 1992).

Gemäß einer älteren Vorstellung sitzt das Ribosom nur während der Synthese luminaler Proteinabschnitte am Translocon und synthetisiert zytoplasmatische Bereiche als „freies“ Ribosom, um sich bei erneutem Erscheinen einer Signalsequenz wieder anzulagern (Blobel, 1980; Sabatini *et al.*, 1982). Resistenz zytoplasmatischer Abschnitte des Polypeptids gegen Proteinasen auch während der Biosynthese belegen aber deren permanente Abschirmung durch das fest auf dem Translocon sitzende Ribosom. Auch kovalentes „cross-linking“ von Sec61 α mit zytoplasmatischen Proteinabschnitten sowie weitere experimentelle Evidenzen zeigen, daß sich auch diese Proteinbereiche zunächst im Inneren des Translocons aufhalten (Borel und Simon, 1996; Mothes *et al.*, 1997).

Widersprüchliche Daten gibt es aber noch zu der Frage, ob einzelne Transmembrandomänen bereits in die Membran inserieren, sobald ihre Synthese abgeschlossen ist (Mothes *et al.*, 1997), oder ob sie sich länger im Kanal des Translocons aufhalten und diesen als Bündel verlassen (Borel und Simon, 1996).

1.3.3 Experimentelles Methodenspektrum zur Aufklärung der Topologie

Aufgrund der unter 1.3.1 beschriebenen Schwierigkeiten bei der Röntgenstrukturanalyse von Membranproteinen haben sich eine Reihe von alternativen experimentellen Ansätzen entwickelt, um zu ersten Aussagen über die dreidimensionale Faltung zu gelangen. In der Regel besteht der erste Schritt darin, daß man die Anzahl und Orientierung von Transmembrandomänen bestimmt und herausfindet, welche Abschnitte intra- und welche extrazellulär liegen. Dabei stehen sowohl experimentelle Techniken als auch theoretische Auswertungen der Aminosäuresequenz zur Verfügung. Einen Überblick findet man z. B. bei (Boyd, 1994; Cafiso, 1994; Traxler *et al.*, 1993).

Alle Techniken haben gewisse Nachteile und Limitationen, daher sollen nachstehend die wichtigsten Methoden erläutert und ihre Probleme aufgezeigt werden. Oft wird die für größere Moleküle praktisch impermeable Membran als Barriere ausgenutzt und die Zugänglichkeit einzelner Proteinabschnitte von der einen oder anderen Seite untersucht. Insbesondere werden angewandt:

1. Epitop-Detektion mit Antikörpern
2. Chemische Modifikation einzelner Aminosäuren
3. Enzymatische Modifikation durch
 - Glykosylierung
 - Phosphorylierung
4. Protease-Resistenz/-Labilität
5. Genfusionen von trunkierten Proteinen mit
 - Reporterepitopen
 - Enzymen

1. Epitop-Detektion mit Antikörpern

Wenn Zellen, die das zu untersuchende Protein in ihrer Plasmamembran tragen, mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden, können diese nur an extrazelluläre Epitope binden. Hingegen ist der Zugang zu intrazellulären Bindungsstellen nach Permeabilisierung der Membran mit Detergentien möglich. Eine Detektion kann mikroskopisch über Fluoreszenzmarkierung von Primär- oder Sekundärantikörpern erfolgen, oder auch mittels einer Enzymkopplung als ELISA-Test durchgeführt werden.

Hierbei besteht einerseits die Möglichkeit, Antikörper gegen Proteinregionen spezifisch zu generieren, was sehr zeitaufwendig ist, insbesondere, wenn viele Bereiche getestet werden sollen. Andererseits können zusätzliche Fremdepitope in das Protein eingefügt und mit bereits vorhandenen Antikörpern getestet werden. Diese zusätzlichen Sequenzen führen manchmal sogar zu einer besseren Zugänglichkeit, können sich allerdings auch störend auf die Topologie auswirken und dadurch zum Funktionsverlust führen. Ein Problem ergibt sich weiterhin, wenn der Antikörper das Epitop nur im denaturierten Zustand - der bei der Immunisierung von Tieren in der Regel vorliegt - erkennt. Auch kann ein tatsächlich extrazellulär liegender Bereich sterisch abgeschirmt sein, aber nach Detergenzbehandlung den Antikörper binden. Dann würde man fälschlicherweise schließen, es handele sich um ein intrazelluläres Epitop.

Mit dieser Methode wurden unter anderem die Na⁺/K⁺-ATPase (Canfield und Levenson, 1993) und das P-Glykoprotein (Canfield und Levenson, 1993) untersucht.

2. Chemische Modifikation einzelner Aminosäuren

Zu diesem Zweck wird die spezifische Reaktivität einzelner Aminosäurereste ausgenutzt. Neben der Iodierung von Tyrosinen kommen besonders die elektrophile Modifikation von Lysinen mit Pyridoxalphosphat oder von Histidinen und Cysteinen mit N-substituierten

Maleimiden zum Einsatz. In letzter Zeit sind auch eine Reihe neuer Cystein-spezifischer Reagenzien auf der Basis von Thiosulfonaten entwickelt worden. Ein Problem bei der Identifizierung tatsächlich modifizierter Reste ergibt sich meist daraus, daß mehrere Aminosäuren derivatisierbar sind. Partielle proteolytische Verdauung und die Analyse der Fragmente machen das Verfahren dann sehr aufwendig.

Günstigere Voraussetzungen lassen sich schaffen, wenn man durch Mutagenese die Zahl der betroffenen Aminosäuren reduzieren kann. So sind z. B. bei der Lactosepermease aus *E. coli* ohne Funktionsverlust alle Cysteine bis auf jeweils einzelne „entfernt“ worden, an denen dann spezifisch die Reaktivität getestet werden konnte (van Iwaarden *et al.*, 1991). In manchen Fällen reagiert das Wildtypprotein überhaupt nicht mit dem Reagenz, so daß man dann durch Mutagenese an verschiedensten Stellen Test-Aminosäuren einfügen kann. Anwendungsbeispiele für chemische Modifikationen finden sich bei der Analyse von H⁺/K⁺-ATPase (Besancon *et al.*, 1993) und P-Glykoprotein (Loo und Clarke, 1995).

3. Enzymatische Modifikation durch Phosphorylierung oder Glykosylierung

Einige posttranslationale Proteinmodifikationen finden selektiv in einem bestimmten zellulären Kompartiment statt. So erfolgt die Verknüpfung von Phosphatgruppen mit Serin, Threonin oder Tyrosin ausschließlich im Zytoplasma, während die N-Glykosylierung nur im Lumen des ER erfolgt und somit ein Indikator für extrazelluläre Proteindomänen ist. Neben der Nutzung bereits im Protein vorhandener Konsensussequenzen für derartige Modifikationen können solche auch über Mutagenese an beliebige Stellen eingefügt werden. Es ist jedoch wichtig, anhand von Funktionstests zu überprüfen, ob derartige Sequenzveränderungen die Struktur des Proteins beeinflussen.

Eine zusätzliche, kovalent verknüpfte Molekülgruppe führt in der Regel zu einer veränderten Mobilität des Proteins, die elektrophoretisch zu erfassen ist. Speziell bei der Phosphorylierung ist auch eine Markierung durch die Verwendung radioaktiven ATPs möglich. Leider resultiert nur aus einer tatsächlichen Modifikation von Aminosäuren eine valide Information. Das Ausbleiben der Reaktion ist für sich allein kein Beweis für die Abwesenheit der untersuchten Domäne im jeweiligen zellulären Kompartiment, da hierfür vielerlei Gründe in Frage kommen. Glykosylierungsstudien wurden z. B. an P-Glycoprotein (Zhang und Ling, 1991), dem Glutamatrezeptor GluR1 (Hollmann *et al.*, 1994) und dem Glucosetransporter Glut 1 (Hresko *et al.*, 1994) durchgeführt.

4. Protease-Resistenz/-Labilität

Der Einsatz von Proteasen beruht im Grunde auf dem gleichen Prinzip, wie die Markierung mit Antikörpern. Auch hier dient die Membran als Barriere. Die hydrolytische Spaltung zugänglicher Proteinregionen *in situ* ist aber je nach verwendetem Enzym weniger sequenzspezifisch und diese Methode daher flexibler einsetzbar.

Eine anderer Ansatz besteht in der Verwendung einer sequenzspezifischen Protease, wie z. B. den Blutgerinnungsfaktor Xa, deren Erkennungssequenz zunächst durch Mutagenese an bestimmte Positionen im Polypeptid eingefügt wird.

Die Fragmentanalyse kann wiederum per SDS-Gel erfolgen oder auch mittels Massenspektroskopie. Für diese Anwendung eignen sich besonders Proteine mit wenigen Transmembrandomänen und unterschiedlich großen intra-/extrazellulären Verbindungsstücken. Angewendet wurden partielle Proteaseverdauung unter anderem auf CFTR (Chang *et al.*, 1994), den Wasserkanal CHIP28 (Preston *et al.*, 1994) und den GABA-Transporter GAT-1 (Clark, 1997). Eine Variante dieser Technik verwendet Fusionen mit Reporterepitopen (siehe unten).

5. Genfusionen von trunkierten Proteinen mit Reporterepitopen

Diese Methode basiert auf der Vorstellung, die Membranintegration von Proteinen verlaufe kotranslational und sequentiell vom Amino- zum Carboxyterminus. Trennt man vom C-Terminus her zunehmende Portionen des Polypeptids ab (indem man die entsprechende cDNA verkürzt), so sollte nach der Translation die Topologie bis dorthin genauso wie beim Wildtyp sein. Ein anfusionsiertes, zusätzliches Reporterepitop kann dann anzeigen, in welchem zellulären Kompartiment sich die Fusionsstelle befindet. Dazu kombiniert man diese Technik z. B. mit der unter 4. beschriebenen Proteasebehandlung und einer anschließenden Detektion mittels Epitop-spezifischer Antikörper, oder man verwendet ein glykosylierbares Epitop und testet auf Kohlenhydrat-Modifikation.

Diese Methode wurde zwar in einzelnen Fällen in *in vivo*-Expressionssystemen angewendet, was in manchen Fällen aber problematisch ist, da trunkierte Proteine z. T. bereits bei der „Qualitätskontrolle“ am ER degradiert werden. Dies vermeidet man bei *in vitro*-Expressionen. Ein großer Nachteil bei der Verwendung von trunkierten Membranproteinen besteht darin, daß bei fortschreitender Deletion meist essentielle Bereiche entfernt werden und im Gegensatz zu Insertionsmutationen ein funktioneller Test der Konstrukte nicht mehr möglich ist. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (Anand *et al.*, 1993) und der KDEL-Rezeptor (Singh *et al.*, 1993) wurden mit dieser Technik analysiert.

6. Genfusionen mit Enzymen

Wählt man statt Epitopen am C-Terminus ganze Enzyme als Fusionspartner, wie β -Galaktosidase oder alkalische Phosphatase, so kann deren katalytische Aktivität als Indikator für die Lokalisation ausgenutzt werden. Dies ist bisher vor allem unter Verwendung von bakteriellen Expressionssystemen durchgeführt worden. Landet z. B. die alkalische Phosphatase im Verlauf der Proteinsynthese im Periplasma, so kann man durch Inkubation der Bakterien in geeigneten Substratlösungen Phosphataseaktivität messen. Bei intrazellulärer Lage ist zunächst eine Permeabilisierung der Bakterien durch Detergenz oder Gefrierbruch erforderlich, was als Differenzierungskriterium dient.

Bei Arbeiten zur Topologie nukleotidaktivierter Kationenkanäle ist die alkalische Phosphatase sogar ohne Funktionsverlust des Kanals zwischen Transmembrandomänen eingeschoben worden (Henn *et al.*, 1995). Da die Proteinbiosynthese bei Bakterien und Eukaryonten nicht exakt gleich verläuft, sind die mit eukaryontischen Membranproteinen gewonnen Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren.

1.4 Aufgabenstellung

Die erst seit wenigen Jahren bekannten Chloridkanäle der CLC-Familie stellen wichtige Komponenten für unterschiedlichste zelluläre Funktionen dar. Ihre Bedeutung wird dadurch unterstrichen, daß mehrere Krankheiten auf eine Funktionsstörung dieser Kanäle zurückzuführen sind (s. 1.2.3).

CLC-Proteine besitzen keine Sequenzhomologie zu anderen bereits klonierten Ionenkanälen. Auch strukturelle Ähnlichkeiten, soweit man dies bisher anhand der Aminosäuresequenz untersuchen konnte, sind nicht zu finden. Im Gegensatz zu vielen spannungsgesteuerten Kationenkanälen mit Protein-intrinsischem Potentialsensor (s. 1.2.1) liegt bei CLC-Kanälen ein völlig anderer Schaltmechanismus vor, an dem das permeierende Anion direkt beteiligt ist (Pusch *et al.*, 1995).

Trotz teilweise recht hoher Sequenzhomologie, vor allem in den Bereichen die potentiell in der Membran liegen, sind die elektrophysiologischen Eigenschaften der CLC-Kanäle sehr unterschiedlich, doch diese Charakteristika können bislang nur unzureichend mit bestimmten Proteinregionen korreliert werden.

Aus den genannten Gründen wird klar, daß eine genauere Analyse der räumlichen Struktur der CLC-Chloridkanäle notwendig ist, um ihre Funktionsweise besser zu verstehen und die bisherigen Daten richtig deuten zu können.

Da auch in nächster Zeit nicht mit detaillierten Strukturdaten aus Röntgen- oder Elektronen-Beugungsversuchen zu rechnen ist, besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, durch indirekte experimentelle Techniken und unter Ausnutzung computergestützter Analyseverfahren ein vereinfachtes Bild der nativen Tertiärstruktur zu liefern

Zunächst soll exemplarisch am humanen Skelettmuskelkanal, hClC-1, die Membrantopologie geklärt werden. Wegen seiner Bedeutung für die Myotonie und der bereits vorliegenden Daten aus Mutationsanalysen stellt hClC-1 einen hierfür geeigneten Vertreter der Superfamilie dar. Er läßt sich zudem elektrophysiologisch gut messen und liefert sowohl im *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem als auch in Säugerzellen charakteristische Ströme.

Ausgehend von vergleichenden Hydrophobizitätsanalysen mehrerer CLC-Proteine werden zwei moderne Strukturvorhersagealgorithmen verwendet, um Kandidaten für membran-durchspannende Abschnitte in der Aminosäuresequenz zu bestimmen. Hieraus ergeben sich zwangsläufig putativ intrazelluläre und extrazelluläre Verbindungssegmente, deren Lage in Relation zur Zellmembran experimentell zu überprüfen ist.

Bei der kritischen Analyse der zur Verfügung stehenden Literatur zeigte sich, daß hierfür keine optimale Methode existiert und die Gefahr der Fehlinterpretation besteht, wenn man sich auf eine einzelne Technik verläßt. Aus diesem Grund sollen mehrere methodisch unabhängige Ansätze verfolgt werden:

Die Einführung von Glykosylierungsstellen in das Kanalprotein erlaubt die Detektion von extrazellulären Bereichen. Weil dazu nur minimale Änderungen in der Primärsequenz notwendig sind, ist der gleichzeitige funktionelle Test als Kriterium nativer Topologie möglich.

Weiterhin werden proteolytische Untersuchungen („Proteinase-Protection-Assays“) am Wildtyp und trunkierten Kanalvarianten durchgeführt. Hierbei sollen unter anderem Einblicke in die Vorgänge während der Biosynthese von hClC-1 und den Mechanismus der Membranintegration gewonnen werden. Zu diesem Zweck dienen auch Studien mit partiellen Proteinabschnitten, deren jeweiliger Beitrag zu Topologie und Funktion des Kanals analysiert wird.

Eine weitergehende Charakterisierung der Porenregion von hClC-1 erfolgt durch chemische Modifikation einzelner Aminosäuren, die potentiell an der Bildung des Permeationsweges beteiligt sein können. Dazu werden systematische Austauschmutationen, u. a. gegen Cystein, durchgeführt und die resultierenden Phänotypen charakterisiert, sowie der Effekt spezifischer SH-Gruppen-Reagenzien auf die Leitfähigkeit untersucht. Da sich andere Mitglieder der CLC-Familie in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften von hClC-1 unterscheiden, wird anhand von chimären Proteinen versucht, bestimmte Charakteristika einzelnen Regionen des Polypeptids zuzuordnen.

Abschließend sollen neue Mutationen, die bei Myotoniepatienten gefunden worden sind, in ihrer Auswirkung auf die Kanaleigenschaften analysiert werden. Die gefundenen Effekte können mit bereits charakterisierten Mutanten verglichen und im Rahmen des verfeinerten Strukturmodells diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien der Firmen BIORAD (Hercules, USA), FLUKA (Neu-Ulm), MERCK (Darmstadt), RIEDEL DE HAEN (Seelze), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg) und SIGMA (Deisenhofen) in der Qualität *reinst* oder *p.A.* verwendet. Restriktionsenzyme wurden von NEW ENGLAND BIOLABS (Beverly, USA) und MBI FERMENTAS (Vilnius, Litauen) bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firmen AMERSHAM BUCHLER (Braunschweig) oder DU PONT (Boston, USA). Oligonukleotide wurden von MWG-BIOTECH (Ebersberg) synthetisiert.

2.2 Filmmaterialien und bildgebende Verfahren

Zur Autoradiographie wurden Kodak X-Omat AR Röntgenfilme (KODAK, Frankfurt a.M.) verwendet oder der Bio-Image-Analyser BAS-1500 in Verbindung mit der Auswertungssoftware Tina 2.x (FUJI/RAYTEST, Straubenhardt).

Für die Chemolumineszenz kamen die Filme Reflection NEF-485 (NEN, Bad Homburg) zum Einsatz. Transluzente Gele wurden mit einem Digital-Video-Imagingsystem (INTAS, Göttingen) aufgenommen und auf Thermopapier ausgedruckt.

2.3 Puffer und Lösungen

Barth's Solution	88mM NaCl, 2,4mM NaHCO ₃ , 1mM KCl, 0,41mM CaCl ₂ , 0,33mM Ca(NO ₃) ₂ , 0,82mM MgSO ₄ , 10mM Hepes, pH 7,6 incl. 1% Penicillin, 1% Streptomycin.
BBS	50mM BES, 280mM NaCl, 1,5mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0.
CIP-Puffer	50mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH8,5.
CsCl-Puffer	5,7M CsCl, 25mM Natriumacetat, pH 5,2, sterilfiltriert und DEPC-behandelt.
DNA-Auftragspuffer:	15 % (v/v) Ficoll, 1mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol, 1µg/l Ethidiumbromid in H ₂ O.
GSCN-Lysepuffer	5M Guanidiniumthiocyanat, 25mM NaCitrat, 1% (w/v) Na-N-Laurylsarcosinat, pH 7,0; jeweils frisch: 0,1M β-Mercaptoethanol, 0,1% (w/v) Antifoam A.
H ₂ O/DEPC	0,5ml Diethylpyrocarbonat in entionisiertem Wasser über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.
Li/PEG	100mM LiAcetat, 40% (w/v) Polyethylenglycol in TE, pH 7,5.
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 7,4mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5mM KH ₂ PO ₄ .

Protein-Auftragspuffer	(3x konz.) 150mM Tris-HCl, 6% (w/v) SDS, 0,3% (w/v) Bromphenolblau, 30% Glycerol. Vor Benutzung ad 6% β -Mercaptoethanol.
ND96	96mM NaCl, 2mM KCl, 1,8mM CaCl ₂ , 1mM MgCl ₂ , 5mM Hepes, pH 7,4.
RNA-Auftragspuffer:	50 % (v/v) Glycerol, 1mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol in H ₂ O/DEPC.
Schwyzer Waschpuffer	0,5 M LiCl, 0,1 M Tris-HCl pH 9, 1% (w/v) NP-40, 1% (v/v) β -Mercaptoethanol.
pseudo-SOC-Medium	LB-Medium + 20mM Glukose.
TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0.
TBE	100 mM Borsäure, 2,5 mM Na ₂ EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0.
TBS	3,0g/l Tris-HCl, 8,0g/l NaCl, 0,2g/l KCl, pH7,4.
TE	10mM Tris-HCl, 1mM Na ₂ EDTA, pH 8,0.
TE/LiAcetat	100mM LiAcetat in TE, pH 7,5.
TELT-Puffer	50mM Tris-HCl, 62,5mM Na ₂ EDTA, 0,4% (v/v) Triton-X100, 2,5mM LiCl, pH 7,5; vor Gebrauch ad 1mg/ml Lysozym.
Transferpuffer	3,03g/l Tris-HCl, 14,4g/l Glycin, pH 8,3, 20%(v/v) Methanol.
Western-Blockpuffer	2,5g/50ml Magermilchpulver, 0,2% (v/v) NP-40, in TBS.
Western-Waschpuffer	0,1% (v/v) NP-40, in TBS.
X-Gal/Z-Puffer	1,67ml X-Gal Lösung (20mg/ml Dimethylformamid), 270 μ l β -Mercaptoethanol pro 100ml Z-Puffer.
Z-Puffer	16,1g/l Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 5,5g/L NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 0,75g/l KCl, 0,246 g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O, pH 7,0.

2.4 Bakterienkultur

2.4.1 Stämme

Folgende Abkömmlinge des *Escherichia coli* Sicherheitsstammes K12 wurden verwendet:

XL1-Blue *endA1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *sup E44*, *recA1*, *gyrA46*, *thi-1*, *relA1*, *lac^-*, F⁻, proAB, *lac19*, *lacZ* Δ M15, *tet^r* (Bullock *et al.*, 1987).

DH5 α : F⁻, ϕ 80 *dlacZ* Δ M15, Δ (*lac ZYA-argF*) U169, *recA1*, *end A1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA*, *relA1* (Hanahan, 1983).

2.4.2 Medien

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7.2.
LB-Agar	LB-Medium + 15g/l Agar.
LB/Amp-Medium	LB-Medium + 150µg/l Ampicillin.
LB/Amp-Agar	LB-Agar + 150µg/l Ampicillin.

2.5 Hefekultur

2.5.1 Stämme

Experimente mit Hefezellen, die in die vorliegende Arbeit aufgenommen wurden, erfolgten ausschließlich mit dem haploiden Stamm Y187. Weitergehende Informationen hierzu finden sich im CLONTECH-Protokoll zum MATCHMAKER 2 Zwei-Hybrid-System und bei (Harper *et al.*, 1993).

Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>galΔ 4</i> , <i>met</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i> , .
------	---

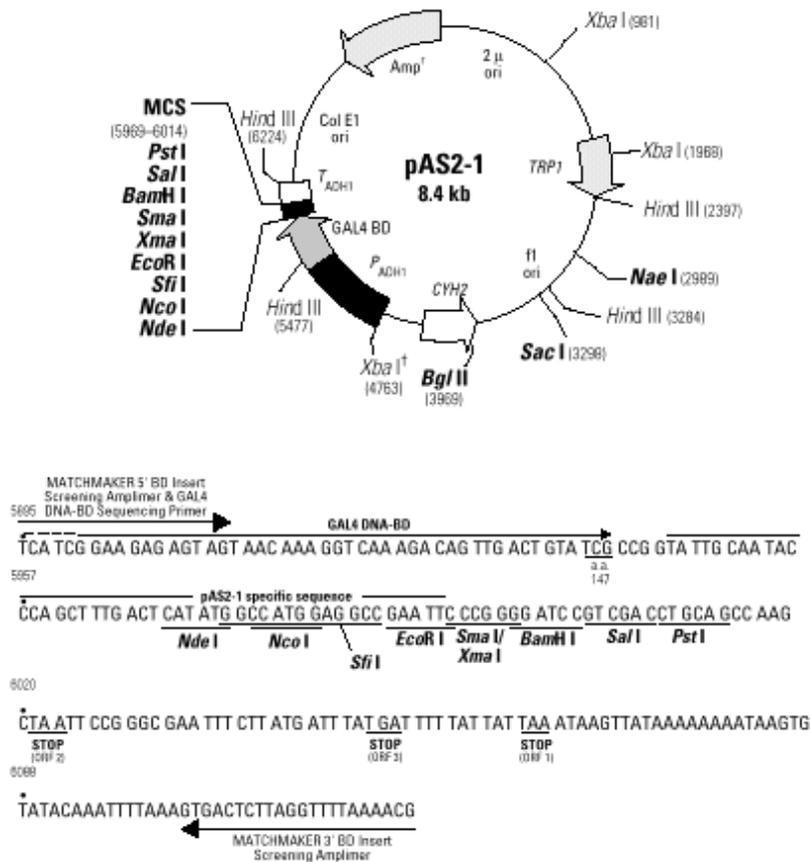
2.5.2 Medien

-Leu Dropout-Pulver	2,5g Adeninhemisulfat	1,2g L-Arginin	6,0g L-Aspartat
	6,0g L-Glutamat	1,2g L-Histidin	
	1,8g L-Lysin	1,2g L-Methionin	3,0g L-Phenylalanin
	22,5g L-Serin	12,0g L-Threonin	2,4g L-Tryptophan
	1,8g L-Tyrosin	9,0g L-Valin	1,2g Uracil
-Trp Dropout-Pulver	2,5g Adeninhemisulfat	1,2g L-Arginin	6,0g L-Aspartat
	6,0g L-Glutamat	1,2g L-Histidin	3,6g L-Leucin
	1,8g L-Lysin	1,2g L-Methionin	3,0g L-Phenylalanin
	22,5g L-Serin	12,0g L-Threonin	
	1,8g L-Tyrosin	9,0g L-Valin	1,2g Uracil
SD-Agar	5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,7g/l N-Base (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat), 1,5g/l Dropout-Pulver je nach Bedarf.		
YPAD-Agar	YPAD-Medium + 20g/l Agar		
YPAD-Medium	20g/l Bactopepton (DIFCO), 10g/l Hefeextrakt (DIFCO), 2% Dextrose		

2.6 Vektoren

pTLN	Dieser Vektor ist ein Abkömmling des Vektors pSP64T (Krieg und Melton, 1984), der zur Expressionssteigerung die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des β -Globingens aus <i>Xenopus</i> enthält. Die Modifikationen bestehen aus einem veränderten Polylinkerbereich und weiteren Restriktionsstellen zur Linearisierung hinter dem 3'-untranslatierten Bereich (Lorenz <i>et al.</i> , 1996).
------	--

- pTLB Hierbei handelt es sich um eine Variante von pTLN, bei der die Polylinker-region die umgekehrte Orientierung hat.
- pcDNAIII Dieser Vektor der Firma INVITROGEN (NV Leek, Niederlande) wurde zur Expression in Säugerkulturzellen verwendet. Die klonierten Gene stehen unter Kontrolle des CMV-Promotors.
- pAS2-1 Dieser Vektor für das Hefe-Zwei-Hybrid-System von CLONTECH enthält die Sequenz für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne unter der Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors. Testproteinsequenzen können als C-terminale GAL4-Fusionen in die multiple Klonierungsregion (MCS) eingefügt werden. Die Transkription wird durch das ADH1-Terminationssignal (T) beendet. Der Shuttlevektor pAS2-1 kann gleichermaßen in Bakterien und Hefen propagiert werden. Er beinhaltet die Marker Ampicillinresistenz (*Amp^r*) und Cycloheximidsensitivität (*CHY2*)



Der Shuttlevektor pACT2 kann gleichermaßen in Bakterien und Hefen propagiert werden. Er beinhaltet die Marker Ampicillinresistenz (*Amp^r*) und Wachstum auf minus-Leu-Selektivmedium (*LEU2*).

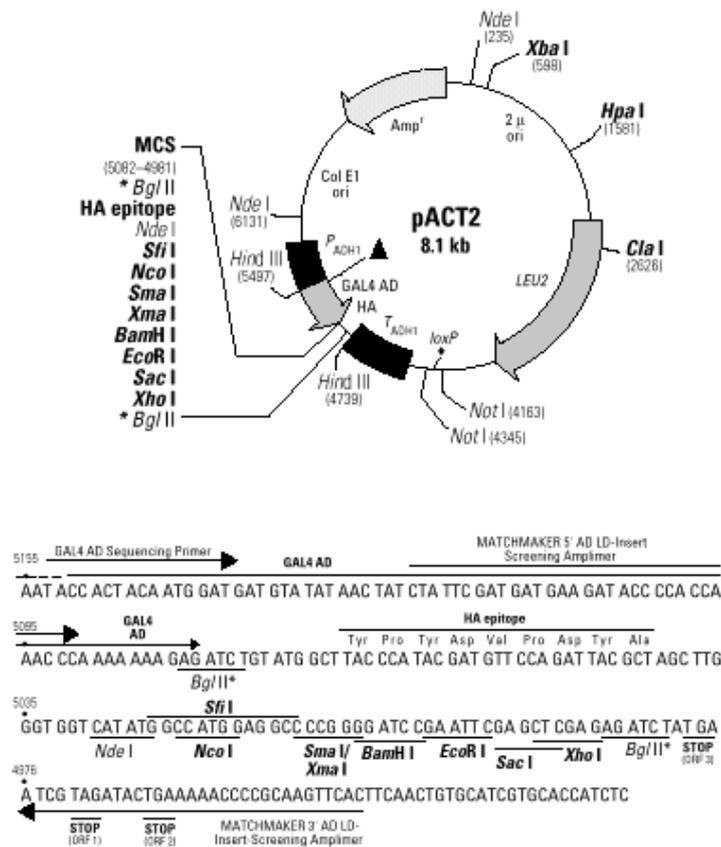


Abb. 10 Restriktionskarte und multiple Klonierungsregion von pACT2 (CLONTECH). Erläuterungen im Text.

- pCL1 15,3kB großer Kontrollvektor für das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Enthält den Transkriptionsfaktor GAL4 in WT-Form inklusive DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomäne. Die Selektionsmarker sind *leu* und *amp^r*.
- pSE1111 Positivkontrollvektor für das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Enthält die regulatorische SNF4-Untereinheit des SNF-Kinasekomplexes aus Hefe (SNF = sucrose non-fermenting) als Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4. Die Selektionsmarker sind *leu* und *amp^r*.
- pSE1112 Positivkontrollvektor für das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Enthält die SNF1-Kinase aus Hefe als Fusion mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 im Vektor pAS1. Die Selektionsmarker sind *trp* und *amp^r*.
- pLAM5 Negativkontrollvektor für das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Enthält das humane Lamin C₆₆₋₂₃₀ in pAS2-1. Die Selektionsmarker sind *trp* und *amp^r*.

2.7 Eukaryontische Kulturzellen

- HEK293 Permanente Zelllinie aus humaner embryonaler Niere; etabliert durch Transformation mit gescherter DNA des humanen Adenovirus Typ 5 (AD5). Hierdurch werden adenovirale Proteine exprimiert, die eine Transkription vom CMV-Promotor aus (z.B. im Plasmid pcDNA3) erlauben.
- COS-7 (CV1 origin SV40); eine von der Affennieren-Zelllinie CV-1 abgeleitete Fibroblasten-Zelllinie, die durch Behandlung mit einer Mutante des Affenvirus SV40 entstanden ist und das SV40 „large T Antigen“ exprimiert. Hierdurch ist eine Replikation von Plasmiden möglich, die den SV40 Replikationsursprung tragen.

Beide Zelllinien wurden in Dulbecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert.

2.8 DNA- und RNA-Techniken

2.8.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Beseitigung von Proteinen wurden nukleinsäurehaltige Lösungen mit einem gleich großen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) versetzt und drei Minuten bei ca. 12.000 g zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige, wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.8.2 Ethanolfällung

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,5, versetzt und mit dem doppelten Volumen reinem Ethanol (96%ig) vermischt. Nach ≥ 2 Stunden bei -20°C oder ≥ 30 min bei -70°C wurde für 30 Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert, das Pellet mit 500 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknen im Vakuumkonzentrator in sterilem, entionisiertem Wasser oder geeignetem Puffer aufgenommen.

2.8.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden photometrisch im UV-Absorptionsbereich von 230 - 350 nm in einer Quarzküvette mit dem Photometer BioQuant (PHARMACIA) bestimmt. Zur Berechnung der Konzentrationen wurden folgende Relationen herangezogen (Schichtdicke der Lösung 1 cm; die Extinktion bei 350 nm wurde als Nullwert gesetzt):

- Doppelstrang-DNA $c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \cdot 50 \mu\text{g/ml}$
- Einzelstrang-RNA $c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \cdot 40 \mu\text{g/ml}$
- Einzelstrang-DNA $c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \cdot 33 \mu\text{g/ml}$
- Oligonukleotide $c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \cdot 33 \mu\text{g/ml}$,
bzw. es wurde der gemäß der Basensequenz errechnete
Absorptionskoeffizient verwendet.

Zur Ermittlung der Reinheit wurde der Quotient aus $E_{260\text{ nm}} / E_{280\text{ nm}}$ gebildet. Dieser Wert sollte größer als 1,8 sein, was einem Nukleinsäuregehalt von mehr als 30% entspricht (Warburg, 1967). Zur Quantifizierung kleiner Mengen wurde ein Aliquot mit einer DNA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensität verglichen.

2.8.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die DNA-Elektrophoresen erfolgten in Flachbettgelapparaturen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und in 0,6 - 2,2%igen Agarosegelen mit 1 $\mu\text{g/l}$ Ethidiumbromid in TAE-Puffer bei 5-15 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei 312 nm durch einen UV-(Rot)-Filter photographiert (vgl. 2.8.3). Zur Größenbestimmung diente die 1kB-Leiter von GIBCO BRL.

2.8.5 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von cDNA

Zur Kontrolle von cDNA-Erststrangsynthesen wurde eine Elektrophorese unter alkalisch denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Um eine Depolymerisation der Agarose bei hohem pH-Wert zu vermeiden, wurden zunächst 0,9% Agarose in 50mM NaCl und 1mM EDTA gekocht und ein Flachbettgel gegossen. Anschließend equilibrierte das Gel in 50mM NaOH, 1mM EDTA; diese Lösung diente auch als Elektrolyt bei der Elektrophorese. Als Auftragspuffer für den radioaktiv markierten Synthesealiquot (siehe 2.8.21) diente der normale DNA-Auftragspuffer, der auf 50mM NaOH eingestellt wurde. Nach etwa 3h Lauf bei 3V/cm wurde das Gel in 7%iger Trichloressigsäure fixiert, 1h bei 45°C auf Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) im Vakuumtrockner getrocknet und anschließend damit eine Phosphorimagerplatte belichtet (s. 2.2).

2.8.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA

Sequenzproben wurden in 6%igen Polyacrylamid/Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Die Salzkonzentration betrug im oberen Teil des Gels 0,05x TBE, im unteren 2,5x TBE. Als Laufpuffer wurde im oberen Puffertank 0,05x TBE und im unteren Puffertank 1x TBE verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 90 W für 2-4 h. Die DNA wurde nach Fixierung und Trocknung des Gels durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Sambrook *et al.*, 1989).

2.8.7 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur Kontrolle von *in vitro* transkribierter cRNA wurde diese mit 1/3 Vol. RNA-Auftragspuffer aus dem mMessage mMachine Kit, GIBCO BRL, versetzt und in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt, wie für DNA beschrieben. Aufgrund von variablen Sekundärstrukturen ergaben sich eine oder mehrere leicht diffuse Banden, wobei die RNA als nicht degradiert angesehen wurde, wenn die Banden sowohl zu größeren, als auch zu kleineren Fragmentlängen gleichermaßen verwischt waren.

2.8.8 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur Kontrolle von RNA-Präparationen aus Gewebe wurden 1-10µg Gesamt-RNA oder PolyA⁺-RNA in 11µl H₂O/DEPC mit 5µl 10x MOPS-Puffer, 9µl 12,3M Formaldehyd, 25µl Formamid versetzt und 15min bei 55°C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10µl RNA-Auftragspuffer wurde die RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt.

Herstellung des Geles: 1g Agarose wurden in 72ml H₂O/DEPC durch Kochen gelöst und auf 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 10ml 10x MOPS-Puffer und 18ml 12,3M Formaldehyd zugesetzt und dann das Gel gegossen.

Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 5V/cm über 3h. Anschließend wurde in 0,5µg/ml Ethidiumbromid, 0,5M NH₄Acetat gefärbt und in 0,5M NH₄Acetat entfärbt.

2.8.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agaroseblöckchen nach Elektrophorese erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN, Hilden, oder dem High Pure PCR Product Purification Kit, BOEHRINGER, Mannheim, oder mittels GeneClean, DIANOVA, jeweils nach den Angaben der Hersteller. Das Funktionsprinzip ist bei allen die spezifische Bindung von DNA an eine Matrix aus Hydroxylapatit oder Quarz.

2.8.10 Restriktionsspaltung von DNA

Enzymatische Hydrolysen von DNA wurden in 40-100µl Reaktionsvolumina mit den vom Hersteller der jeweiligen Enzyme bereitgestellten Puffern durchgeführt. Wenn nicht anders vorgeschrieben, wurden 2 Einheiten Enzym pro Mikrogramm DNA eingesetzt und 3-16h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer gestoppt und anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Fragmente durch Agarosegelelektrophorese wie unter 2.8.4 und 2.8.9 beschrieben.

2.8.11 Dephosphorylierung von Vektoren

Um Selbstligationen enzymatisch geschnittener Vektoren zu verhindern, wurden diese nach Restriktion für etwa 90min mit 10U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm, BOEHRINGER, Mannheim, dephosphoryliert. Hierzu wurde das ursprüngliche Reaktionsvolumen auf 200µl mit 1x CIP-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte wiederum eine Elektrophorese im 1%igen Agarosegel.

2.8.12 Ligationen

DNA-Fragmente und Vektoren wurden in 15 oder 20µl Reaktionsvolumina mit T4-Ligase, GIBCO BRL, nach Herstellerangaben ligiert. Hierbei wurden kompatible, überlappende DNA-Enden mindestens 1h bei Raumtemperatur, stumpfe Enden über Nacht bei 17°C inkubiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Fragment variierte von 1:1 bis 1:10 bei 50-200ng Vektor pro Reaktion.

2.8.13 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Eine stationäre Übernachtskultur des entsprechenden Stammes in LB-Medium (+Tetracyclin bei XL1-Blue) wurde 1:60 in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,5-0,6 (log-Phase) weiter inkubiert. Nach Sedimentieren (20min, 4200Upm, 4°C, Beckmann JA-10 Rotor) wurde zweimal mit sterilem entionisiertem Wasser und einmal mit 10% Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde zuletzt im vierfachen Volumen 10% Glycerin aufgenommen und in 50µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.8.14 Transformation von Bakterien

Das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien erfolgte nach dem Elektroporationsverfahren. Transformationskompetente Bakterien (XL1-Blue und DH5α) wurden nach AUSUBEL *et al.* (Ausubel *et al.*, 1993) hergestellt. Zur Transformation wurden 50µl frisch aufgetaute Bakteriensuspension mit 1µl Ligationsansatz versetzt und im Gene Pulser (BIORAD, Hercules, USA) bei 2,5kV, 400Ω, 25µF elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien in pseudo-SOC Medium aufgenommen, nach etwa dreißigminütiger Inkubation bei 37°C auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht wiederum bei 37°C inkubiert.

2.8.15 Kontrolle von transformierten Bakterien

Am Tag nach der Transformation wurden Einzelkolonien mittels sterilem Zahnstocher zum Animpfen von Flüssigkulturen in 3ml LB/Amp-Medium überführt. Nach 12-16h Inkubation (über Nacht) bei 37°C wurde daraus durch Mini-Präparation (2.8.16) DNA gewonnen und durch Restriktionsverdau (2.8.10) analysiert.

Alternativ wurden kleinere Mengen an Transformanden durch direkte PCR von Bakterien auf korrekte Plasmidkonstrukte getestet. Hierzu wurde eine entsprechende Anzahl von PCR-Ansätzen mit geeigneten Primern vorbereitet (siehe 2.8.18.2). Mittels sterilem Zahnstocher wurde ein Teil einer bakteriellen Einzelkolonie in den PCR-Mix überführt und der anhaftende Rest des Klons mit dem gesamten Zahnstocher in 3ml LB/Amp-Medium gegeben. Nach abgeschlossener Polymerase-Kettenreaktion wurden die Produkte im Agarosegel analysiert und die bereits bei 37°C inkubierten 3ml Kulturen positiver Klone komplett in 100ml LB/Amp-Medium als Übernachtskultur weiter inkubiert.

2.8.16 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.8.16.1 Mini-Präparation

Zur Kontrolle von Transformanden und Gewinnung kleiner DNA-Mengen wurden Bakterienpellets aus 3ml Übernachtskultur nach der "TELT-Methode" (Wilimzig, 1985) aufgeschlossen. Hierbei wurde das Bakterienpellet im Eppendorfgefäß in 250µl TELT-Puffer resuspendiert, 1min im Heizblock auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Proteine und genomische DNA ließen sich dann durch hochtourige Zentrifugation (12000g) sedimentieren und mittels sterilem Zahnstocher entfernen. Danach schloß sich eine Ethanolfällung an.

2.8.16.2 Midi-Präparation

Präparationen von ca. 100-200µg Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien erfolgten mittels QIAGEN Midi Prep Kit (QIAGEN, Hilden) oder Jet Star Plasmid Purification System (GENOMED, Bad Oeyenhausen) nach den Angaben der Hersteller. Das durch Zentrifugation aus 50-100ml LB/Amp-Übernachtskultur gewonnene Bakterienpellet wird dabei mittels alkalischer Lyse, aufgeschlossen, entsprechend wie bei (Birnboim und Doly, 1979) beschrieben.

2.8.17 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA wurden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Hierbei wird die DNA ausgehend von einem Primer durch eine DNA-Polymerase repliziert. Durch Verwendung von 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTP) im Gemisch mit 2'dNTP kommt es an statistisch verteilten Positionen in der Sequenz zum Kettenabbruch, da die zur Verlängerung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt. Die Abbruchprodukte können in einem hochauflösenden denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel analysiert werden. Als Sequenzierprimer wurden diverse Plasmid- und cDNA-spezifische Primer mit einer Länge von mindestens 18 Nukleotiden verwendet, darunter auch Mutageneseprimer.

DNA-Sequenzierungen unter Verwendung des radioaktiven (α -³⁵S)dATP erfolgten mit dem Sequencing Kit von PHARMACIA (Freiburg) und wurden gemäß 2.8.6 analysiert.

Ein Teil der Sequenzierungen wurden von der Servicegruppe des ZMNH (Dr. W. Kullmann) durchgeführt. Hierbei wurde das Thermozyklus-Verfahren unter Einsatz von thermostabiler DNA-Polymerase Amplitaq™ und Fluoreszenzfarbstoff-markierter Terminatoren angewandt. Ausgewertet wurden die Proben auf einem ABI PRISM™ Modell 377 (alles PERKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS).

2.8.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.8.18.1 Standardreaktionsbedingungen

Für alle PCR-Anwendungen außer der Einzelkolonie-PCR (s.u.) wurde die thermostabile Pfu-DNA-Polymerase (STRATAGENE, Heidelberg) aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Diese zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate dank einer 3' Exonukleaseaktivität und niedriger Prozessivität aus ("Proofreading"). Die Länge der Primer betrug standardmäßig 18 Nukleotide, wenn nicht durch eine niedrige Schmelztemperatur der Zielsequenz eine größere Länge erforderlich war. Alle PCR-Reaktionen außer der RT-PCR wurden in 0,5ml-Eppendorfgefäßen im Trio-Thermoblock der Firma BIOMETRA, Göttingen, mit beheiztem Deckel inkubiert.

Der Standard-Reaktionsansatz bestand aus:

5µl 10x Pfu-Polymerasepuffer, STRATAGENE
 1µl Pfu-Polymerase, STRATAGENE
 2µl dNTP-Mix (2,5mM je Nukleotid), PHARMACIA
 3µl Primer A (10µM)
 3µl Primer B (10µM)
 100ng DNA-Matrize
 ad 50µl H₂O

Das Temperaturprogramm verlief gemäß:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	Denaturierung	94°C	3 min
2	Denaturierung	94°C	1 min
3	Primerbindung	55°C	40 sec
4	Extension	72°C	60s pro 1kB
5	Extension	72°C	5 min
6	Aufbewahrung	4°C	beliebig

} 20x

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze mit 1/10 Vol. DNA-Aufgospuffer versetzt und die Produkte über ein Agarosegel gereinigt (2.8.4 und 2.8.9).

2.8.18.2 Einzelkolonie-PCR

Zur Kontrolle von transformierten Bakterienklonen (s. 2.8.15) wurden je 2U PrimeZyme™ DNA-Polymerase (BIOMETRA, Göttingen) oder DyNAzyme™ II DNA-Polymerase (FINNZYMES OY, Espoo, Finnland) pro Ansatz verwendet. Diese kostengünstigen Enzyme besitzen keine 3'-Exonukleaseaktivität ("Proofreading"). Die Zyklenzahl betrug 24, auf eine Verlängerung der letzten Extensionsphase wurde verzichtet.

2.8.18.3 Einführung von Punktmutanten durch zweifach rekombinante PCR

Austausche einzelner Aminosäuren in Proteinen wurden auf cDNA-Ebene durch entsprechende Veränderung der kodierenden Basentriplets erreicht. Hierfür wurde das Verfahren der rekombinanten PCR gewählt (Higuchi, 1990), das gegenüber anderen verbreiteten Methoden den Vorteil besitzt, daß nur relativ kurze Sequenzabschnitte durch PCR amplifiziert werden müssen. Die anschließend notwendige Kontrolle dieser Abschnitte durch Sequenzierung ist dadurch weniger aufwendig. Abbildung 11 verdeutlicht das Prinzip: In zwei getrennten Standard-PCR Ansätzen wurden der Sequenzabschnitt ober- bzw. unterhalb der Mutagenesestelle amplifiziert.

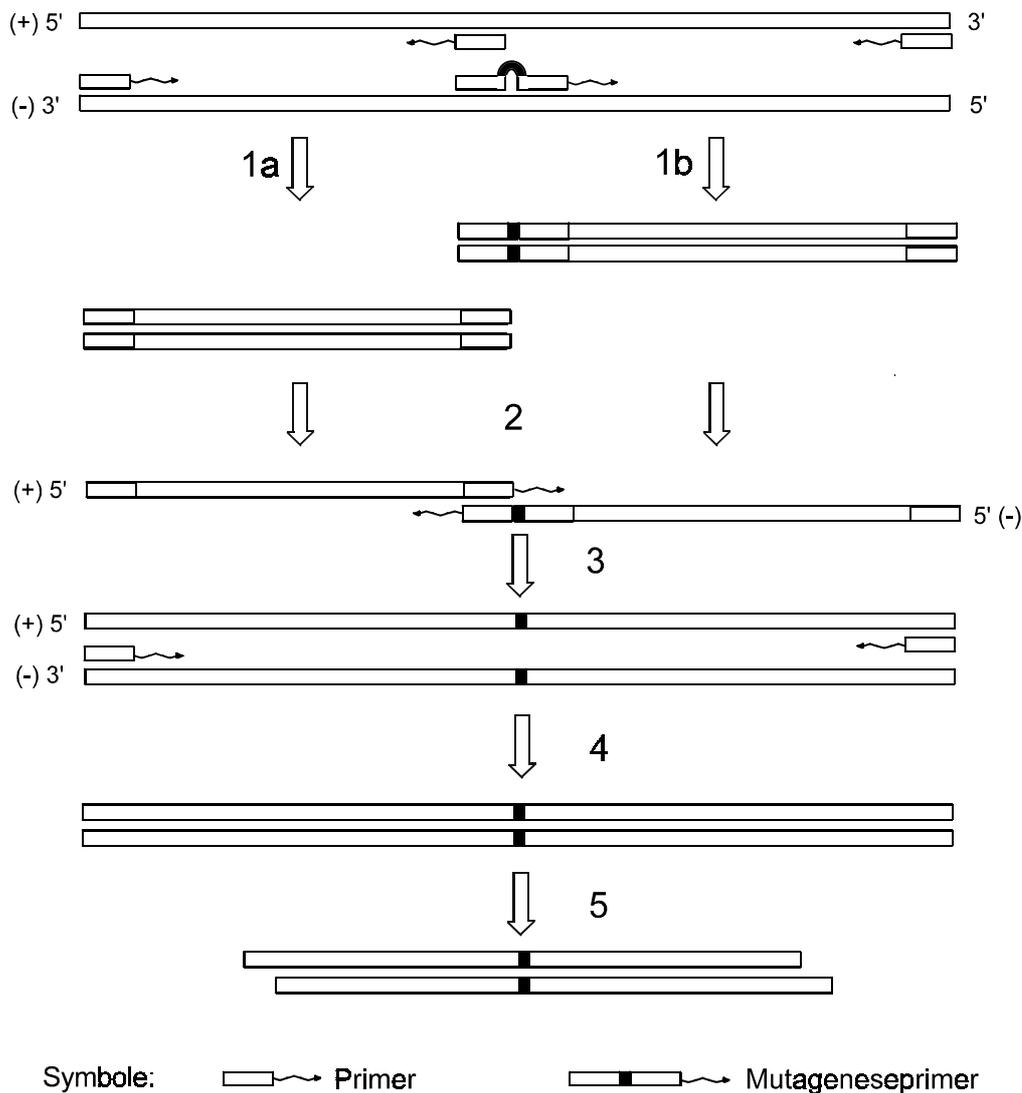


Abb.11: Schematische Darstellung der Mutagenese durch zweifach rekombinante PCR. (1a, 1b) Separate Amplifikation zweier im Bereich des Mutageneseprimers überlappender Sqnenzabschnitte mit anschließender Aufreinigung der Produkte. (2-4) In einer anschließenden PCR-Reaktion rekombinieren die Produkte aus (1) und werden im folgenden exponentiell amplifiziert. (5) Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen zur Ligation in den Vektor.

Hierbei enthielt der eine Vorwärtsprimer die Mutation als Basenfehlpaarung, wobei beiderseits der Mutation 18 „paarende“ Nukleotide für eine gute Primerbindung sorgen sollten. Gleichzeitig überlappte die Primersequenz über 18 Nukleotide mit dem Rückwärtsprimer des benachbarten Abschnitts. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden wie unter 2.8.4 und 2.8.9 beschrieben isoliert. In einer neuen Reaktion wurden jeweils etwa 1/20 der Produkte aus der ersten Amplifikation zusammen mit den am weitesten 5' bzw. 3' greifenden Primern amplifiziert. Dabei wurden die Matrizenstränge infolge des Überlappens zunächst extendiert, wobei die Mutation auch im entstehenden Produkt auftrat. Anschließend wurden diese Stränge exponentiell amplifiziert, da sie die Zielsequenz beider Primer beinhalteten, wohingegen nicht rekombinierte Fragmente - mit nur einer Primerbindungsstelle - sich nur linear vermehren konnten. Nach Reinigung der Produkte im Agarosegel wurden diese, ebenso wie die Plasmide mit der Ausgangssequenz, mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und wiederum mittels Agarosegel isoliert. Anschließend wurde das mutierte Fragment an die korrespondierende Position in der cDNA ligiert. Der modulartige Austausch von Sequenzabschnitten setzt das Vorhandensein geeigneter singulärer Enzymschnittstellen voraus und macht es erforderlich, die terminalen PCR-Primer jenseits dieser Restriktionsstellen zu plazieren.

Nach Ligation, Transformation von Bakterien und Gewinnung von Plasmid-DNA wurden sämtliche durch PCR generierten Abschnitte durch Sequenzierung überprüft. Dies galt generell auch für alle weiter unten beschriebenen Konstrukte.

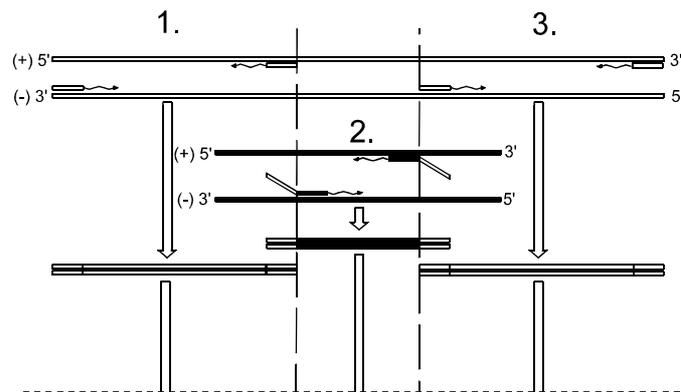
2.8.18.4 Erzeugung von Proteinfusionen und chimären Proteinen durch rekombinante PCR

Das Aneinanderfügen zweier beliebiger cDNA-Sequenzen wurde ebenfalls durch rekombinante PCR erreicht. Analog zu Abschnitt 2.8.18.3 wurden in beiden Sequenzen jeweils die Bereiche amplifiziert, die die Fusionsstelle später flankieren sollten. Es wurden an der Fusionsstelle über 18 Nukleotide überlappende Primer eingesetzt und das Standard PCR-Protokoll gemäß 2.8.18.1 verwendet.

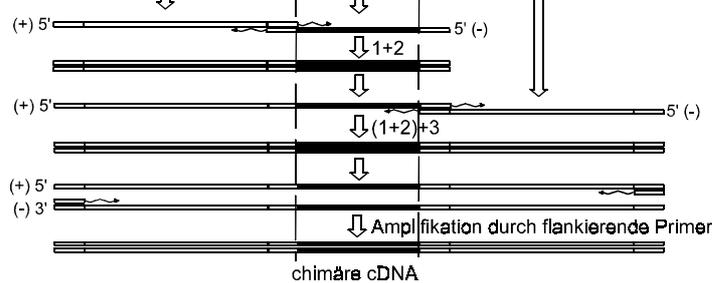
2.8.18.5 Insertion größerer DNA-Abschnitte durch dreifach rekombinante PCR

Durch Erweiterung der rekombinanten PCR auf drei Fragmente ist es möglich, auch längere Sequenzabschnitte zu inserieren, bzw. Domänen zwischen homologen Proteinen auszutauschen. Das Vorgehen entspricht prinzipiell dem bei der zweifach rekombinanten PCR und ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

1. PCR : Separate Amplifikation der zu fusionierenden cDNA-Abschnitte



2. PCR : Rekombination der drei Fragmente und Amplifikation der chimären cDNA



Symbole :

□ : Ausgangs-cDNA

■ : Ausgangs-cDNA

▬ : chimäre-cDNA

→ : Primer

↘ : chimärer Primer

Abb. 12 Schematische Darstellung der dreifach rekombinanten PCR. In drei getrennten Reaktionen (1.,2.,3.) werden zunächst die zu fusionierenden Bereiche amplifiziert. Nach Aufreinigung können diese Dank überlappender Sequenzen in einer erneuten PCR-Reaktion rekombinieren und werden exponentiell vermehrt.

2.8.18.6 RT-PCR

Zur Amplifikation von cDNA, durch reverse Transkription aus mRNA entstanden (siehe 2.8.21), wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Das Standard-PCR-Protokoll wurde dahingehend modifiziert, daß die Reaktion im PERKIN ELMER Thermocycler 9600 in speziellen dünnwandigen Reaktionsgefäßen durchgeführt wurde. Die Zykluszeiten konnten dadurch verkürzt werden, bei gleichzeitiger Erhöhung der Zykluszahl.

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung	94°C	3 min
2 Denaturierung	94°C	30 s
3 Primerbindung	55°C	30 s
4 Extension	72°C	45s pro 1kB
5 Extension	72°C	5 min
6 Aufbewahrung	4°C	beliebig

45x

2.8.19 Isolierung von Gesamt-RNA aus der Rinderhypophyse

Ein modifiziertes Protokoll der Methode nach Chirgwin *et al.* (Chirgwin *et al.*, 1979) diente zur Gewinnung von RNA aus der Rinderhypophyse. Hierzu wurde eine tiefgefrorene Hypophyse³ (ca. 2g) unter flüssigem Stickstoff zermörsert und rasch in 20ml GSCN-Lysepuffer in einem 50ml FALCON-Röhrchen überführt. Mittels Ultraturrax Homogenator wurde das Gewebe weiter zerkleinert (3x 20sec Höchstgeschwindigkeit unter Eiskühlung). Hochmolekulare genomische DNA wurde durch Ultraschallbehandlung gesichert (DR. HIELSCHER UP200S; 8x 1s mit 30% Amplitude), anschließend wurden grobe Partikel durch Zentrifugation (Heraeus, 20min 5000rpm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde in einem UltraClear™ 14x95mm Röhrchen (BECKMANN) auf ein Kissen aus CsCl-Puffer geschichtet (2/3:1/3) und in einem KONTRON 41.14 Rotor mit Ausschwingbechern über Nacht bei RT mit 20000rpm zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 70% Ethanol gespült und in 350µl H₂O/DEPC aufgenommen. Die RNA-Ausbeute betrug 450µg. Die RNA wurde auf einem denaturierenden RNA-Gel (siehe 2.8.8) überprüft. Deutliche, in Laufrichtung symmetrische rRNA-Banden bei ca. 4700 und 1800Bp belegten deren Unversehrtheit.

2.8.20 Gewinnung von PolyA⁺-RNA

Messenger-RNA unterscheidet sich von ribosomaler und Transfer-RNA durch ihre Poly-Adeninsequenz am 3'-Ende. Für die spätere cDNA-Synthese wurde zunächst die mRNA aus der unter 2.8.19 gewonnenen Gesamt-RNA isoliert. Hierfür wurden Dynabeads® Oligo(dT)25 der Firma DYNAL verwendet. Durch komplementäre Basenpaarung an Oligo-dT-Nukleotiden (25mere), welche an paramagnetische Polystyrolkugeln (Ø 2,8µm) gekoppelt sind, lassen sich mRNA-Moleküle von anderen Ribonukleinsäurespezies abtrennen. Bei der Durchführung wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Bei 250µg eingesetzter Gesamt-RNA betrug die Ausbeute 9,2µg, entsprechend 3,7%, mit einer Reinheit von $E_{260}/E_{280}=1,96$.

2.8.21 Synthese von cDNA

Messenger-RNA wurde in komplementäre cDNA umgeschrieben, um diese als Matrize für Polymerase-Kettenreaktionen verwenden zu können. Zu diesem Zweck wurde die Reverse Transkriptase SuperScript™ II (GIBCO BRL) verwendet. Diese in *E. coli* aus dem *pol*-Gen des Moloney Maus-Leukämievirus hergestellte Transkriptase ist frei von RNaseH-Aktivität. Es wurden prinzipiell die Herstelleranweisungen befolgt. Um eine Qualitätskontrolle der Reaktionsprodukte zu ermöglichen, wurde der Ansatz auf 30µl (1,5x) vergrößert. Nach Denaturierung der mRNA und Zugabe der Reversen Transkriptase wurde ein Aliquot von 4µl entnommen und mit 0,4µl ³²P-α-dCTP zur radioaktiven Markierung inkubiert.

2.8.22 *In vitro*-Transkription

Zur Injektion von *Xenopus laevis*-Oozyten und für *in vitro*-Translationen wurde plasmidkodierte cDNA in komplementäre mRNA umgeschrieben. Standardmäßig befanden sich die kodierenden Sequenzen im Expressionsvektor pTLN, der zunächst mit *Mlu*I 3'

³ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ivell, Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung, Hamburg.

jenseits der Polyadenylierungssequenz linearisiert wurde. Nach Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-fällung wurde ein Aliquot des in H₂O/DEPC aufgenommenen Vektors im Agarosegel überprüft. Die RNA-Synthese erfolgte mit dem mMessageMachine Kit (AMBION) unter Verwendung der SP6-Polymerase gemäß Anleitung. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, die Güte der RNA mittels nicht-denaturierender Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.9 Konstruktion der Mutanten im einzelnen

2.9.1 Glykosylierungsmutanten

Als Ausgangsbasis zur Erzeugung von Kanälen mit künstlich eingefügten Glykosylierungsstellen diente die hCIC-1-Mutante N430QEI, im folgenden kurz mit NQ bezeichnet. Hier ist die natürlich vorkommende Konsensussequenz für die Glykosyltransferase zerstört (NNT→QNT). Zusätzlich ist am C-Terminus hinter Gly972 das Influenza-Hämagglutinin-Epitop (LYPYDVPDYVSG) eingefügt, um eine Bindungsstelle für den Antikörper 12CA5 (K. Steinmeyer, ZMNH) zu schaffen. Die hCIC-1-Sequenz lag zwischen den Schnittstellen *Xho*I (5') und *Eco*RI (3') im Vektor pTLB. Alle Glykosylierungsmutationen wurden sowohl in cDNA voller Länge (zur Expression in Oozyten), als auch in eine carboxyterminal trunke Variante NQΔC (2.9.1.1, für *in vitro*-Translationen) eingefügt.

2.9.1.1 C-terminal verkürzte Varianten von hCIC-1: WTΔC und NQΔC.

Zur Deletion des hydrophilen C-Terminus hinter D12 ab Nt 1821 (Asp607) wurde das Segment zwischen der *Xma*I Schnittstelle und Nt 1821 mit den Primern *trans a* und *delta C r* aus WT bzw. NQ amplifiziert. Der Primer *trans a* enthielt zusätzlich zwei Stopcodons und eine *Eco*RI-Schnittstelle. Das *Xma*I/*Eco*RI-geschnittene Produkt wurde in die ebenso verdauten Ausgangsprodukte ligiert.

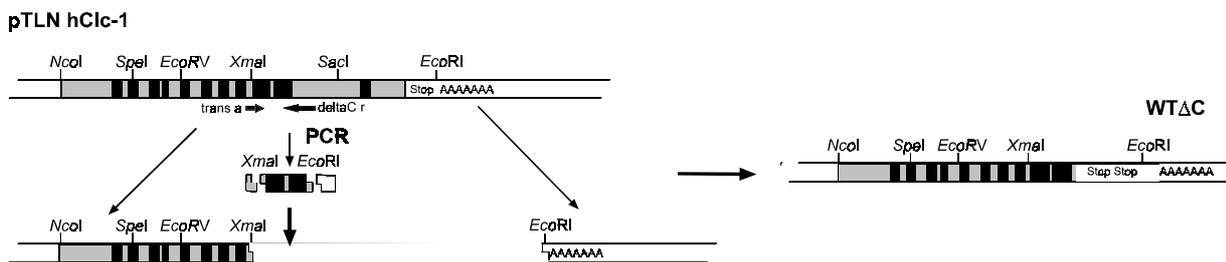


Abb. 13 Konstruktion der C-terminal trunke Varianten WTΔC und NQΔC. Die hCIC-1 Sequenz mit eingezeichneten singulären Restriktionsschnittstellen ist grau unterlegt. Zur Orientierung sind die Abschnitte, die für hydrophobe Domänen kodieren, durch kurze schwarze Blöcke gekennzeichnet. PCR-Primer werden durch dicke horizontale Pfeile repräsentiert. Beim Vektor pTLB N430QEI, Ausgangsprodukt für NQΔC, befindet sich statt der *Nco*I eine *Xho*I Schnittstelle am 5'-Ende.

2.9.1.2 Punktmutanten

Punktmutanten wurden durch zweifach rekombinante PCR (siehe 2.8.18.3) erzeugt. Im hydrophilen Abschnitt zwischen D1 und D2 wurden die beiden Aminosäuren Ala140 und Lys147 jeweils einzeln gegen Asn ausgetauscht. Drei Aminosäureaustausche erfolgten in der hydrophoben Domäne D4: Ile238, Val245 und Phe249. An Position n+2 befanden sich bereits in der WT-Primärstruktur Serine.

Ort	Mutation	Primerpaar 5'-Fragment	Primerpaar 3'-Fragment	Schnittstellen
D1-D2	A140N	SP6X → A140N r	A140N a → hum71r	<i>XhoI / EcoRV</i>
D1-D2	K147N	SP6X → K147N r	K147N a → hum71r	<i>XhoI / EcoRV</i>
D4	I238N	rm10a → I238N r	I238N a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>
D4	V245N	rm10a → V245N r	V245N a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>
D4	F249N	rm10a → F249N r	F249N a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>

2.9.1.3 Transplantation der Wildtyp-Glykosylierungsstelle

Durch dreifach rekombinante PCR (siehe 2.8.18.5) wurde der Abschnitt von Phe413 bis Gly444 aus WT-cDNA an verschiedene Positionen in die NQ-cDNA transplantiert. Das Transplantat enthielt die Glykosylierungskonsensussequenz und wurde in die hydrophilen Segmente zwischen den hydrophoben Domänen D1 bis D8, sowie zwischen D10/D11 und D12/D13 eingefügt. Die Mutationen wurden wiederum sowohl in die verkürzte Variante (Δ C) als auch in den Kanal voller Länge eingebaut. Zusätzlich wurden die Konstrukte 3T*4 und 4T*5 erzeugt, die ein verlängertes Transplantat (Gly409 bis Val456) enthielten. Die Namen der resultierenden Konstrukte geben die Nummern der Domänen an, die das Transplantat flankieren.

Konstrukte in NQ / in NQ Δ C	Transplantat	Primerpaar 5'-Fragment	Primerpaar 3'-Fragment	Schnittstellen
1T2 / 1T2 Δ C	trans a → trans r	SP6X → 1T2r	1T2a → hum71r	<i>XhoI / SpeI</i>
2T3 / 2T3 Δ C	trans a → trans r	rm10a → 2T3r	2T3a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>
3T4 / 3T4 Δ C	trans a → trans r	rm10a → 3T4r	3T4a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>
4T5 / 4T5 Δ C	trans a → trans r	rm10a → 4T5r	4T5a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>
5T6 / 5T6 Δ C	trans a → trans r	hum70a → 5T6r	5T6a → hum74r	<i>EcoRV / XmaI</i>
6T7 / 6T7 Δ C	trans a → trans r	hum70a → 6T7r	6T7a → hum74r	<i>EcoRV / XmaI</i>
10T11/10T11 Δ C	trans a → trans r	trans a → 10T11r	10T11a → hum64r	<i>XmaI / NdeI</i>
12T13	trans a → trans r	hum51a → 12T13r	12T13a → rmbr	<i>NdeI / SacI</i>
12T Δ C	trans a → transStop	hum51a → 12T13r	12T13a → delta655r	<i>NdeI / EcoRI</i>
3T*4X / 3T*4 Δ C	3longTa → 3longTr	rm10a → 3T*4r	3T*4a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>
4T*5X / 4T*5 Δ C	4longTa → 4longTr	rm10a → 4T*5r	4T*5a → hum71r	<i>SpeI / EcoRV</i>

2.9.2 Prolaktin-Fusionen

Zur Erzeugung von Fusionsproteinen von trunkiertem hCIC-1 mit C-terminalem Prolaktin-Reporterepitop (siehe Abb. 14) wurde zunächst die 534 Nukleotide lange Sequenz von Rinderprolaktin zwischen Aminosäure Tyr74 und dem Stopcodon durch RT-PCR aus boviner Hypophysen-polyA⁺-RNA amplifiziert (siehe 2.8.18.6-2.8.21). Der Vorwärtsprimer (PrIBam) enthielt eine zusätzliche *Bam*HI- und der Rückwärtsprimer (PrI r) eine *Eco*RI-Schnittstelle. Gleichzeitig wurde der C-Terminus von hCIC-1 zwischen der singulären *Sac*I-Schnittstelle und Gly877 mit einem Rückprimer (13PrI r) amplifiziert, der ebenfalls eine *Bam*HI-Restriktionssequenz enthielt. Dadurch war es möglich, in einer 3er-Ligation das Prolaktinfragment hinter D13 an hCIC-1 zu fusionieren. Dabei wurden zwei Aminosäuren, Glycin und Serin, an der Fusionsstelle eingefügt. Da es sich hierbei um relativ unspezifische Reste handelte (klein, ungeladen und nicht hydrophob), sowie Fusionsstellen in nicht konservierte Bereiche von hCIC-1 gelegt wurden, ist eine negative Beeinflussung der Topologie durch diese zusätzlichen Aminosäuren relativ unwahrscheinlich.

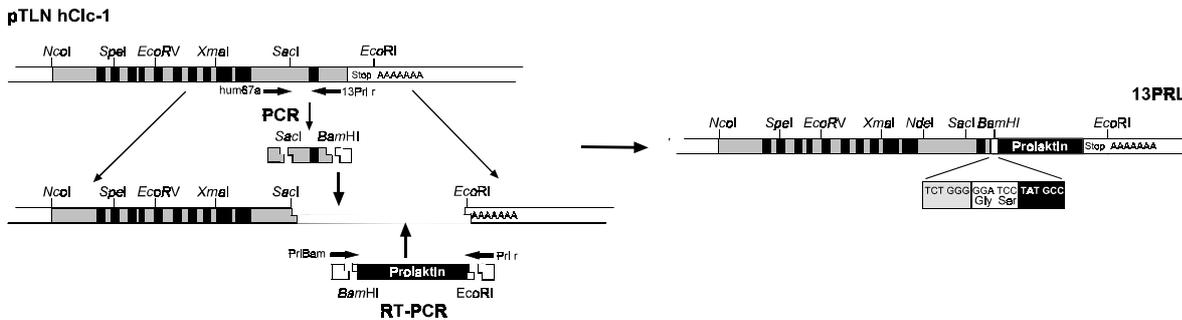


Abb. 14 Klonierungsstrategie zur Erzeugung des Ausgangskonstruktes 13PRL. Die hCIC-1-Sequenz mit eingezeichneten singulären Restriktionsschnittstellen ist grau unterlegt. Zur Orientierung sind die Abschnitte, die für hydrophobe Domänen kodieren, durch kurze schwarze Blöcke gekennzeichnet. PCR-Primer werden durch dicke horizontale Pfeile repräsentiert.

Dieses Ausgangskonstrukt diente zur Herstellung weiterer trunkierter hCIC-1-Prolaktin-fusionen: Konstrukt 13PrI wurde mit *Bam*HI und einem anderen Enzym, das nur einmal 5' der gewünschten Fusionsstelle schnitt (*Spe*I, *Eco*RV, *Xma*I oder *Nde*I) verdaut. Das herausfallende Fragment wurde durch ein entsprechendes PCR-Amplifikationsprodukt von hCIC-1 ersetzt, welches das 3'-Ende der jeweiligen Trunkation umfaßte und mit den gleichen Enzymen verdaut wurde.

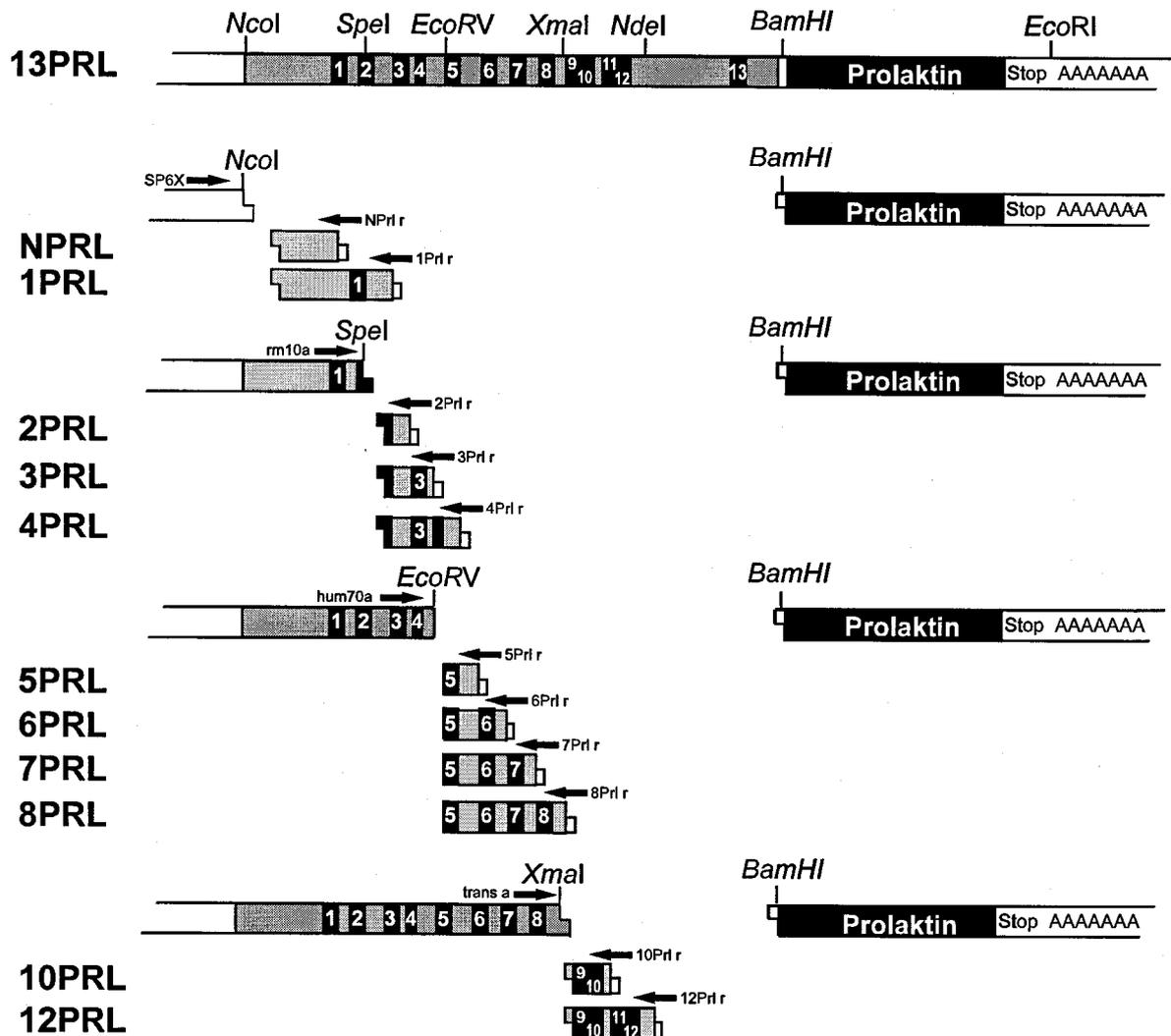


Abb. 15 Konstruktion von Fusionen aus trunziertem hCIC-1 und Prolaktin, ausgehend von Konstrukt 13Prl. In der linken Spalte finden sich die Kurzbezeichnungen resultierender Fusionsproteine. Die hCIC-1 Sequenz ist grau unterlegt, hydrophobe Domänen als nummerierte schwarze Blöcke und PCR-Primer durch dicke horizontale Pfeile dargestellt.

2.9.3 Cystein-Austausch-Mutanten

An unterschiedlichen Stellen in der Sequenz von hCIC-1 wurden die Codons einzelner Aminosäuren gegen das von Cystein ausgetauscht. Hierfür wurde wie unter 2.8.18.3 vorgegangen. Von den beiden möglichen Triplets TGT und TGC wurde jeweils dasjenige verwendet, das gegenüber der ursprünglichen Sequenz die wenigsten Fehlpaarungen besaß. Die folgende Tabelle listet die Mutanten auf und zeigt die verwendeten Primer und Restriktionsschnittstellen.

Ort	Mutation	Primerpaar 5'-Fragment	Primerpaar 3'-Fragment	Schnittstellen
D2	S189C	rm10 a → S189C r	S189C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D2-D3	T196C	rm10 a → T196C r	T196C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	T208C	rm10 a → T208C r	T208C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	A211C	rm10 a → A211C r	A211C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	V213C	rm10 a → V213C r	V213C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	L219C	rm10 a → L219C r	L219C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	T220C	rm10 a → T220C r	T220C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	A221C	rm10 a → A221C r	A221C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	G222C	rm10 a → G222C r	G222C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	L223C	rm10 a → L223C r	L223C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	G224C	rm10 a → G224C r	G224C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	S225C	rm10 a → S225C r	S225C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	G226C	rm10 a → G226C r	G226C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	I227C	rm10 a → I2276C r	I227C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	P228C	rm10 a → P228C r	P228C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	V229C	rm10 a → V229C r	V229C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3	G230C	rm10 a → G230C r	G230C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3-D4	K231C	rm10 a → K231C r	K231C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3-D4	E232C	rm10 a → E232C r	E232C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3-D4	G233C	rm10 a → G233C r	G233C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D3-D4	P234C	rm10 a → P234C r	P234C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	F235C	rm10 a → F235C r	F235C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	V236C	rm10 a → V236C r	V236C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	H237C	rm10 a → H237C r	H237C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	I238C	rm10 a → I238C r	I238C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	A239C	rm10 a → A239C r	A239C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	S240C	rm10 a → S240C r	S240C a → rm2r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	I241C	rm10 a → I241C r	I241C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	A243C	rm10 a → A243C r	A243C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	A244C	rm10 a → A244C r	A244C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	V245C	rm10 a → V245C r	V245C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	L246C	rm10 a → L246C r	L246C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	S247C	rm10 a → S247C r	S247C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	G255C	rm10 a → G255C r	G255C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	V256C	rm10 a → V256C r	V256C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	Y257C	rm10 a → Y257C r	Y257C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	E258C	rm10 a → E258C r	E258C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	Q259C	rm10 a → Q259C r	Q259C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D4	P260C	rm10 a → P260C r	P260C a → rm2 r	<i>SpeI</i> / <i>EcoRV</i>
D9/D10	M485C	trans a → M485C r	M485C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	P486C	trans a → P486C r	P486C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	V487C	trans a → V487C r	V487C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	F488C	trans a → F488C r	F488C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	V489C	trans a → V489C r	V489C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	L490C	trans a → L490C r	L490C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	G491C	trans a → G491C r	G491C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	A492C	trans a → A492C r	A492 a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	A493C	trans a → A493C r	A493C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	F494C	trans a → F494C r	F494C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D9/D10	G495C	trans a → G495C r	G495C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D11/D12	F547C	trans a → F547C r	F547C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D11/D12	E548C	trans a → E548C r	E548C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D11/D12	L549C	trans a → L549C r	L549C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D11/D12	T550C	trans a → T550C r	T550C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>
D11/D12	G551C	trans a → G551C r	G551C a → hum64 r	<i>XmaI</i> / <i>NdeI</i>

2.9.4 Trunkierte Kanäle

Aminoterminal verkürzte Varianten von hCIC-1 wurden erzeugt, indem die cDNA-Sequenz vom gewünschten neuen N-Terminus aus durch einen 5'-Primer mit *NcoI*-Schnittstelle bis zu einem 3'-Primer amplifiziert wurde, welcher jenseits der nächsten singulären Schnittstelle lag. Carboxyterminale Trunkationen wurden mit einem 3'-Primer generiert, der nach dem Codon für die letzte Aminosäure zwei Stopcodons und eine *EcoRI*-Schnittstelle besaß, wie schon unter 2.9.1.1. beschrieben.

Name	Primerpaar	Restriktionsenzyme	Name	Primerpaar	Restriktionsenzyme
ΔN_{109}	$\Delta N_{109a} \rightarrow rm9r$	<i>NcoI/SpeI</i>	ΔC_{390}	$hum70a \rightarrow \Delta C_{390r}$	<i>EcoRV/EcoRI</i>
ΔN_{369}	$\Delta N_{369a} \rightarrow hum74r$	<i>NcoI/XmaI</i>	ΔC_{451}	$hum70a \rightarrow \Delta C_{451r}$	<i>EcoRV/EcoRI</i>
ΔN_{413}	$\Delta N_{413a} \rightarrow hum74r$	<i>NcoI/NdeI</i>	ΔC_{520}	$hum61a \rightarrow \Delta C_{520r}$	<i>XmaI/EcoRI</i>
ΔN_{509}	$\Delta N_{509a} \rightarrow hum64r$	<i>NcoI/NdeI</i>	ΔC_{597}	$hum51a \rightarrow \Delta C_{597r}$	<i>XmaI/EcoRI</i>
ΔN_{598}	$\Delta N_{598a} \rightarrow rmbr$	<i>NcoI/SacI</i>	ΔC_{720}	$hum51a \rightarrow \Delta C_{720r}$	<i>NdeI/EcoRI</i>
ΔN_{721}	$\Delta N_{721a} \rightarrow rmbr$	<i>NcoI/SacI</i>			

Eine Variante des Konstruktes ΔN_{413} enthielt zusätzlich das Signalpeptid der α -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors der Ratte, dieses wurde ΔN_{413+SP} genannt. Bei der Konstruktion dieser Chimäre wurden zunächst die Aminosäuren Met1 bis Asp47 des Acetylcholinrezeptors mit den Primern Ach a und SP r amplifiziert und durch rekombinante PCR mit dem überlappenden Primer SPD8 a aminoterminal an die Sequenz von ΔN_{413} fusioniert.

2.9.5 Punktmutanten in trunkierten Kanälen

Über zweifach rekombinante PCR (siehe 2.8.18.3) wurde die Punktmutation D136G in das Konstrukt ΔC_{451} eingefügt und K585E in ΔN_{413+SP} .

Konstrukt	Primerpaar 5'-Fragment	Primerpaar 3'-Fragment	Schnittstellen
ΔC_{451} DG	SP6X \rightarrow D136G r	D136G a \rightarrow rm9 r	<i>HindIII / SpeI</i>
ΔN_{413+SP} KE	trans a \rightarrow K585E r	K585E a \rightarrow hum64 r	<i>XmaI / NdeI</i>

Die Mutation G188A wurde durch Umsetzen des *HindIII-EcoRV*-Abschnitts aus einem bereits vorhandenen Konstrukt (M. Pusch, ZMNH) in ΔC_{451} eingefügt.

2.9.6 Chimäre Kanäle und Deletion von D4

Die Domänen D3 und D4 wurden zwischen den Kanälen hCIC-1, hCIC-3 und hCIC-5 durch dreifach rekombinante PCR (2.8.18.5) ausgetauscht. Die folgende Abbildung zeigt den betroffenen Sequenzabschnitt.

	D2		D3	D4
hC1C-1	LISPQAVGSG	IP	MKTILRG VVLKEYLTMK AFVAKVVALT AGLGSGIPVG	KEGPFVHIAS
hC1C-3	VFAPYACGSG	IP	IKTILSG FIIRGYLGKW TLMIKTITLV LAVASGLSLG	KEGPLVHVAC
hC1C-5	VFAPYACGSG	IP	IKTILSG FIIRGYLGKW TLVIKTITLV LAVSSGLSLG	KEGPLVHVAC
	D4		D5	
hC1C-1	ICAAVLSKFM	SVFCGVYEQP	YYYSDILTVG	CAVGVGVGCC
hC1C-3	CCGNIFSRLF	PKY STNEA	KKREVL SAA	SAAGVSVAFG
hC1C-5	CCGNILCHCF	NKY RKNEA	KRREVL SAA	AAAGVSVAFG

Abb. 16 Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen von hC1C-1, hC1C-3 und hC1C-5. Die hydrophoben Domänen D2 bis D5 sind grau hinterlegt, der ausgetauschte Bereich ist umrahmt. Die in Konstrukt D4 Δ deletierten Aminosäuren in hC1C-1 sind unterstrichen.

In einer weiteren Chimäre wurde nur die Domäne D3 aus hC1C-5 in hC1C-1 transplantiert, wobei die Grenze in Abb. 16 durch eine gestrichelte Linie angedeutet ist. Zusätzlich wurde eine Variante von hC1C-1 ohne die schwach konservierten Bereiche von D4 erzeugt (in der Abbildung unterstrichen).

Name	Rückgrat von	enthält	von	Primerpaar 5'-Fragment	Primerpaar Mittelteil	Primerpaar 3'-Fragment
1-III/IV-5	hC1C-1	D3-D4	hC1C-5	rm10a → 1-5r	5transa → 5transr	1-5a → rm2r
1-III/IV-3	hC1C-1	D3-D4	hC1C-3	rm10a → 1-3r	3transa → 3transr	1-3a → rm2r
5-III/IV-1	hC1C-5	D3-D4	hC1C-1	hc5-72a → 5-1r	1transa → 1transr	5-1a → RC5 53r
1-III-5	hC1C-1	D3	hC1C-5	rm10a → 1-5r	5transSa → 5transSr	1-5Sa → rm2r
D4 Δ	hC1C-1	-	-	rm10a → D4 Δ r	-	D4 Δ a → rm2r

Die Konstrukte mit hC1C-1-Rückgrat wurden über die Schnittstellen *SpeI* und *EcoRV* zusammengesetzt. Beim hC1C-5-Rückgrat wurde dieses mit zunächst mit *DraIII* und *EcoRI* geschnitten (siehe Abb. 17) und das freigesetzte Fragment nach Isolierung noch einmal mit *BssSI* verdaut. Das PCR-Fragment der D3-D4-Region wurde mit *DraIII* und *BssSI* geschnitten. Anschließend erfolgte eine Dreierligation gemäß folgender Abbildung.

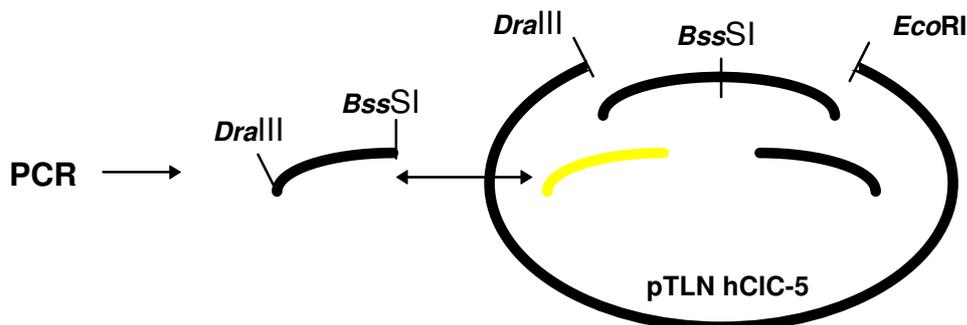


Abb. 17 Konstruktion der Chimäre 5-III/IV-1.

2.10 Protein-Techniken

2.10.1 *In vitro*-Translation

In vitro-Proteinbiosynthese wurde mit Hilfe von Kaninchen-Retikulozytenlysat (PROMEGA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ansatzgröße wurde dabei auf die Hälfte der angegebenen Mengen reduziert. In der Regel wurden 500ng cRNA, 20U RNAsin® RNase Inhibitor (PROMEGA) und 2µl à 10µCi/µl ³⁵S-L-Methionin (EXPRE³⁵S oder EASYTAG™, beides NEN/DUPONT) eingesetzt und über 60min bei 30°C inkubiert. Für Glykosylierungsstudien und den Proteinase Protection Assay wurde die Translation in Gegenwart von 2EQ Mikrosomen⁴ aus Hundepankreas (PROMEGA) durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionen entweder durch Zugabe von Protein-Auftragspuffer gestoppt, bei -20°C eingefroren oder, im Falle des Proteinase Protection Assays, wie unter 2.10.2 beschrieben weiter behandelt.

2.10.2 Proteinase-Protection-Assay

Zum selektiven proteolytischen Abbau zytoplasmatischer Proteindomänen wurden *in vitro*-Translationen in Anwesenheit von mikrosomalen Membranen wie unter 2.10.1 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde besonders auf die Qualität der Mikrosomen geachtet. Diese wurden bei der Erstverwendung in gebrauchsfertige Portionen aliquotiert und sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Translationsansätze von 25µl Gesamtvolumen wurden nach erfolgter Synthese auf 10mM CaCl₂ eingestellt und in Aliquots von 5µl und 2x10µl in verschraubbaren Eppendorfgläsern aufgeteilt. Der kleinere Aliquot diente als Kontrolle vor Proteinaseverdau, die beiden anderen wurden mit bzw. ohne final 1,5% TritonX-100 für 5min auf Eis vorgekühlt. Unterdessen war eine Lösung 150µg/ml Proteinase K (BOEHRINGER MANNHEIM) in 100mM Tris pH7,4 bei 37°C für 20min vorinkubiert worden, um mögliche Spuren von Lipasen zu inaktivieren. Anschließend wurde diese Lösung auch auf 10mM CaCl₂ eingestellt, gekühlt und 2µl davon zum kalten Translationsansatz gegeben. Die finalen Konzentrationen betragen 30µg/ml Proteinase K, 10mM Tris pH 7,4, 10mM CaCl₂. Auf Eis wurde für 1h inkubiert und anschließend die Proteinaseinhibitoren Phenyl-methylsulfonylfluorid (PMSF), final 5mM, und 1x Complete™ (beides BOEHRINGER MANNHEIM) zugesetzt. Nach 5min Wartezeit erfolgte Zugabe des dreifachen Volumens von vierfach konzentriertem Protein-Auftragspuffer, der im Heizblock auf 95°C vorgeheizt wurde, und sofortige Überführung der Proben in ein kochendes Wasserbad. Unter SDS und Temperaturen über 95°C wurde die Proteinase K über 20 min inaktiviert. Abschließend wurden die Ansätze wieder auf Eis gekühlt und bei -20°C bis zum Auftrag auf 5-20%ige SDS-Polyacrylamid-Gradientengele gelagert.

2.10.3 Herstellung von Oozyten-Homogenisat

Fünf gemäß 2.13.2 injizierte Oozyten wurden nach 2-3 Tagen Expression in 40µl 2mM PMSF/ 1xComplete™(BOEHRINGER, Mannh.) in PBS homogenisiert. Dazu wurden sie mit einer gelben Eppendorf-Pipettenspitze solange auf- und abpipettiert, bis keine groben Zellfragmente mehr sichtbar waren. Anschließend wurden Dotter und Zelltrümmer für 20sec

⁴ Nach Herstellerangaben werden im Kontrollreaktionsansatz durch 2 Equivalenteneinheiten (EQ) Mikrosomen etwa 90% des Signalpeptids von pre-β-Lactamase abgespalten, bzw. 75-90% des Hefe α-Faktors glycosyliert.

bei 500g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit ½ Volumen 3x Protein-Auftragspuffer versetzt und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.10.4 Membranpräparation von Oozyten und Zellkulturzellen

- a) Gemäß 2.13.2 injizierte Oozyten wurden nach 2-3 Tagen Expression in 2mM PMSF/ 1xComplete™(BOEHRINGER, Mannh.) in PBS homogenisiert. Dazu wurden sie sechsmal durch eine 0,80x40mm und sechsmal durch eine 0,45x25mm Spritzenkanüle (B. BRAUN, Melsungen) gepreßt. Anschließend wurden Dotter und Zelltrümmer für 3 min bei 800g abzentrifugiert.
- b) Ein bis zwei 10cm-Petrischalen transfizierter Zellkulturzellen wurden nach 2 Tagen Expression mit 500µl 2mM EDTA in PBS unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Unterlage abgelöst und mit 10ml kalter Lösung 2mM PMSF/1xComplete™(BOEHRINGER, Mannh.) in PBS in 15ml Kunststoffröhrchen gespült. Nach Pelletieren der Zellen für 3min bei 4°C und 800g wurden diese in 1ml 2mM PMSF/ 1xComplete™(BOEHRINGER, Mannh.) in PBS auf Eis mittels Dounce-Homogenisator homogenisiert. Zur Verringerung der Viskosität der Lösung wurde freigesetzte hochmolekulare DNA durch Ultraschallbehandlung geschert (DR. HIELSCHER UP200S; 8x 1s mit 30% Amplitude). Anschließend wurde noch einmal für 3min bei 4°C und 800g zentrifugiert.

Die Überstände aus a) oder b) wurden in einer TL-100-Zentrifuge mit TLA-100.2-Rotor (BECKMANN) für 30min bei 4° und 50.000rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren der Überstände wurden die Membranpellets in Protein-Auftragspuffer gelöst und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.10.5 Carbonatpuffer-Extraktion von Membranpräparationen

Zur Entfernung nichtintegraler Membranproteine und unspezifisch an Lipiden haftender Proteine wurden die Überstände aus 2.10.4 a) und b) vor der Ultrazentrifugation mit ½ Volumen 300mM Na₂CO₃, pH 11,8, gemischt, mittels Dounce-Homogenisator noch einmal fein dispergiert und für 30min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde weiter wie in 2.10.4 verfahren.

2.10.6 Protein Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine aus *in vitro*-Translationen oder Zellysaten wurden über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Hierzu wurden 3-50µl Proteinlösung mit 1/3 Vol. Protein-Auftragspuffer versetzt. Wegen der Neigung hydrophober Membranproteine beim Kochen zu aggregieren, wurde bei Proteinen, die Transmembrandomänen enthielten, nur für 5-10min auf 45°C erwärmt. Anschließend erfolgte die Elektrophorese je nach Fragmentgröße auf 5 bis 15%igen linearen Gelen oder 5-20%igen Gradientengelen in Minigelkammern (HOEFER SCIENTIFIC, San Francisco) bei 30mV pro Gel. Als Molekulargewichtsmarker dienten die gefärbten Proteinstandards (high oder low) von GIBCO BRL. Bei radioaktiven Proben wurden die Gele kurz in 45% Methanol/ 10% Eisessig fixiert und entweder erst im Vakuum auf Filterpapier (SCHLEICHER & SCHUELL) getrocknet oder sofort feucht auf Phosphoimagerplatten zur Belichtung aufgelegt. Die Expositionszeit betrug im ersten Fall 20-120min, bei feuchten Gelen 12-16h. Gele für Westernblots wurden wie unter 2.10.7 beschrieben weiter behandelt.

2.10.7 Westernblots

Nach der Elektrophorese wurden die Gele kurz in Transferpuffer equilibriert und dann unter Transferpuffer blasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran (Protran 0.45 μ M Porengröße, SCHLEICHER & SCHUELL) gelegt. Beiderseits wurden zwei Lagen Filterpapier (SCHLEICHER & SCHUELL) hinzugefügt. Der Transfer lief in einer Tankblot-Kammer (HOEFER SCIENTIFIC) mit Transferpuffer bei 80Volt (ca. 5V/cm) über 2h oder bei 15V über 16h jeweils bei 4°C.

Für die Immundetektion von transferiertem Protein wurde die Membran danach zunächst 30min bei 37°C in Western-Blockpuffer eingelegt, um die direkte Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern, und anschließend mit dem jeweiligen Antiserum in Blocklösung bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit Western-Waschpuffer gewaschen, erneut blockiert und für 1h mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Protein A (1:4000 Verdünnung) in Western-Blockpuffer inkubiert. Diese Lösung wurde durch viermaliges Waschen mit Western-Waschpuffer und zweimaliges Eintauchen in entionisiertem Wasser auf die Chemilumineszenz-Detektion vorbereitet. Diese Detektion erfolgte mit dem Renaissance™ Kit (DU PONT) nach den Angaben des Herstellers durch 1min Immersion in eine Reaktionslösung, die Luminol als Substrat für die Meerrettichperoxidase enthielt. Danach wurde die abgetropfte Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen auf einem Röntgenfilm exponiert (10s bis 5h). Die Entwicklung geschah in dem automatischen Röntgenfilmentwickler Curix 60 (AGFA).

2.11 Techniken in Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

2.11.1 Kultivierung von Hefezellen auf Platten und in Schüttelkultur

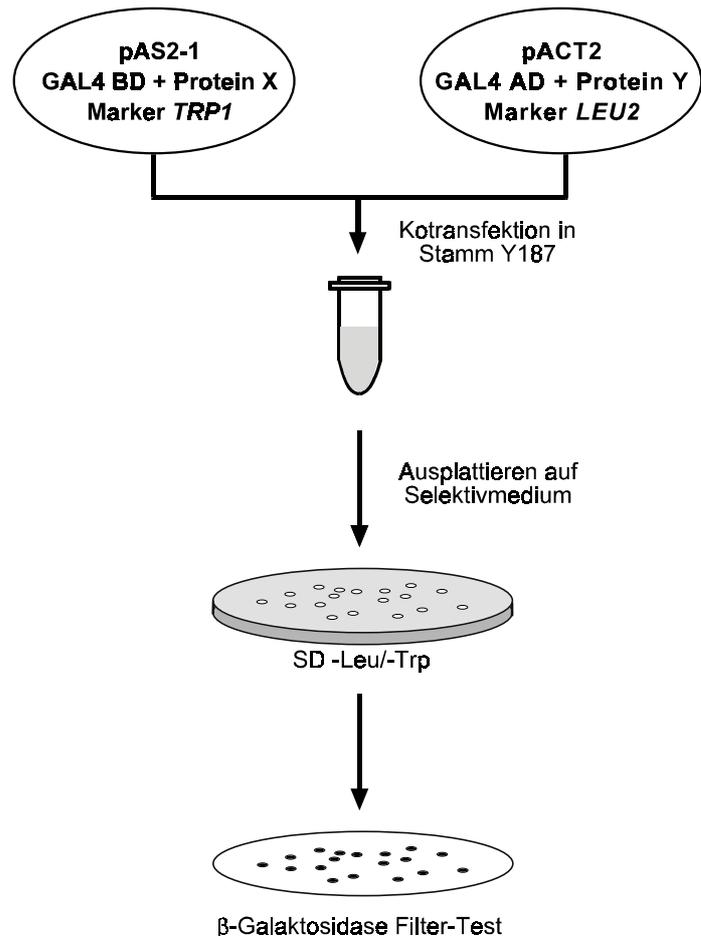
Hefezellen des Stammes Y187 wurden auf YPAD-Agarplatten ausgestrichen und etwa zwei Tage bei 30°C inkubiert. Für Stammkulturen wurde alle drei bis vier Wochen eine Einzelkolonie auf eine frische YPAD-Platte ausgestrichen. Als Dauervorrat wurde eine Übernachtskultur YPAD-Medium mit einer großen Einzelkolonie angeimpft und nach etwa einem Tag Wachstum bei 30°C und 240 Upm ein Aliquot mit ¼ Vol. sterilem Glycerol versetzt und bei -70°C eingefroren. Als Selektivmedien („selective dropout“, SD) kamen Platten ohne Trypsin (-Trp) und ohne Leucin (-Leu), sowie -Trp/-Leu zum Einsatz. Zum Wachstum auf Selektivmedien benötigten die Kolonien drei bis vier Tage bei 30°C, um einen Durchmesser von 1-3mm zu erreichen.

2.11.2 Transformation von Hefen

Ein Teil einer stationären Übernachtskultur von Hefezellen des Stammes Y187 in YPAD-Medium wurde in 300ml frischem YPAD-Medium auf eine optische Dichte von 0,2 bis 0,3 verdünnt. Anschließend wurde weiter für 2h unter Schütteln bei 30°C inkubiert, so daß die OD₆₀₀ dann 0,4-0,5 betrug. Die Zellen wurden nun für 5min bei RT/1000x g pelletiert, einmal mit entionisiertem Wasser gewaschen und anschließend in 1,5ml TE/LiAcetat resuspendiert. Parallel dazu wurde gescherte Heringssperma-DNA (10mg/ml; Typ III SIGMA) als Träger-DNA im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend rasch auf Eis abgekühlt.

Zur Transformation wurden pro Ansatz je 1 µg der jeweiligen Plasmide mit 9 µl Träger-DNA, 100 µl der resuspendierten kompetenten Hefezellen und 600 µl Li/PEG-Lösung im Eppendorfgemisch und für 30 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl DMSO erfolgte eine Wärmebehandlung bei 42 °C über 15 min und anschließendes Abkühlen auf Eis. Daraufhin wurden die Zellen kurz pelletiert, der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Hefen in entionisiertem Wasser resuspendiert. Etwa 100-200 µl hiervon wurden schließlich auf Selektivmedium (SD-Trp, SD-Leu oder SD-Trp/-Leu) ausplattiert. Das Hefewachstum erfolgte über 3-4 Tage bei 30 °C.

Abb. 18 Flußdiagramm zur Veranschaulichung der prinzipiellen Vorgehensweise beim Hefe-Zwei-Hybrid-System mittels β -Galaktosidase-Aktivitätstest. Nach Kointransfektion von Hefezellen wurden diese auf -Trp/-Leu-Selektivmedium ausgestrichen und nach drei bis vier Tagen Wachstum die Kolonien auf Filterpapier abgezogen. Nach Zellyse durch Einfrieren konnte die enzymatische Aktivität mittels Auflegen auf mit X-Gal getränktes Filterpapier anhand der resultierenden Blaufärbung nachgewiesen werden.



2.11.3 Fusionen von CBS1/CBS2 mit GAL4 im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Sowohl vom Sequenzbereich um CBS1 wie auch um CBS2 (\approx D13) wurden je drei PCR-Amplifikationen unterschiedlicher Länge durchgeführt. Dabei kamen Vorwärtsprimer mit zusätzlicher *Nco*I-, bzw. Rückwärtsprimer mit *Eco*RI-Schnittstelle zum Einsatz. Dies ermöglichte nach Verdau mit den genannten Enzymen eine gerichtete Insertion in die Hefe-Expressionsvektoren pACT2 und pAS2-1 im korrekten Leseraster mit der entsprechenden, weiter N-terminal liegenden GAL4-Domäne.

Die sechs Varianten von CBS1 und CBS2 wurden sowohl in den Aktivierungsdomänen-Vektor pACT2 als auch in den DNA-Bindungsdomänen-Vektor pAS2-1 ligiert, so daß insgesamt 12 Plasmide mit 36 paarweisen Kombinationsmöglichkeiten vorlagen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Konstrukte.

		pACT2 mit Aktivierungsdomäne						
		CBS1			CBS2			
		a	b	c	d	e	f	
pAS2-1 mit DNA-Bindungsdomäne	CBS1	a	O	O	O	X	X	X
		b	O	O	O	X	X	X
		c	O	O	O	X	X	X
	CBS2	d	X	X	X	O	O	O
		e	X	X	X	O	O	O
		f	X	X	X	O	O	O

2.11.4 β -Galaktosidase-Aktivitätstest auf Filterpapier

Frische Hefezellkolonien von 1-3mm Durchmesser wurden von SD-Selektivmedienplatten auf Whatman-Filterpapier (\varnothing 8.5cm) durch vorsichtiges Auflegen und leichtes Andrücken übertragen. Durch 10s Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurden die Zellen aufgebrochen und nach kurzem Auftauen in Petrischalen gelegt, in denen sich gleichartige Filterpapiere (Whatman \varnothing 8.5cm) befanden, welche zuvor mit 2ml X-Gal/Z-Puffer getränkt worden waren. Die sich anschließende enzymatische Reaktion - Umwandlung von 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid zu einem blauen Farbstoff - fand bei Raumtemperatur über 2 bis 6 Stunden statt. Anschließend wurden die Filter getrocknet, auf einem Farbscanner dokumentiert und unter Lichtabschluß archiviert.

2.12 Zellkultur

2.12.1 Haltung von Säugerzelllinien

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten und zweimal pro Woche ausgedünnt. Um die Zellen von den Kulturschalen abzulösen, wurden sie vorher für etwa 5 Minuten bei 37°C mit Trypsin behandelt. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in Kulturmedium mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Kulturflaschen und -schalen wurden von den Firmen FALCON, GREINER und NUNC bezogen.

2.12.2 Transfektion von Zellkulturzellen

Subkonfluente eukaryontische HEK293- oder COS-7-Zellen wurden nach der Kalziumphosphatmethode transfiziert. Die cDNA-Konstrukte lagen im Expressionsvektor pcDNA3 (INVITROGEN) vor. Für eine 10cm-Kulturschale wurden 10 μ g Vektor in 150ml H₂O mit 17 μ l einer frisch angesetzten 2,5M CaCl₂-Lösung und 166 μ l BBS-Puffer versetzt. Nach 5-10min bei RT zur Bildung von Kalziumphosphatkristallen wurde mit 6ml DMEM/FCS-Medium verdünnt und die Lösung nach gründlichem Mischen auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 3% CO₂, 37°C über 15-20h. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen normales DMEM/FCS ausgetauscht und zur maximalen Proteinexpression weitere 1-2 Tage bei 5%CO₂, 37°C inkubiert.

2.13 Elektrophysiologische Techniken

2.13.1 Präparation von Oozyten aus *Xenopus laevis*

Weibliche Krallenfrösche der Spezies *Xenopus laevis* wurden durch Einlegen für 15min in 0,17%ige Tricainlösung anästhesiert und Teile des Ovars operativ entnommen. Oozyten des Reifestadiums V und VI wurden nach Colman (Colman, 1984) präpariert und 5-10min bei RT in 1mg/ml Kollagenase Typ II (SIGMA) inkubiert. Bis zur Injektion wurden diese in Barth's Solution bei 4°C aufbewahrt.

2.13.2 Injektion von cRNA in *Xenopus*-Oozyten

Injektionspipetten wurden aus Glaskapillaren (DRUMMOND) mit einem Horizontal-Pipettenzieher (SUTTER) hergestellt. Diese wurden mit Silikonöl DC 200 (SIGMA) gefüllt und in eine Nanoliterpipette (DRUMMOND) eingespannt, die Befüllung mit RNA-Lösung erfolgte durch Aufsaugen eines 1µl-Tropfens. Wenn nicht anders angegeben, wurden 50nl cRNA einer Konzentration von 200ng/µl in H₂O/DEPC pro Oozyte injiziert, entsprechend 10ng. Anschließend wurden die Oozyten für 2-3 Tage bei 16-18°C in Barth's Lösung gehalten.

2.13.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Der Stromfluß durch die Kanäle in der Oozytenmembran in Abhängigkeit vom Membranpotential kann durch das Verfahren der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen werden. Diese Technik geht auf Arbeiten von Cole und Curtis (Cole, 1979) zurück und wurde in der vorliegenden Arbeit modifiziert nach Stühmer (Stühmer *et al.*, 1992) durchgeführt. Wie in Abbildung 19 schematisch gezeigt werden zwei fein ausgezogene Meßelektroden aus Glas in die Oozyte eingestochen. Mit der Spannungselektrode mißt man die aktuelle Potentialdifferenz zwischen Oozyteninnerem und Badlösung, letztere hat definitionsgemäß das Potential null Volt. Über die Stromelektrode kann Ladung in die Oozyte injiziert werden, so daß der Oozyte ein vom Ruhezustand abweichendes Membranpotential aufgezwungen werden kann. Ein Rückkopplungsverstärker vergleicht ständig das „Ist-Potential" (V) mit dem vom Experimentator vorgegebenen „Soll-Potential" (Kommandopuls) und korrigiert entsprechend über die Stromelektrode (I). Zu einem gegebenen Zeitpunkt entspricht der gemessene Strom dann dem Gesamtfluß an geladenen Teilchen durch alle Ionenkanäle und etwaige andere elektrogene Transportprozesse oder Lecks in der Oozytenmembran. Bei starker Expression eines bestimmten Kanalproteins und Wahl geeigneter Versuchsbedingungen, ist der Strom durch den zu untersuchenden Ionenkanal dominiert. Eine Computersteuerung läßt es zu, bestimmte Abfolgen von „Soll-Potentialen" einzustellen, im folgenden als Pulsprotokoll bezeichnet.

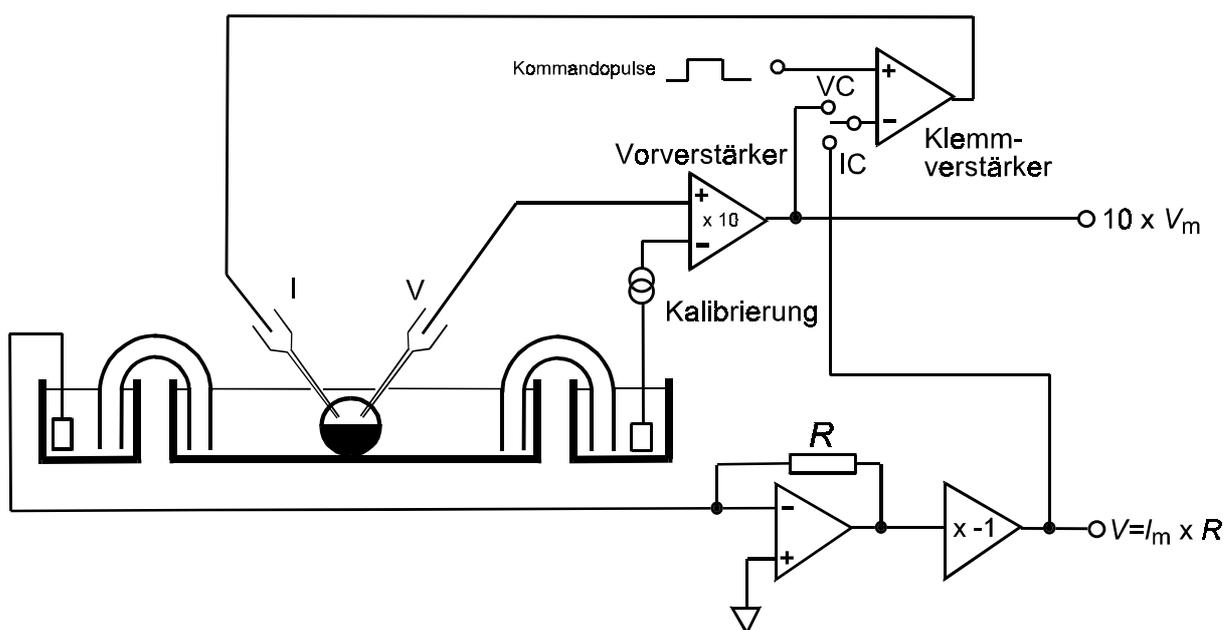


Abb. 19 Schematische Darstellung der Meßapparatur zur Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Erläuterungen im Text.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Elektroden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Filament (Typ GC-150TF, $\varnothing = 1\text{mm}$, CLARKE ELECTROMEDICAL INSTRUMENTS) mit einem Vertikal-Elektrodenzieher (LIST MEDICAL INSTRUMENTS) hergestellt und mit 3M KCl gefüllt, in den ein in FeCl_3 chlorierter Silberdraht tauchte; der Serienwiderstand betrug 0,3-1M Ω . Die Badlösung wurde über 3M KCl-gefüllte Agarbrücken mit den Badelektroden in 1M NaCl verbunden. Die Ströme wurden über einen Verstärker (DAGAN oder NPI-INSTRUMENTS) und einen Signalwandler (SCIENTIFIC SOLUTIONS oder AXON INSTRUMENTS) an einen IBM-kompatiblen 486erPC geleitet, die Pulsprotokolle mit der Software pCLAMP5,5 (AXON INSTRUMENTS) gesteuert. Die Meßelektroden wurden unter optischer Kontrolle durch ein Binokularmikroskop (C. ZEISS, Oberkochen) mittels Mikromanipulatoren (MÄRZHÄUSER) bewegt. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Charakterisierung von Mutanten wurde an mindestens zwei unabhängigen Oozytenpräparationen durchgeführt. Bei nichtfunktionellen Konstrukten wurden cRNA-Synthese, Injektion und Messung wiederholt.

Das Standard-Pulsprotokoll für CIC-1 bestand aus 13 Zyklen mit je einem Vorpuls von 25ms bei +80mV zur maximalen Aktivierung der Kanäle, anschließenden variablen Pulsen über 150ms von +80 bis -140mV in Schritten von 20mV und einem abschließenden konstanten Testpuls über 75ms bei -60mV.

2.13.4 Messung des Effektes von MTS-Reagenzien

Sowohl in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme als auch bei inside-out-Patch-Anordnungen wurden zunächst wiederholt Standard-Pulsprotokolle (2.13.3) appliziert, bis diese zu reproduzierbaren Stromantworten führten. Dann wurde der Messkammer mittels Pipette ein gleiches Volumen 20mM MTSES oder 2mM MTSET (beides in ND96 mit 20mM Hepes) zugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Etwa alle 30s wurden wiederum Standard-Pulsprotokolle angelegt und beobachtet, ob sich die Ströme

veränderten und wann sich ein neuer Gleichgewichtszustand eingestellt hatte. Dies war bei MTS-sensitiven Mutanten spätestens nach 5 min der Fall. Anschließend wurde für mindestens 2min mit ND96 gespült. Repräsentative Messungen vor MTS-Zugabe, in dessen Anwesenheit und nach Spülung wurden gespeichert. Zur Auswertung wurden die Ströme vor Applikation und nach dem Spülen verglichen (siehe 2.13.5.1).

2.13.5 Datenauswertung

Die Erfassung der Meßdaten erfolgte mit der Software pCLAMP5.5 (AXON INSTRUMENTS). Zur graphischen Darstellung in SigmaPlot 3.0 (JANDEL SCIENTIFC) wurden die Binärdaten mit *ASCIIOUT* (M. Pusch) oder *CLAMPEX* (eigenes Visual C++ Programm) in ASCII-Format konvertiert. Die Auswertung erfolgte unter anderem mit den Programmen *INTEG* und *CCC* (beide M. Pusch). Meßwerte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

2.13.5.1 Berechnung der Leitfähigkeiten („slope-conductance“)

Zum Vergleich der Ströme unterschiedlicher Mutanten bzw. vor und nach Zugabe von Reagenzien wurden die jeweils zeitlich gemittelten Ströme im Gleichgewicht (T=150-175ms nach Pulsbeginn) im Bereich physiologischer Potentiale bei 0, -20 und -40mV durch eine lineare Beziehung ($I = g \cdot U + \text{const.}$) angenähert und die Leitfähigkeit gemäß

$$g = \frac{\Delta I}{\Delta U} \quad (3)$$

berechnet.

2.13.5.2 Ermittlung von relativen Permeabilitätskoeffizienten

Die Ionenselektivitäten von Wildtyp- und mutanten ClC-Kanälen wurden aus der Verschiebung des Umkehrpotentials unter biionischen Bedingungen mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung bestimmt. Hierzu wurde das Umkehrpotential zunächst in ND96 ($V_{\text{rev}}^{\text{ND96}}$) und anschließend in Lösungen gemessen, in denen 80mM NaCl gegen die gleiche Menge an NaNO_3 , NaI oder NaBr ersetzt war ($V_{\text{rev}}^{\text{x}}$). Die relative Permeabilität für das Anion X bezogen auf Chlorid beträgt dann

$$\frac{p_x}{p_{\text{Cl}}} = \frac{\left(103,6\text{mM} \cdot e^{\frac{e_0(V_{\text{rev}}^{\text{ND96}} - V_{\text{rev}}^{\text{x}})}{kT}} \right) - 23,6\text{mM}}{80\text{mM}} \quad (4)$$

Hierbei ist k die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur.

2.13.5.3 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit

Die relative Aktivierung von ClC-Kanälen als Funktion des Membranpotentials wurde bestimmt, indem die Kanäle zunächst durch Konditionierungspulse im Bereich von -140 bis +100mV in einen neuen, potentialabhängigen Gleichgewichtszustand gebracht wurden und dann auf eine konstante Testspannung von -100mV geklemmt wurden. Die danach einsetzende Relaxation kann in erster Näherung durch eine Monoexponentialfunktion beschrieben werden. Den Stromsignalen sind jedoch zum Zeitpunkt T=0 für einige

Millisekunden die kapazitiven Ströme der Oozytenmembran überlagert, so daß auf den Zeitpunkt des Umschaltens auf -100mV zurückextrapoliert werden muß. Für alle Stromkurven eines Meßdurchgangs wurde dabei dieselbe Zeitkonstante angepaßt. Mit den Strömen $I(V)$ wurden die Parameter der folgenden Boltzmannfunktion bestimmt:

$$I(V) = I_{\text{offset}} + (I - I_{\text{offset}}) \cdot \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{zF(V_{1/2} - V)}{kT}\right)}} \quad (5)$$

Hierbei ist I_{offset} ein konstanter Strom der zum großen Teil durch endogene Oozytenkanäle hervorgerufen wird, z ist die Schaltladung und $V_{1/2}$ die Spannung bei halbmaximaler Aktivierung. R ist die Gaskonstante und T die absolute Temperatur.

Durch Normierung auf den maximalen Stromwert bei +100mV wurde die Offenwahrscheinlichkeit errechnet.

$$p(V) = \frac{I(V)}{I_{\text{max}}} \quad (6)$$

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Hydrophobizitätsanalyse der CLC-Kanäle

Nach Aufklärung der Aminosäuresequenz eines neu entdeckten Membranproteins besteht zunächst die vergleichsweise einfache Möglichkeit, anhand eines Hydrophobizitätsprofils einen Überblick über potentiell in der Membran liegende Abschnitte zu erhalten. Hierbei wird jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren ein relativer Hydrophobizitätswert zugeordnet, der z.B. aus dem Verteilungskoeffizienten für das Zweiphasensystem Wasser/n-Octanol gewonnen werden kann (z. B. Radzika und Wolfenden, 1988). Im einfachsten Fall erfolgt dann eine gleitende Mittelwertbildung, indem der Aminosäure an Position X der Mittelwert (H) der Hydrophobizitäten von $X-n$ bis $X+n$ zugeordnet wird.

$$H(X) = \frac{\sum_{i=X-n}^{X+n} h(i)}{2n+1} \quad (7)$$

Das Intervall $X-n$ bis $X+n$ wird hierbei als Fenster bezeichnet, die Fensterbreite ist $2n+1$. Die obige Gleichung gewichtet alle Aminosäuren im Fenster gleich (Rechteck-Fenster). Durch speziellere Fensterfunktionen (Trapez, Gaußkurve) kann auch eine mittlenbetonte Mittelung erfolgen.

Eine Hydrophobizitätsanalyse erfolgte nach Klonierung des ersten spannungsgesteuerten Chloridkanals, ClC-0 aus *Torpedo marmorata* (Jentsch *et al.*, 1990). Dabei wurden 13 Bereiche ausreichender Länge und Hydrophobizität gefunden und als potentielle Transmembrandomänen D1 bis D13 benannt. In Abb. 20 werden entsprechende Diagramme für drei Mitglieder der CLC-Familie gezeigt, wobei sowohl ein enges (11 Aminosäuren) als auch ein weites (21 Aminosäuren) Fenster verwendet wurde. Letzteres führt zu stärkerer Nivellierung der Werte und blendet sehr kurze hydrophobe Bereiche aus.

Beim ClC-0 finden sich in den ersten 400 aminoterminalen Aminosäuren acht deutlich voneinander getrennte Maxima, die auch bei Mittelung mit dem weiten Fenster Hydrophobizitätswerte über 1,0 erreichen, wobei D3 und D4 am schwächsten ausgeprägt sind. Es schließt sich ein Block von etwa 110 Aminosäuren Länge an, der in der Mitte von einem kurzen hydrophilen Bereich unterbrochen wird. Da diese Abschnitte theoretisch je zwei Transmembrandomänen mit je ~20 Resten beherbergen könnten und die zweite Hälfte des Blocks auch zweigipflig erscheint, wurden hier die Bezeichnungen D9 bis D12 zugeordnet. Weiter carboxyterminal folgt ein rund 250 Aminosäuren langer, hydrophiler Bereich, der kurz vor dem C-Terminus durch ein weiteres hydrophobes Segment begrenzt wird, welches ebenfalls für einen Membrandurchgang geeignet wäre. Im Diagramm für ClC-0 zeigen sich zwischen Fenstergröße 11 und 21 keine auffallenden Unterschiede.

Das Diagramm für hClC-1 als demjenigen Säugerkanal mit der größten Homologie zu ClC-0 zeigt im wesentlichen das gleiche Bild. Die Domänen D3 und D4 sind hier etwas stärker ausgeprägt, hingegen ist die hydrophile Senke zwischen D10 und D11 nur sehr schwach. Der Carboxyterminus ist länger, wobei der Abstand von D12 zu D13 größer ist. Auffällig ist ein hier zweigipfliger Bereich moderater Hydrophobizität kurz nach D12.

Nach Klonierung weiterer ClC-Kanäle zwischen 1991 und 1995 ist es nun auch möglich, ClC-Kanäle mit geringer Sequenzhomologie bezüglich des Hydrophobizitätsprofils zu vergleichen. Nimmt man an, daß Membrandomänen und andere funktionell wichtige Bereiche evolutionär konserviert sind, so ist auch der Umkehrschluß denkbar, daß bezüglich der Hydrophobizität variable Domänen keine Kandidaten für Transmembransegmente sind.

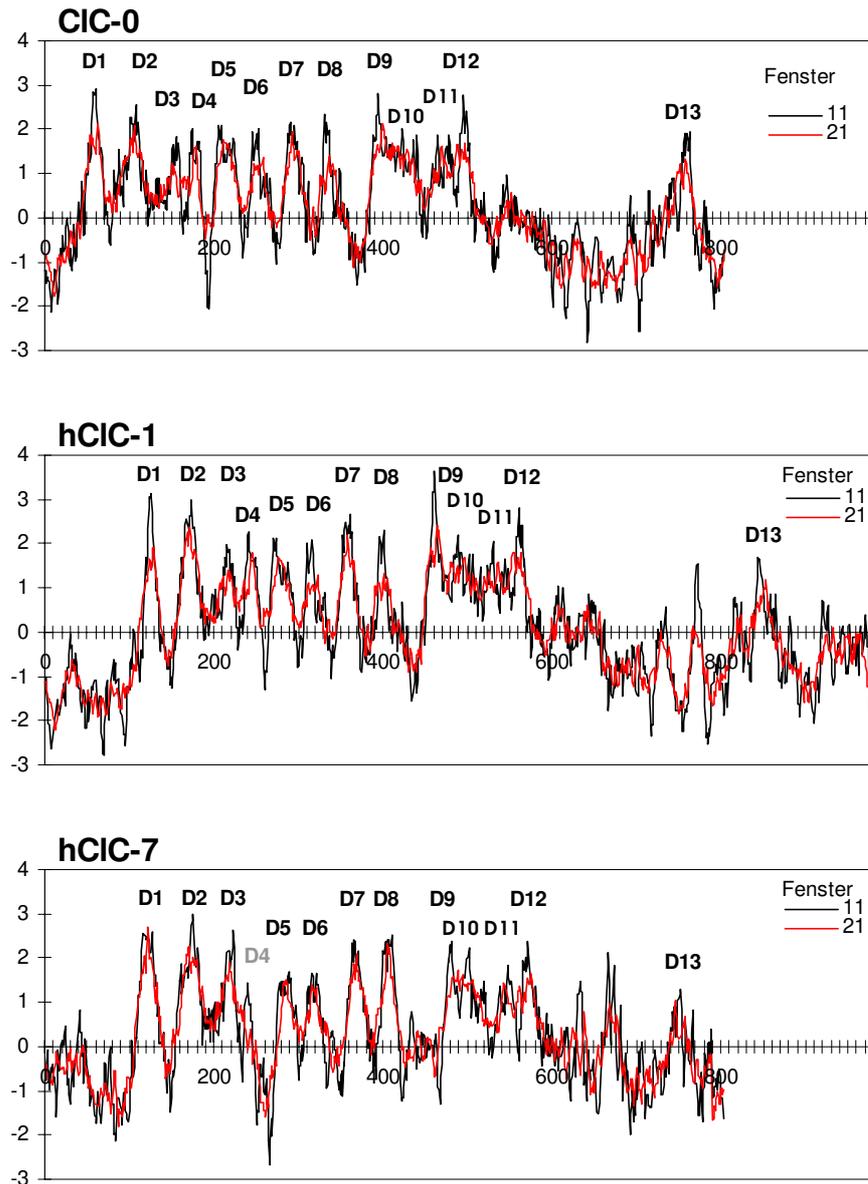


Abb. 20 Vergleichende Gegenüberstellung der CIC-Hydrophobizitätsplots nach KYTE und DOOLITTLE (Kyte und Doolittle, 1982), repräsentiert durch hCIC-0, hCIC-1 und hCIC-7. Es sind jeweils zwei Graphen mit gleitender (Rechteck-)Mittelung über 11 (schwarz) und 21 (rot) Aminosäuren in einem Diagramm dargestellt. Die X-Achsenkala gibt die Aminosäureposition an.

Als Beispiel für einen Vertreter mit nur rund 23% Proteinhomologie zur CIC-0/hCIC-1 ist hCIC-7 gezeigt. Auffälligerweise erscheint hier das D4 entsprechende Segment nur, wenn man ein Fenster von 11 Aminosäuren bei der Mittelung verwendet. Auch dann ist es nur etwa halb so lang wie bei CIC-0/hCIC-1 und erreicht nur Hydrophobizitätswerte um eins. Bei einer Fensterlänge von 21 erscheint es gar nicht mehr. Auch der Abschnitt D13 ist nur noch von mäßiger Hydrophobizität, vergleichbar denen kurz hinter D12. Analysen der restlichen Mitglieder der Säuger-CLC-Kanäle ergeben Resultate mit Variationen innerhalb des anhand von Abb. 20 erläuterten Spektrums.

3.2 Anwendung von Strukturvorhersage-Algorithmen

Die Vorhersage von Transmembrandomänen aufgrund der Hydrophobizität allein ist sehr unsicher. Modernere Algorithmen, wie der im Programm TMAP (Persson und Argos, 1994) verwendete, greifen auch auf Daten anderer, bereits strukturell aufgeklärter Membranproteine zurück. So sind z.B. die Häufigkeiten, mit der man bestimmte Aminosäuren im Zentrum oder an den Enden von Transmembranhelices findet, unterschiedlich. TMAP verwendet daher unterschiedliche Wahrscheinlichkeitsindices der Aminosäuren für diese Regionen. Auch die „positive inside“-Regel (von Heijne, 1992) wird berücksichtigt.

```

1  MEQSRSQQRG GEQSWWGS DP QYQYMPFEHC TSYGLPSENG GLQHRLRKDA
51  GPRHNVHPTQ IYGHHEKQFS DREQDIGMPK KTGSSTVDS KDEDHYSKQ
                                     D1
101 DCIHRLGQVV RRKLGEDWIF LVLGLLMAL VSWMDYVSA KSLQAYKWSY
                                     D2
151 AQMQPSLPLQ FLVWTFPLV LILFSALFCH LISPQAVGSG IPEMKTILRG
                                     D3                                     D4
201 VVLKEYLTMK AFVAKVVALT AGLGSGIPVG KEGPFVHIAS ICAAVLSKFM
                                     D5
251 SVFCGVYEQP YYYSDILTVG CAVGVGCCFG TPLGGVLSI EVTSTYFAVR
                                     D6
301 NYWRGFFAAT FSAFVERVLA VWNKDAVTIT ALFRTNFRMD FPFDLKELPA
                                     D7                                     D8
351 FAAIGICCGL LGAVFVYLHR QVMLGVRKHK ALSQFLAKHR LLYPGIVTFV
401 IASFTFPPGM GQFMAGELMP REAISTLFDN NTWVKHAGDP ESLGQSAVWI
                                     D9                                     D10
451 HPRVNVVIII FLFFVMKFWM SIVATTMPIP CGGFMPVFVL GAAFGRLVGE
                                     D11
501 IMAMLPPDGI LFDDIIYKIL PGGYAVIGAA ALTGAVSHTV STAVICFELT
                                     D12
551 GQIAHILPMM VAVILANMVA QSLQPSLYDS IIQVKKLPYL PDLGWNQLSK
601 YTIFVEDIMV RDVKFVSASY TYGELRLLQ TTVKTLPLV DSKDSMILLG
651 SVERSELQAL LQRHLCPERR LRAAQEMARK LSELPYDGKA RLAGEGPPGA
701 PGRPESEFAF VDEDEDLDS GKSELPPSLA LHPSTTAPLS PEEPNGPLPG
751 HKQQPEAPEP AGQRPSIFQS LLHCLLGRAR PTKKKTQDS TDLVDNMSPE
                                     D13
801 EIEAWEQEQL SQPVCFDSCC IDQSPFQIVE QTTLHKHTL FSLGLHLAY
851 VTSMGKLRGV LALEELQKAI EGHTKSGVQL RPPLASFRNT TSTRKSTGAP
901 PSSAENWNLP EDRPGATGTG DVIAASPETP VPSPSPEPPL SLAPGKVEGE
951 LEELELVESP GLEEEELADIL QGPSLRSTDE EDEDELIL*
```

Abb. 21 Ergebnis der Strukturvorhersagen mit den Programmen TMAP und PREDICTPROTEIN. In der Aminosäuresequenz von hCIC-1 sind die vorgeschlagenen Transmembranbereiche unterstrichen (TMAP) bzw. überstrichen (PREDICTPROTEIN). Die hydrophoben Domänen aus der Kyte-Doolittle-Analyse sind fett-kursiv dargestellt.

Gibt es zu einem Protein weitere Homologe oder gar Vertreter derselben Proteinfamilie, so lassen sich durch Multisequenzvergleiche weitere Informationen nutzen und die Vorhersage von Sekundärstrukturmerkmalen absichern. Wie schon in Abschnitt 3.1 ausgeführt, sollten bestimmte konservierte Strukturmodule in allen oder zumindest den meisten dieser homologen Proteine auftauchen. Auch die Programme TMAP und PREDICTPROTEIN (Rost *et al.*, 1996; Rost und Sander, 1993; Rost, 1994) erlauben die Eingabe mehrerer Proteinsequenzen, oder suchen selbständig in Datenbanken nach Homologen.

Die Proteinsequenzen der bereits klonierten CIC-Kanäle CIC-0 bis CIC-7, CIC-Ka, *S. cerevisiae* scCIC und *E. coli* ecCIC wurden mit den beiden Programme TMAP und PREDICTPROTEIN analysiert. TMAP liefert als Ausgabe die Anfangs- und End-Aminosäuren der postulierten Transmembranhelices. PREDICTPROTEIN gibt zusätzlich für jede Aminosäureposition einen Wahrscheinlichkeitswert an, ob dieser Rest in einer Helix oder einem Loop liegt (nicht gezeigt). In Abb. 21 sind die Ergebnisse in die Sequenz von hCIC-1 eingezeichnet.

Man erkennt, daß in den meisten Fällen die vorhergesagten Transmembrandomänen (TM) mit den hydrophoben Bereichen aus der Hydrophobizitätsanalyse übereinstimmen, wobei Länge und Endpunkte variieren. PREDICTPROTEIN gibt immer 18 Aminosäuren pro TM an, während TMAP zwischen 20 und 30 vorschlägt. Vergleicht man die Mitten der jeweils markierten Bereiche, betragen die Unterschiede aber nur wenige Aminosäuren.

Auffällige Unterschiede gibt es unter anderem bei den Domänen D3 und D4. Während TMAP zwar D3, nicht aber D4 als Membrandurchtritt postuliert, erkennt PREDICTPROTEIN keine von beiden als TM an. Die Wahrscheinlichkeitswerte für Helixstruktur (in Abb. 21 nicht angegeben) erreichen für D3 nur Spitzenwerte von 40% und in D4 nur 20% (zum Vergleich: $\geq 80\%$ bei D1, D2, D5-D12). Eine weitere Unstimmigkeit findet man für D9 und D10. PREDICTPROTEIN schlägt zwei Membrandurchgänge vor, hingegen ist nach TMAP hier nur eine einzelne, lange TM zu finden. Übereinstimmend wird von beiden Programmen D13 als Membrandomäne ausgeschlossen.

3.3 Glykosylierungsstudien

3.3.1 Punktmutationen im hydrophilen Abschnitt D1-D2

Die Biosynthese von Membranproteinen erfolgt am rauhen endoplasmatischen Retikulum, dabei wird bereits die endgültige topologische Orientierung von Transmembranabschnitten, sowie extra- und intrazellulären hydrophilen Bereichen erzielt. Die Glykosylierung von Asparaginresten ist dabei eine spezifische Modifikation von Proteinen, die ausschließlich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums stattfindet. Für Membranproteine ergibt sich daher die Schlußfolgerung, daß Regionen mit glykosylierten Aminosäuren luminal bzw. extrazellulär lokalisiert sind. Experimentell läßt sich die Zuckermodifikation durch eine Verringerung der Mobilität des entsprechenden Proteins in einem SDS-Polyacrylamidgel detektieren.

Die Erkennungssequenz N X T/S (X ≠ P) für die Oligosaccharidtransferase ist sehr kurz und kann einfach in die Primärsequenz eingefügt werden, wobei in vielen Fällen die Funktion des Proteins nicht gestört wird. Insbesondere wenn bereits ein Asparagin, Serin oder Threonin im zu untersuchenden Bereich existiert, reicht die Substitution oder Insertion einer einzigen weiteren Aminosäure, um das Glykosylierungsmotiv zu erzeugen. Für die vorliegende Arbeit schien es daher günstig, sich dieser minimal „invasiven“ Technik zu bedienen.

Wegen des Fehlens eines Signalpeptides bei allen CLC-Kanälen und den Transplantationsexperimenten mit der N-terminalen Inaktivierungsdomäne von ClC-2 (s. Abschnitt 1.2.3) war eine zytoplasmatische Orientierung des Aminoterminus sehr wahrscheinlich. Die hydrophobe Domäne D1 könnte somit als erste potentielle Transmembrandomäne den folgenden hydrophilen Abschnitt zwischen D1 und D2 auf die luminal Membranseite positionieren. Um dies zu testen, wurden die Punktmutanten A140N und K147N in diesem Bereich erzeugt, wobei als Ausgangssequenz die nichtglykosylierbare hClC-1-Mutante N430Q verwendet wurde. Jeweils in Verbindung mit den vorhandenen Serinen S142 bzw. S149 entstand so eine neue, singuläre Glykosylierungssequenz.

Austausch		N		N	
		↓		↓	
Wildtyp	VSWSM	D	<u>YVSAKSLQAYKWS</u>	Y	AQMQLSLPLQFLVWVTEPLV

Abb. 22 Aminosäureaustausche im hydrophilen Segment zwischen D1 und D2, die zu einem Glykosylierungsmotiv führen (unterstrichen). Die hydrophoben Domänen sind fett markiert.

Die Kernglykosylierung von Proteinen führt in SDS-PAA-Gelen zu einem apparenten Größenzuwachs von etwa 2kDa. Um die Mobilitätsunterschiede zwischen glykosyliertem und nichtglykosyliertem hClC-1 deutlicher sichtbar zu machen, wurden die Mutationen in die C-terminal verkürzte Variante NQΔC eingebaut (siehe 2.9.1.1). Nach *in vitro*-Transkription der entsprechenden plasmidkodierten cDNA erfolgte die *in vitro*-Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysate jeweils mit und ohne Mikrosomen. Durch Zusatz von ³⁵S-Methionin wurden die Produkte radioaktiv markiert. Nur bei Anwesenheit mikrosomaler Membranen, welche dem rauhen endoplasmatischen Retikulum entsprechen, sind die notwendigen Enzyme zur Glykosylierung vorhanden. In Abb. 23 erkennt man, daß bei Translation von WTΔC mit Mikrosomen eine zweite, langsamer wandernde Bande entsteht, die bei der entsprechenden Reaktion von NQΔC nicht erscheint. Diese entspricht dem glykosylierten Protein. Durch Verdau mit Endoglykosidase H läßt sich die Zuckermodifikation wieder entfernen, so daß im

Gel nur noch die untere Bande zu sehen ist (ohne Abbildung). Auch bei den beiden Konstrukten 140 Δ C und 147 Δ C ist nur die unglykosylierte Bande vorhanden.

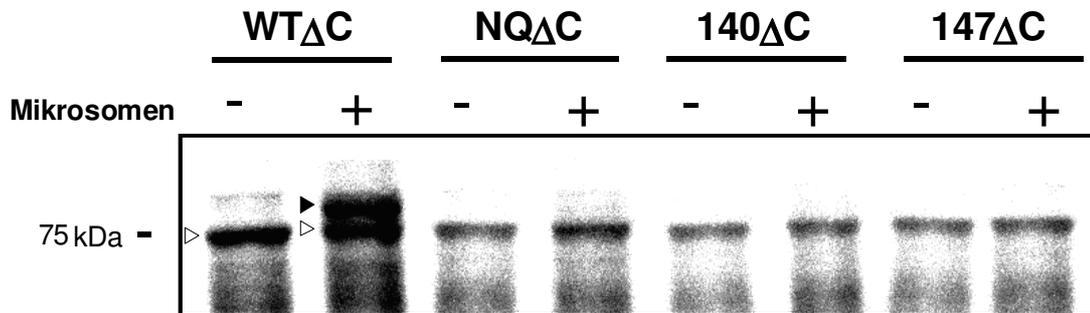


Abb. 23 Autoradiographien von *in vitro* translatierten Proteinen. Neben Wildtyp (WT) und der Mutante ohne Glykosylierungsmotif (NQ) sind die beiden Mutanten A140N und K147N gezeigt. Alle Konstrukte entsprechen der verkürzten Variante von hCIC-1 (Δ C). Jeweils 3 μ l Translationsansatz von Reaktionen ohne (-) oder mit (+) Mikrosomen sind auf einem 8%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt worden. Der schwarze Pfeil bei WT Δ C weist auf die Bande von glykosyliertem, der weiße auf unglykosyliertes Protein.

3.3.2 Transplantierte WT-Glykosylierungssequenz

3.3.2.1 Analyse der *in vitro*-Translationen

Das Ausbleiben der Glykosylierung bei den Punktmutanten A140N und K147N ist kein Beweis für die intrazelluläre Lokalisation des entsprechenden Proteinabschnitts. Schlechte Zugänglichkeit der Erkennungssequenz für die Oligosaccharidtransferase kann ebenfalls die Ursache sein. Aus Datenbankstudien und experimentellen Arbeiten (Landolt-Marticorena und Reithmeier, 1994; Popov *et al.*, 1997) ist bekannt, daß ein bestimmter Abstand der Glykosylierungsstelle von der Plasmamembran erforderlich ist, um effektiv modifiziert zu werden. Ungünstigerweise sind die hydrophilen Bereiche zwischen den Domänen D1 bis D8, bzw. im Block D9-D12 recht kurz und unterschreiten zumeist die erforderliche Mindestlänge von etwa 35 Aminosäuren. Um dennoch verlässliche topologische Informationen zu erhalten und auch um eine Beeinflussung der Glykosylierung durch Nachbarschaftseffekte angrenzender Aminosäuren auszuschließen, wurde darauf verzichtet, die Konsensussequenz mit minimalen Aminosäureaustauschen zu generieren. Statt dessen wurde ein Teil des hydrophilen Abschnittes zwischen D8 und D9, welcher im Wildtyp von hCIC-1 effektiv modifiziert wird, als „Transplantat“ in die zu untersuchenden Verbindungsstücke zwischen den Domänen D1 bis D8, D10/D11 und hinter D12 eingefügt. Hierzu wurde zunächst der 31 Aminosäuren lange Bereich von Phe413 bis Gly444 aus Wildtyp cDNA amplifiziert und mittels rekombinanter PCR in die Mutante NQ Δ C übertragen. In der Abb. 24 ist hCIC-1 als Kugelmodell dargestellt und die Einfügepositionen des Glykosylierungstransplantates sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet.

Anschließend erfolgten radioaktive *in vitro*-Translationen und Gelelektrophoresen, wie schon für die Punktmutanten beschrieben.

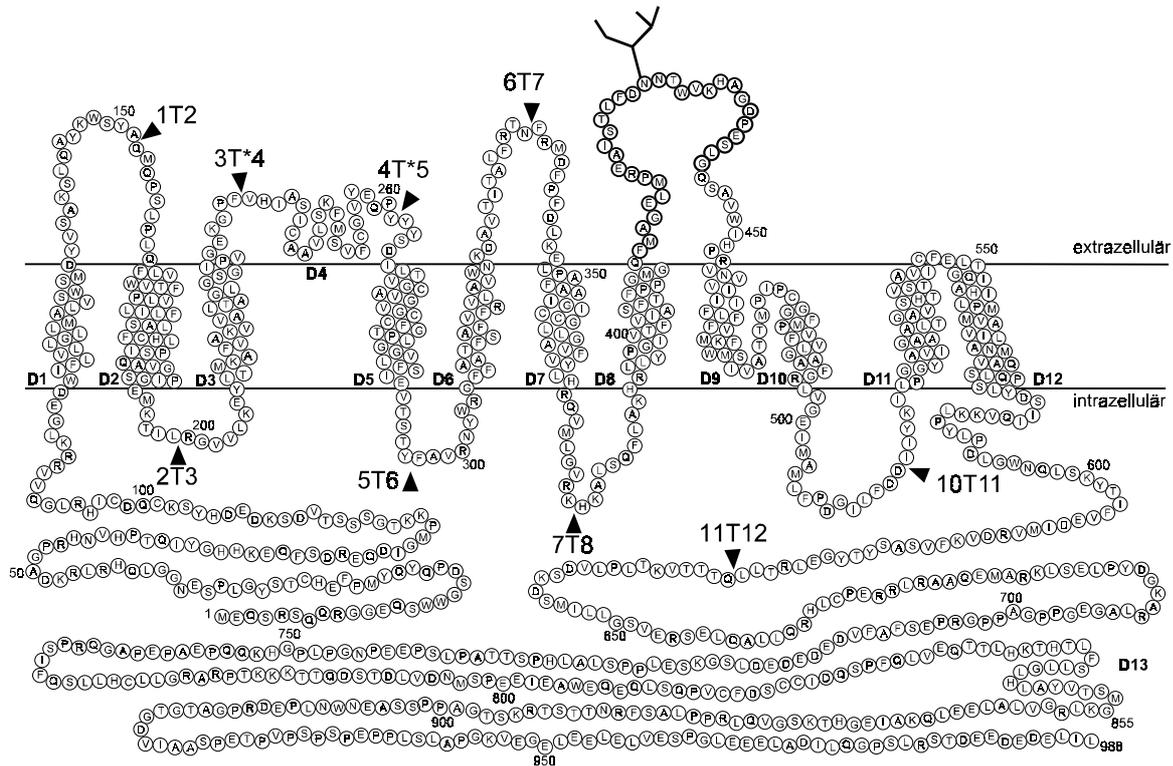


Abb. 24 Kugelmodell von hCIC-1 zur Veranschaulichung der Glykosylierungskonstrukte. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code als Kreise dargestellt. Der Bereich, der als „Glykosylierungstransplantat“ verwendet wurde, ist durch dick umrandete Kreise gekennzeichnet. Schwarze Dreiecke markieren die Positionen, an denen Glykosylierungssequenzen eingefügt wurden. Die Anordnung der Aminosäuren entspricht dem derzeitigen topologischen Modell, wobei alle Details, insbesondere die exakten Enden der Transmembranabschnitte, die Struktur von D4 und der Bereich D9 bis D12, rein spekulativ sind.

Im Autoradiogramm (Abb. 25) finden sich wiederum als Negativkontrolle die Variante von hCIC-1 mit zerstörter Glykosylierungssequenz (N Δ C) und der trunkierte Wildtyp (WT Δ C, unteres Gel) mit der zusätzlichen, glykosylierten Produktbande. Eine weitere Bande bei rund 43kDa findet sich bei allen Translationen. Sie stammt von einer kürzeren cRNA, die nur dann auftritt, wenn hCIC-1 mit SP6-Polymerase synthetisiert wird (C. Lorenz, persönliche Mitteilung und eigene Beobachtung). Im Bereich von D4 kommt es bei einem Teil der RNA-Moleküle reproduzierbar zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch. Daher ist diese Bande bei den Konstrukten 1T2, 2T3 und 3T*4 auch um die Größe des Transplantates vergrößert.

Außer dem Wildtyp (WT Δ C) werden auch die Mutanten 1T2 Δ C und 6T7 Δ C glykosyliert. Die Konstrukte 3T4 Δ C und 4T5 Δ C ließen sich unter Verwendung des Standard-Transplantates zunächst nicht modifizieren (Ergebnisse in Abb. 25 nicht gezeigt). Falls die Domäne D4 extrazellulär liegt, wäre es möglich, daß sie den Zugang zu den flankierenden Proteinabschnitten behindert. Daher wurden die Versuche wiederholt und ein längeres Glykosylierungstransplantat T*, entsprechend dem Abschnitt Gly409 bis Val456, verwendet. Tatsächlich erfolgte nun eine Zuckermodifikation zwischen D4 und D5, wie man an der Doppelbande beim Konstrukt 4T*5 erkennt. Der Abschnitt zwischen D3 und D4 blieb jedoch weiterhin unglykosyliert.

Bei der Optimierung der *in vitro*-Translationen wurde auch versucht, die Ausbeute an glykosyliertem Protein durch Erhöhung der Mikrosomenkonzentration oder Senkung der cRNA-Menge zu verbessern. Dies führte aber nur zu einer insgesamt sinkenden Translationseffizienz, ein Effekt, der auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde.

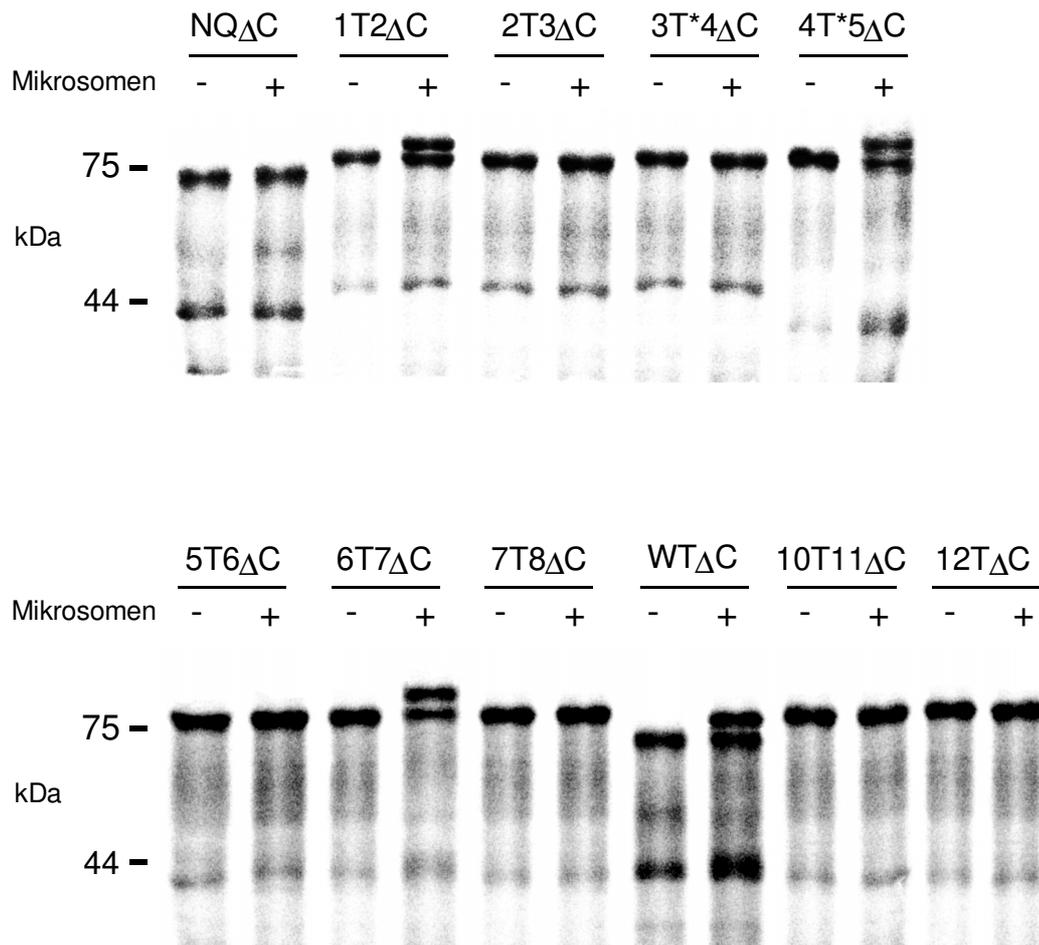


Abb. 25 Autoradiogramm *in vitro* translaterter cRNA von hCIC-1 mit künstlich eingefügten Glykosylierungsstellen. Inkubationen erfolgten ohne (-) oder mit (+) Mikrosomen, alle Konstrukte sind C-terminal verkürzt (Δ C). WT Δ C enthält das natürliche Glykosylierungssignal von hCIC-1 im Abschnitt zwischen D8 und D9. Dieses fehlt in der Mutante NQ Δ C wegen des Aminosäureaustausches N430Q. „T“ in den anderen Konstrukten bezeichnet das Glykosylierungstrasplantat, und die Ziffern repräsentieren die jeweiligen flankierenden hydrophoben Domänen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe stehen im Einklang mit einer extrazellulären Lage der hydrophilen Abschnitte zwischen D1/D2, D4/D5, D6/D7 sowie D8/D9. Mit den bisherigen Daten läßt sich jedoch nicht klären, ob das Ausbleiben der Glykosylierung zwischen D3 und D4 durch eine sterische Behinderung der Oligosaccharidtransferase verursacht wird, oder ob die Domäne D4 eine Transmembrandomäne darstellt, so daß der Bereich vor D4 dann intrazellulär lokalisiert wäre.

3.3.2.2 Funktionelle Kontrolle der Glykosylierungsmutanten

Die Insertion eines 31 bzw. 47 Aminosäuren langen Abschnitts in hCIC-1 stellte eine relative starke Veränderung der Primärsequenz dar. Es bestand dabei die Gefahr, daß sich dieser Eingriff auch auf die dreidimensionale Struktur des Kanals auswirkt und zu einer Veränderung der Topologie führt. In Anbetracht der Tatsache, daß wahrscheinlich auch bei CIC-1 eine einzelne Polypeptidkette die Kanalpore ausbildet und funktionsstörende Mutationen über das ganze Protein verteilt vorkommen (Meyer-Kleine *et al.*, 1995; Pusch *et*

al., 1995; Steinmeyer *et al.*, 1994), sollte eine unphysiologische Tertiärstruktur zu einem Verlust der Kanalfunktion führen. Andererseits ist das Ausbleiben von Strömen nicht zwangsläufig auf eine veränderte Topologie zurückzuführen. Die Inaktivierung könnte auch auf anderem Wege, z. B. durch verringerte *in vivo*-Stabilität des mutierten Proteins oder falsches intrazelluläres Sortieren, hervorgerufen werden.

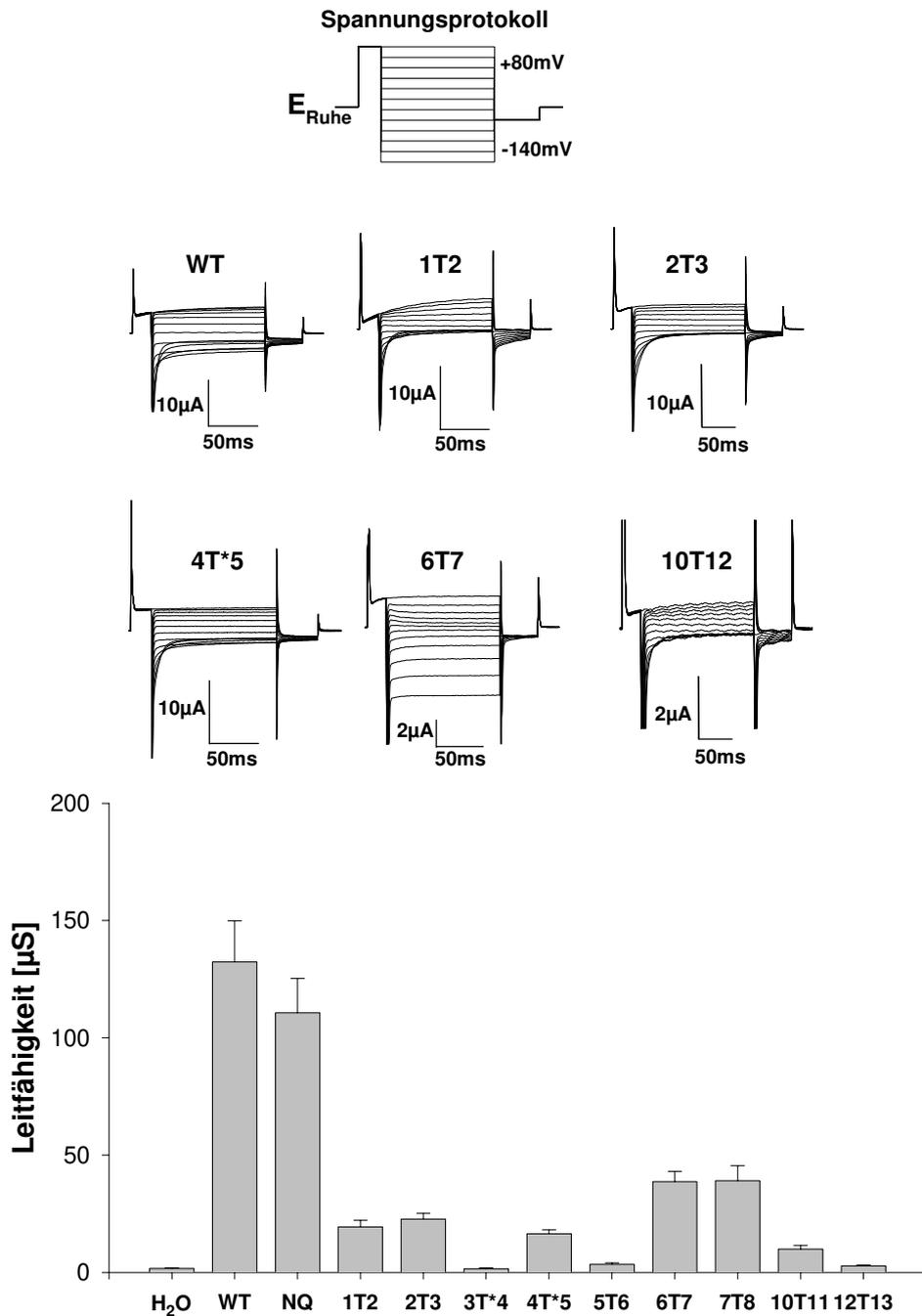


Abb. 26 Untersuchung der Glykosylierungsmutanten mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus*-Oozyten. Oben: Leitfähigkeiten bei -20mV von Wildtyp hClC-1 (WT) und Mutanten im Vergleich zu Wasser injizierten Oozyten. (Mittelwert \pm SEM, n = 4 bis 9). Unten: Pulsprotokoll und typische Stromspuren von WT und den Konstrukten 1T2, 2T3, 4T*5, 6T7 und 10T11.

Eine wichtige Kontrolle für die topologischen Studien ist daher der funktionelle Test der Glykosylierungskonstrukte, was in der vorliegenden Arbeit durch Expression der Kanäle in *Xenopus*-Oozyten erfolgte (s. Abb. 26).

Aus Untersuchungen an Myotoniepatienten ist bekannt, daß Trunkationen am Carboxyterminus von hCIC-1, welche die Domäne D13 einschließen, zum Funktionsverlust führen (Meyer-Kleine *et al.*, 1995). Es war daher nicht möglich, die gleichen trunkierten Konstrukte zu verwenden, die für die *in vitro*-Translation benutzt wurden. Statt dessen wurde entsprechende cRNA mit komplettem C-Terminus verwendet.

Im allgemeinen waren die Ströme von Glykosylierungskonstrukten kleiner, als die von gleichen Mengen WT-cRNA hervorgerufenen. Bei drei Konstrukten, 3T*4, 5T6 und 12T13, waren die Ströme nicht signifikant höher als bei den mit Wasser injizierten Kontrolloozyten. Während zwischen WT und der Punktmutante NQ noch kein signifikanter Unterschied bestand, erreichten die anderen Mutanten mit Transplantat nur rund 5-30% der Leitfähigkeit des WT.

Hervorzuheben ist, daß alle *in vitro* glykosylierten Konstrukte (s. 3.3.2.1) noch funktionelle Kanäle ausbilden konnten. Die Topologie dieser Proteine war offenbar nicht grundlegend verändert. Es ließen sich aber qualitative Unterschiede zum typischen Wildtypstrom feststellen. Die Mutante 1T2 zeigte eine zu positiven Werten verschobene Spannungsabhängigkeit mit zeitabhängig aktivierenden Strömen oberhalb von +40mV. Beim Konstrukt 6T7 blieb die Inaktivierung bei hyperpolarisierendem Membranpotential aus, und seine Rektifizierung war verändert.

3.3.2.3 Bestimmung des Expressionsniveaus von Glykosylierungskonstrukten im *Xenopus*-Oozytensystem

Bei der funktionellen Kontrolle der Glykosylierungsmutanten waren im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringere Ströme gemessen worden, wobei drei Konstrukte sich nicht von den Negativkontrollen unterschieden. Hierfür konnte es unterschiedliche Gründe geben. Zum einen war es möglich, daß die Mutanten eine verringerte Einzelkanalleitfähigkeit besaßen, oder ihre Offenwahrscheinlichkeit reduziert war. Eine andere Erklärung wäre eine reduzierte Proteinexpression, denn die Stromamplitude in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist der Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran proportional.

Um letztere Möglichkeit zu untersuchen, wurden nach der elektrophysiologischen Messung Membranpräparationen der *Xenopus*-Oozyten angefertigt und im Westernblot mit einem spezifischen Antikörper gegen das im C-Terminus eingefügte Hämagglutinin-Epitop detektiert.

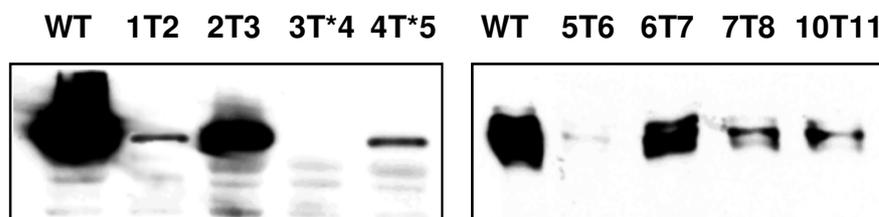


Abb. 27 Western-Blots von hCIC-1 Glykosylierungskonstrukten aus Oozyten-Membranpräparationen. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonale Antikörper 12CA5 gegen das künstliche C-terminale Hämagglutininepitop.

In Abb. 27 wird deutlich, daß die reduzierten Ströme mit ebenfalls reduzierten Proteinmengen einhergehen. Im Vergleich zur Bande des WT-Kanals sind die Signale für die Mutanten deutlich schwächer. Insbesondere dort, wo keine Ströme zu messen waren (3T*4 und 5T6; 12T13 nicht untersucht), finden sich nur minimale Proteinmengen. Obwohl es sich im vorliegenden Fall um eine relativ unspezifische Membranpräparation handelt, in der neben Plasmalemma auch intrazelluläre Membranen vorkommen, kann trotzdem die Aussage gemacht werden, daß die Insertion des Glykosylierungstransplantates zu einer deutlichen Verringerung der Proteinexpression geführt hat. Ob dieser Effekt auf einer schlechteren Translatierbarkeit der cRNA oder verstärkter Degradation des Proteins beruhte, kann anhand der Daten nicht beurteilt werden.

3.4 Proteinase-Protection-Assay

Die N-Glykosylierung der Konsensussequenz N X T/S ist ein sicheres Zeichen für die luminalen Lage des entsprechenden Proteinabschnittes. Hingegen ist das Ausbleiben dieser Modifikation kein verlässlicher Beweis für eine zytoplasmatische Orientierung. Wie schon erwähnt, können andere Gründe, z.B. eine sterische Behinderung der Oligosaccharid-transferase, die Kernglykosylierung verhindern, auch wenn der betreffende Asparaginrest in das ER plaziert wurde. Zur Ergänzung der Topologieanalyse war es daher erforderlich, eine weitere experimentelle Technik anzuwenden und deren Ergebnisse mit denen der Glykosylierungsstudie zu vergleichen.

Der sogenannte „Proteinase-Protection-Assay“ beruht auf der Tatsache, daß die Lipiddoppelschicht des endoplasmatischen Retikulums eine Barriere für Proteinase darstellt. Translatiert man Membranproteine *in vitro* in Gegenwart mikrosomaler Membranen und gibt anschließend eine Proteinase hinzu, so sind alle luminalen und lipidintegrierten Bereiche des Membranproteins vor dem Abbau geschützt, zytoplasmatische Regionen können jedoch verdaut werden. Die Angreifbarkeit durch proteolytische Enzyme läßt sich somit als Kriterium für zytosolische Lokalisation von Proteindomänen verwenden.

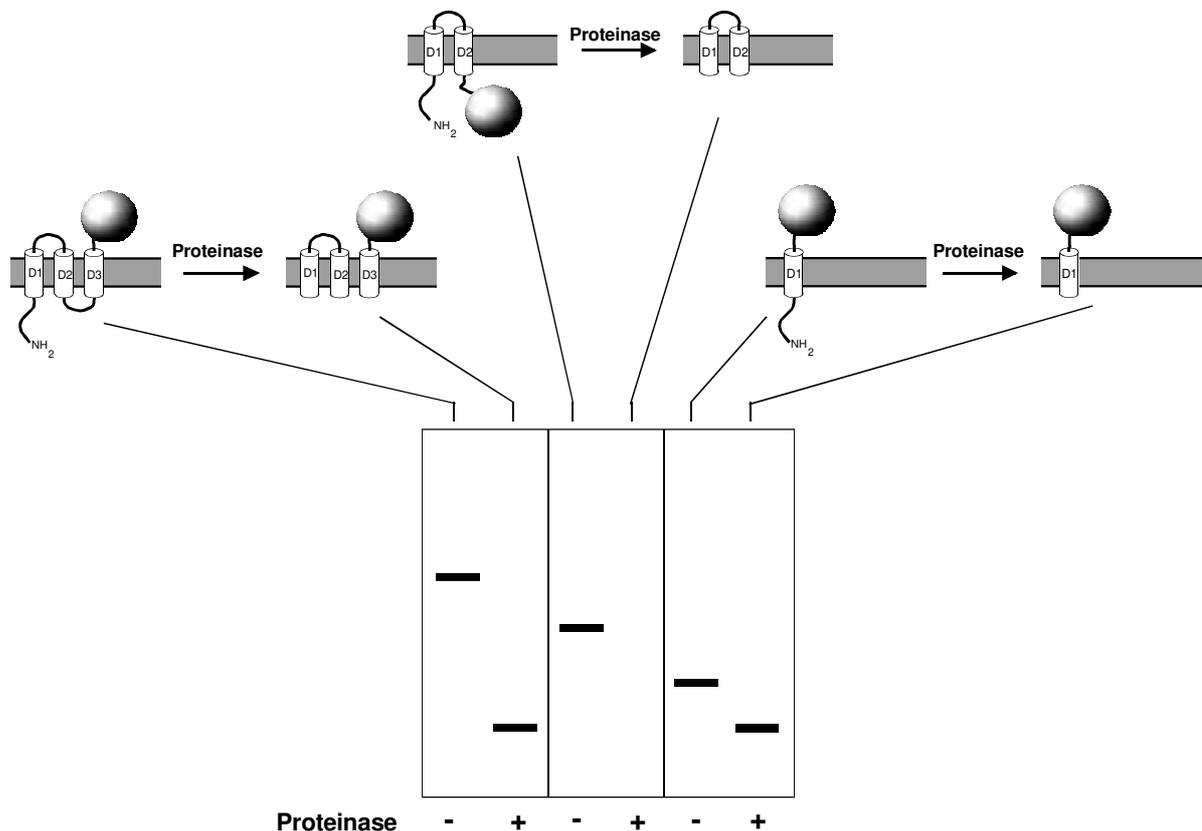


Abb. 28 Prinzip des Proteinase-Protection-Assays mit C-terminalem Reporterepitop. An serielle Trunkationen des zu testenden Membranproteins wird auf cDNA-Ebene ein Reporterepitop fusioniert. Nach *in vitro*-Transkription und -Translation in Gegenwart von Mikrosomen wird Proteinase zugesetzt, welche alle zytoplasmatischen Proteinanteile hydrolysiert. Nach Inkubation werden die Produkte im Westernblot auf Anwesenheit des Reporterepitops getestet.

Häufig, wie im Falle der ClC-Kanäle, sind die (putativen) extrazellulären Bereiche sehr klein und lassen sich nach Proteinasebehandlung schlecht identifizieren. Fusioniert man jedoch an

den Carboxyterminus des zu untersuchenden Proteins ein gut detektierbares Epitop, so wird dieses nur dann degradiert, wenn der C-Terminus zytoplasmatisch lokalisiert ist. Im weiteren kann man dann zunehmende carboxyterminale Trunkationen am Ausgangsprotein vornehmen und jeweils das Reporterepitop anfügen. Je nachdem ob dabei Signalanker- oder Stop-Transfer-Sequenzen deletiert werden, liegt das Epitop geschützt intraluminal oder für die Proteinase zugänglich im Zytoplasma.

In der vorliegende Arbeit wurde ein 17.7kDa großer Teil des bovinen Prolaktins als Reporterepitop verwendet. Dieses Protein verhält sich topologisch neutral (Chavez und Hall, 1992; Rothman *et al.*, 1988; Skach und Lingappa, 1993) und läßt sich mit kommerziell erhältlichen Antikörpern detektieren. Die seriellen Trunkationen von hCIC-1 wurden derart konstruiert, daß die Fusionsstellen zum Prolaktin jeweils kurz vor einer - gemäß KYTE-DOOLITTLE-Analyse - hydrophoben Domäne lagen und somit ein möglichst großer Teil des hydrophilen Verbindungsstückes erhalten blieb, da bekannt ist, daß die Orientierung und der korrekte Einbau von Transmembrandomänen zum Teil von den flankierenden Sequenzen abhängt.

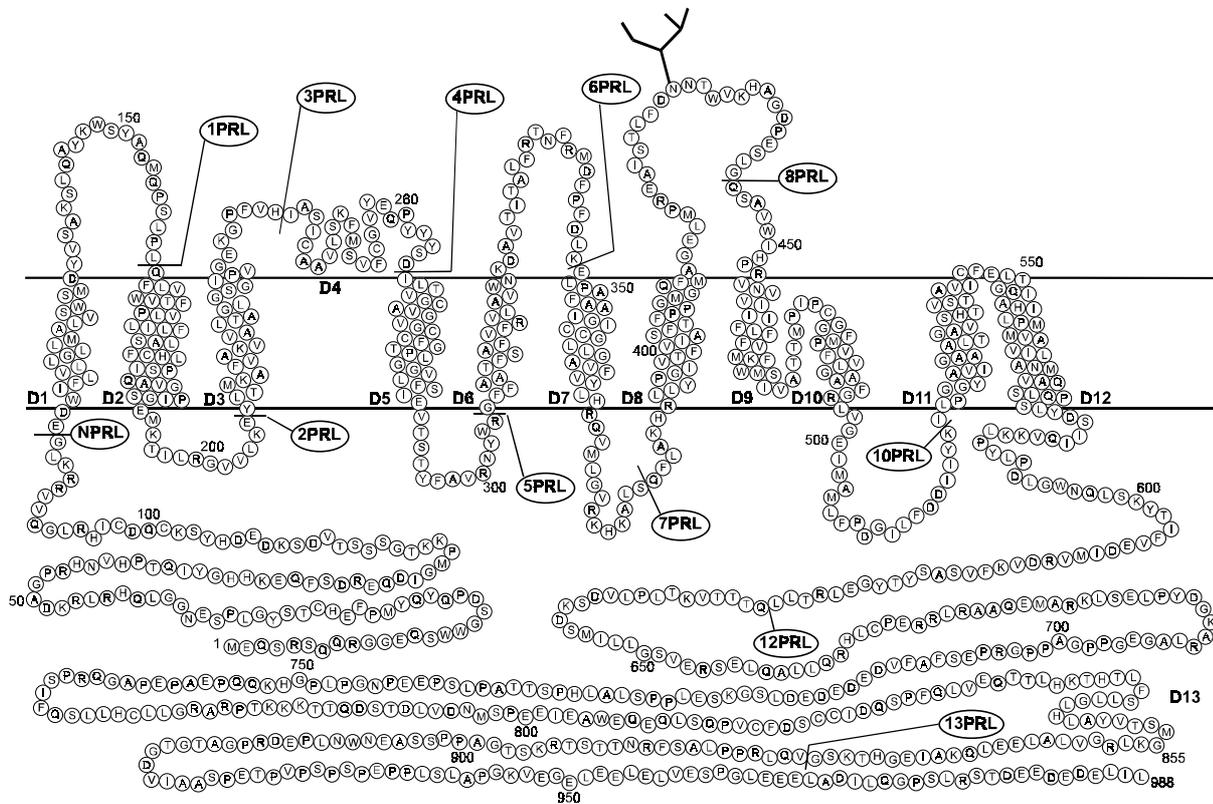


Abb. 29 Darstellung der Fusionspositionen zwischen N-terminalen Abschnitten von hCIC-1 und dem Prolaktin-Reporterepitop. Die exakten Positionen der Aminosäuren, insbesondere im Bereich der Domänen D9 bis D12 sind nicht bekannt.

Nach *in vitro*-Transkription und -Translation in Gegenwart von mikrosomalen Membranen wurde jeweils ein Aliquot des Reaktionsansatzes mit der relativ sequenzunspezifischen Proteinase K verdaut. Bei einem weiteren Aliquot wurde neben der Proteinase zusätzlich 1% des Detergenz Triton X-100 zugesetzt, um die Mikrosomen zu solubilisieren. Dabei werden auch die sonst geschützten Bereiche für den proteolytischen Abbau zugänglich und die prinzipielle Hydrolysierbarkeit des Proteins kann demonstriert werden.

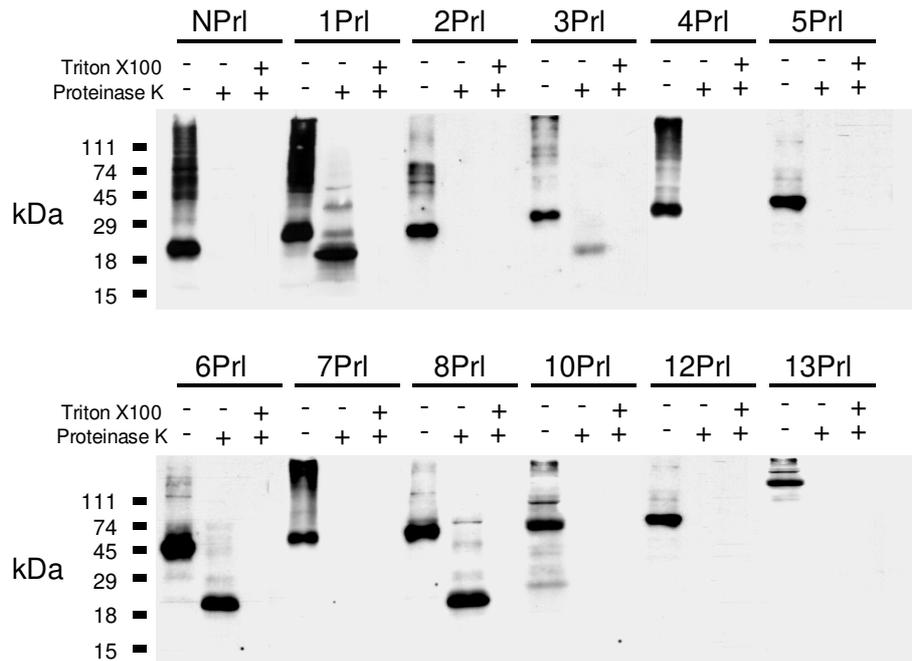


Abb. 30 Proteinase-Protection-Assay mit hCIC-1-Fusionsproteinen. N-terminale Abschnitte zunehmender Länge wurden an das Prolaktinepitop (PrL) fusioniert. Die Ziffern im Konstruktnamen geben die letzte noch eingeschlossene hydrophobe Domäne an. Nach *in vitro*-Transkription und -Translation in Anwesenheit von Mikrosomen wurden die Produkte in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von Triton X-100 mit Proteinase K behandelt. Nach Inaktivierung des Enzyms erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung auf 5-20%igen SDS-PAA Gelen mit anschließendem Transfer auf Nitrozellulosemembranen. Detektiert wurde mit einem anti-Prolaktinserum. Die Kontrollen ohne Proteinase und Detergenz (-/-) wurden gleichartig behandelt.

Der Aminoterminus allein ist nicht in der Lage, das Prolaktin ins Lumen des ER zu translozieren (Konstrukt NPrL in Abb. 30), die Bande des Eduktes von etwa 23kDa verschwindet nach Proteinasebehandlung vollständig. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da keine Signalpeptidsequenz am N-Terminus existiert und das Reporterepitop das Signalpeptid vom Prolaktin nicht mit einschließt.

Das Fusionsprotein 1PrL, das die erste hydrophobe Domäne von hCIC-1 beinhaltet, wird nach Inkubation mit Proteinase K hingegen nicht vollständig abgebaut. Ein etwa 20kDa großes Fragment läßt sich mit anti-Prolaktin-Serum nachweisen. Dieses entspricht dem erwarteten Molekulargewicht vom Prolaktinepitop (17,7kDa) plus einer Transmembrandomäne ($\approx 2,3$ kDa). Offensichtlich hat die Domäne D1 als Signalankersequenz die C-terminal folgenden Proteinabschnitte ins mikrosomale Lumen transloziert, wo sie vor dem Abbau geschützt waren. Zerstörung der Mikrosomen durch Triton X-100 ermöglichte die vollständige Degradation.

Gleich große geschützte Proteinfragmente findet man bei den Konstrukten 3PrL, 6PrL und 8PrL. Entsprechend können die hydrophoben Domänen D3, D6 und D8 ebenso wie D1 als Transmembrandomänen mit Signalankerfunktion betrachtet werden. Bei den Fusionen mit jeweils einer hydrophoben Domäne weniger ließ sich das Reporterepitop hingegen proteolytisch abbauen, was für eine zytoplasmatische Lokalisation des jeweiligen C-Terminus spricht. Die Platzierung des Prolaktins hinter D10, D12 oder D13 führte ebenfalls zu dessen Angreifbarkeit durch Proteinase K, so daß hier ebenfalls eine intrazelluläre Position der Fusionsstellen angenommen werden kann.

Überraschend sind die unterschiedlichen Ergebnisse von Proteinase-Protection-Assay und Glykosylierungsstudien im Bereich D3/D4. Während an allen anderen untersuchten Positionen beide Techniken zu korrespondierenden Ergebnissen kommen, gibt es hier genau entgegengesetzte Resultate (s. Abb. 31).

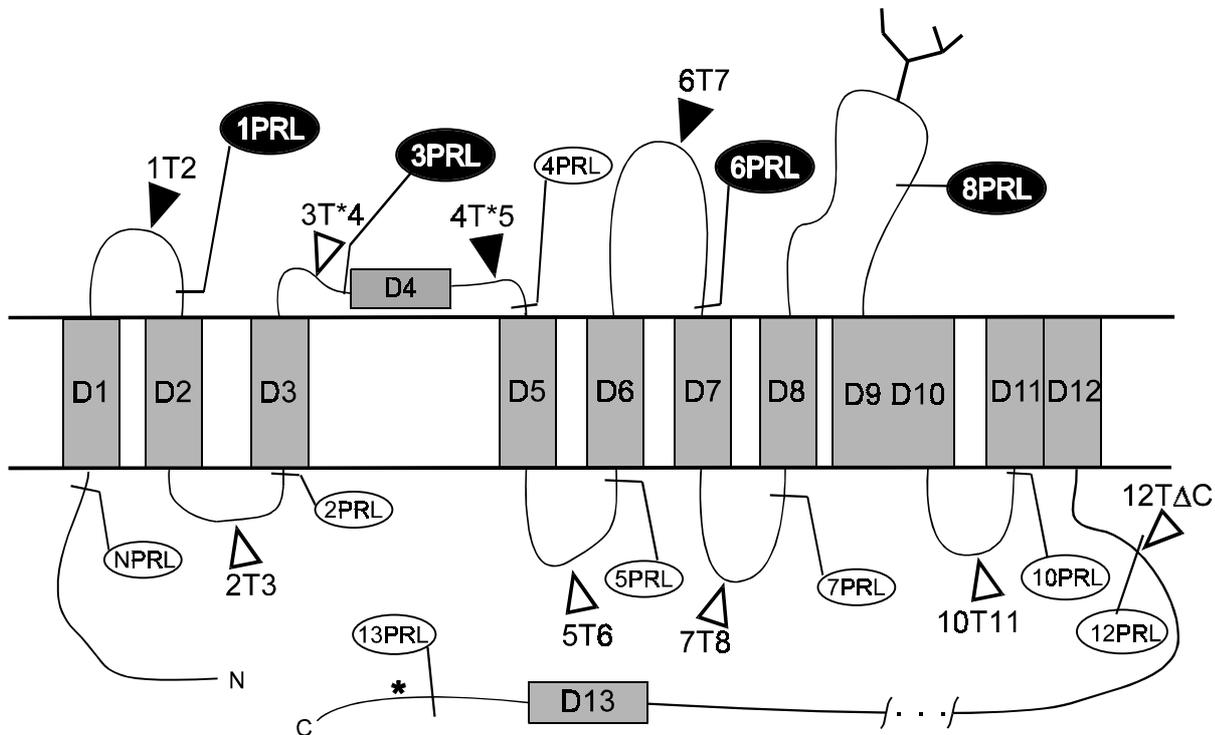


Abb. 31 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der Glykosylierungsstudie und dem Proteinase-Protection-Assay. Hydrophobe Domänen sind hier vereinfacht als graue Rechtecke dargestellt. Dreiecke kennzeichnen die Einfügepositionen für Glykosylierungssequenzen, wobei schwarz gefüllte Symbole deren tatsächliche Modifikation anzeigen. Die Fusionsstellen mit dem Prolaktin-Reporterepitop sind durch Linien und Ovale markiert. Weiße Schrift auf schwarzem Grund zeigt den Schutz vor proteolytischem Abbau an. Eine natürlich vorkommende, aber nicht glykosylierte Konsensussequenz ist mit einem Stern (*) markiert.

Die Position zwischen D3 und D4 wurde nicht glykosyliert, jedoch war das Prolaktin an dieser Stelle im Proteinase-Protection-Assay geschützt, wenngleich die Bandenintensität beim Konstrukt 3Prl deutlich schwächer war als z.B. bei 1Prl oder 6Prl. Eine Möglichkeit zur Erklärung mag sein, daß trotz luminaler Lokalisation die Oligosaccharid-Transferase aus sterischen Gründen keinen Zugang hatte. Weiterhin war die Region zwischen D4 und D5 zwar glykosylierbar und damit offensichtlich luminal, trotzdem war kein Proteinaseschutz im Konstrukt 4Prl gegeben.

Aufgrund der Unstimmigkeiten in der Region D3/D4/D5 wurden zusätzliche Fusionsproteine hergestellt, um die topogenen Eigenschaften der hydrophoben Domänen D3 und D4 isoliert zu untersuchen. Zunächst wurde getestet, ob D3 oder D4 für sich alleine als Signalanker wirken können. Dazu wurde in den Konstrukten ND1Prl und ND3Prl die jeweilige Domäne zwischen dem N-Terminus von hCIC-1 und das Reporterepitop gesetzt. Als Kontrollen dienten gleichartige modulare Fusionen mit D1 und D6, die in den vorangegangenen Experimenten ihre Signalanker-Eigenschaften schon unter Beweis gestellt hatten.

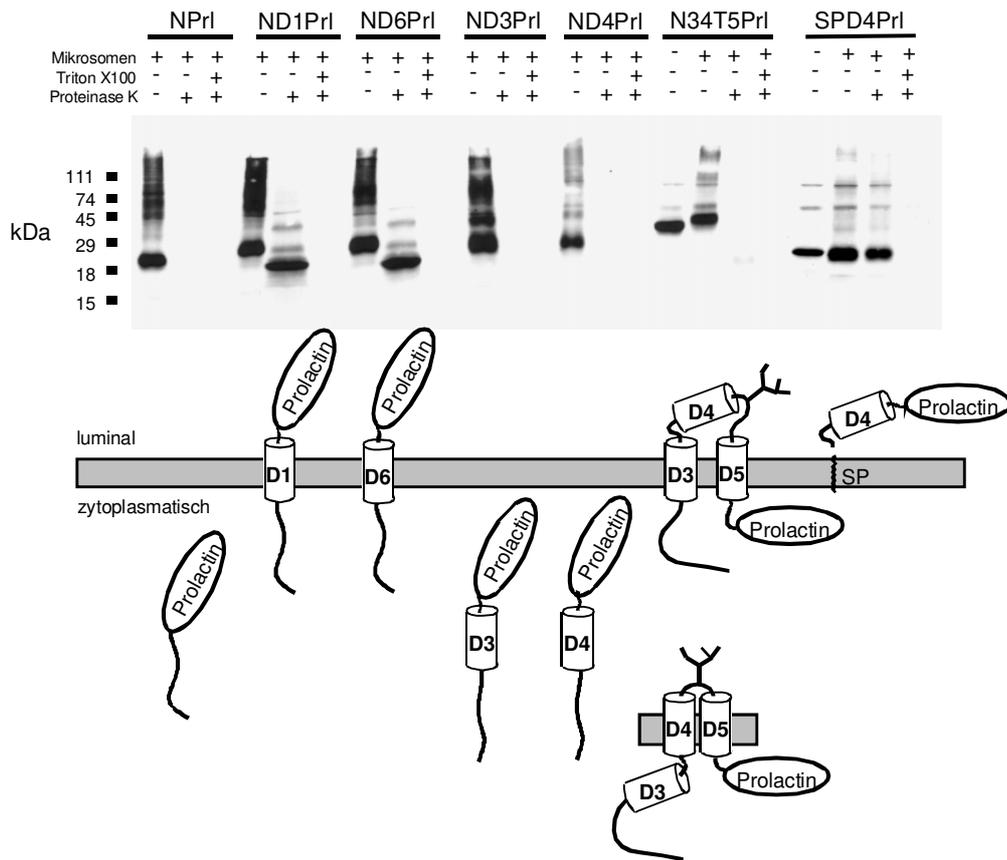


Abb. 32 Test individueller hydrophober Domänen auf ihre topogenen Eigenschaften. Modulare Fusionen aus dem N-Terminus von hCIC-1, der entsprechenden Domäne und dem Prolactin-Reporterepitop wurden wie schon beschrieben einem Proteinase-Protection-Assay unterzogen. Das Konstrukt N34T*5PrI enthält den gesamten Abschnitt von D3 bis D5 inklusive der eingefügten Glykosylierungsstelle, wie im Konstrukt 4T*5 aus Abschnitt 2.9.1.3. Bei SPD4PrI ist gegenüber ND4PrI der N-Terminus gegen das Signalpeptid (SP) von Präprolaktin ausgetauscht. Oben: Westernblot der mittels anti-Prolactin-Serum detektierten Reaktionsprodukte. Unten: Schematische Zeichnungen von Topologien, die mit den Versuchsergebnissen im Einklang stehen.

In Abb. 32 wird deutlich, daß weder D3 noch D4 einzeln in der Lage sind, sich in die Membran zu integrieren und das Reporterepitop auf die luminal Seite zu translozieren, wie es bei den Positivkontrollen N1PrI und N6PrI der Fall ist. Tauscht man im Konstrukt ND4PrI den Aminoterminus gegen das Signalpeptid von Präprolaktin aus, so wird das Fusionsprotein komplett in die mikrosomalen Vesikel transportiert. Der Größenunterschied zwischen der *in vitro*-Translation mit und ohne Mikrosomen resultiert aus der Abspaltung des Signalpeptids in deren Lumen. Ebenso erkennt man die völlige Resistenz gegenüber Proteinase, woraus folgt, daß D4 auch nicht als Stop-Transfer-Sequenz fungieren kann.

Mit dem zusätzlichen Konstrukt N34T*5 konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, daß D5 eine die Membran durchspannende Stop-Transferdomäne ist. Es enthielt den kompletten Sequenzabschnitt von D3 bis D5 und zusätzlich das Glykosylierungstrasplantat zwischen D4 und D5. Während bei Translation mit Mikrosomen die N-terminale Seite von D5 luminal glykosyliert wurde (sichtbar am Anstieg des Molekulargewichtes) lag die C-terminale Seite im Zytoplasma, so daß das Prolaktinepitop von der Proteinase abgebaut werden konnte.

Das bedeutet aber auch, daß D3 und/oder D4 im Ensemble D3/D4/D5 in der Lage ist, einen Membrandurchgang des Proteins zu vermitteln. Zwei mögliche Anordnungen dafür sind in Abb. 32 gezeigt. Diese Beobachtung erklärt auch die Befunde des Proteinase-Protection-

Assays mit den Konstrukten 3Pr1 und 4Pr1. Die Domäne D3 ist isoliert keine geeignete Signalankersequenz. Wenn nur D3 als Nachfolger von D1 und D2 bei der Translation erscheint, gelingt die Membranintegration zumindest bei einem Teil der Proteinmoleküle, wie sich an der schwachen Bande in Abb. 30 zeigt. Folgt aber auch noch die wiederum nur mäßig hydrophobe Domäne D4, so stellt diese ein weiteres Hindernis für die Translokation dar. Erst wenn auch D5 anwesend ist, gelingt die korrekte Topologie.

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, daß bei der Translation der Region von D3 bis D5 zunächst der gesamte Proteinabschnitt synthetisiert wird und erst dann eine Integration *en bloc* in die Membran erfolgt. Ein solcher Mechanismus ist bereits für andere Membranproteine beschrieben worden, hierauf soll in der Diskussion dieser Arbeit näher eingegangen werden.

3.5 Untersuchung ausgewählter Regionen durch Cystein-Austauschmutanten

Bei der bisherigen Topologieanalyse hatten sich zwei mögliche Anordnungen der Domänen D3 und D4 ergeben, die mit den vorangegangenen Experimenten nicht unterschieden werden konnten. Die Klärung der Frage, ob das Verbindungssegment zwischen D3 und D4 im Extra- oder Intrazellulärraum liegt, wird durch zwei Besonderheiten dieser Region erschwert. Zum einen beträgt der Abstand dieser Domänen nur wenige Aminosäuren, was den räumlichen Zugang für Reagenzien erschwert. Zum anderen ist die Sequenz am Übergang von D3 zum folgenden hydrophilen Verbindungsstück stark konserviert, was eine wichtige Funktion der dort befindlichen Aminosäuren nahelegt. Änderungen in diesem Bereich sind daher häufig mit Funktionsverlust des Kanals verbunden, wie auch die Glykosylierungsexperimente gezeigt haben. Bei der Suche nach geeigneten experimentellen Ansätzen mußten diese Gesichtspunkte berücksichtigt werden.

Es bot sich daher eine Technik an, die unter der Bezeichnung „substituted cysteine accessibility method“ (SCAM) zur Analyse des Acetylcholinrezeptors eingeführt wurde (Akabas *et al.*, 1992). Hierbei werden einzelne Aminosäuren des Membranproteins gegen Cystein ausgetauscht, was häufig ohne Beeinträchtigung der Funktion möglich ist. Die Zugänglichkeit dieser Positionen kann dann durch Zugabe von Sulfhydrylgruppen-selektiven Methanthiosulfonatverbindungen (MTS) getestet werden. Diese bilden eine Disulfidbrücke mit dem Cystein und fügen je nach verwendetem Reagenz einen geladenen und/oder voluminösen Rest an definierter Position ein. Durch Funktionstest des Proteins vor und nach Reagenzapplikation kann überprüft werden ob eine Reaktion stattgefunden hat. Diese Methode ist jedoch nur unter bestimmten Bedingungen erfolgreich:

- Das MTS-Reagenz darf nicht membrangängig sein.
- Das Wildtypprotein darf durch MTS-Reagenz nicht beeinträchtigt werden.
- Der Austausch gegen Cystein darf nicht zum völligen Funktionsverlust führen.
- Nur wenn die MTS-Modifikation an der getesteten Position im Protein zu einer detektierbaren Änderung der Eigenschaften führt, ergeben sich verwertbare Aussagen.

Die genannten Einschränkungen sind auch der Grund, warum die Methode vor allem bei Kanalproteinen zur Untersuchung der Porenregion verwendet wird. Hier läßt sich eine

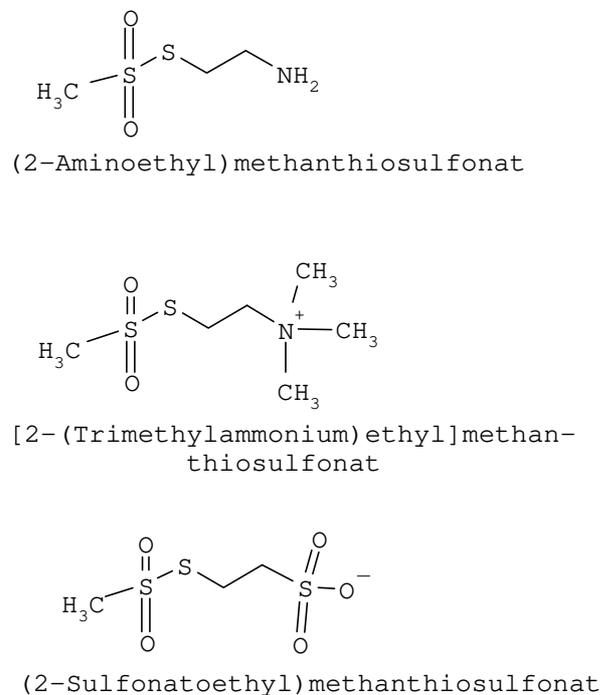


Abb. 33 Strukturformeln der Cystein-spezifischen MTS-Reagenzien.

deutliche Reduktion der Ströme detektieren, wenn durch MTS-Reagenz der Ionenfluß behindert wird.

Aus Experimenten, die am CIC-0 durchgeführt wurden (M. Pusch, persönliche Mitteilung), waren bereits einige Aminosäurepositionen zwischen D2 und D4 bekannt, deren Austausch zu Effekten auf Poreneigenschaften geführt hatten. Equivalente Positionen, wie Serin 189 und Threonin 196, wurden daher auch in das „Cystein-Scanning“ der vorliegenden Arbeit einbezogen. Die folgende Abbildung zeigt die ausgetauschten Aminosäuren.

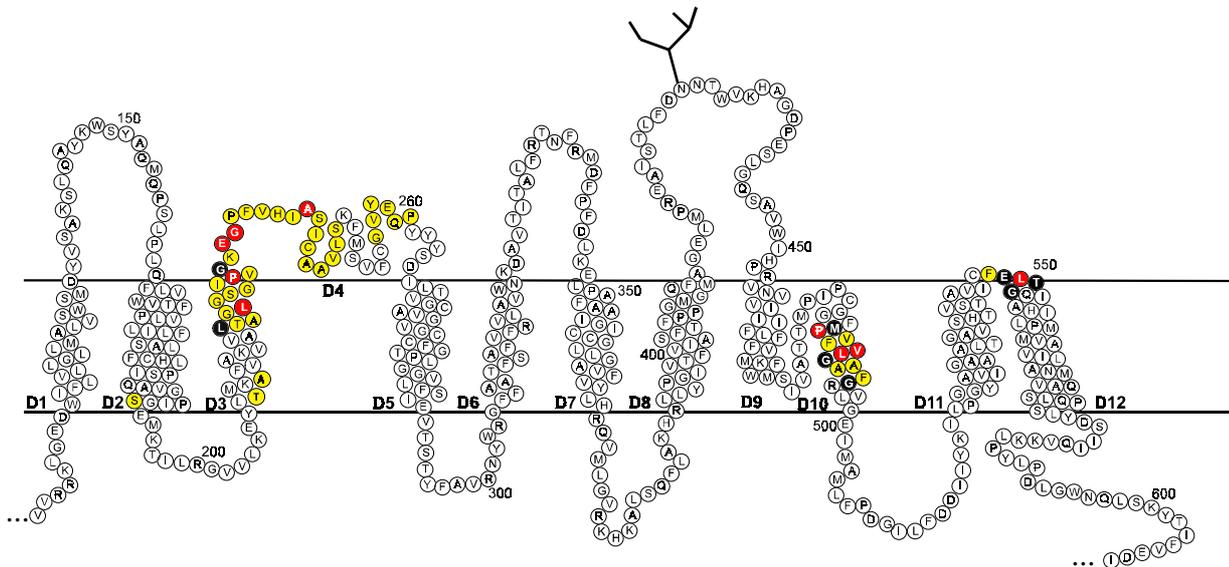


Abb. 34 „Cystein-Scanning-Mutagenese“. Die farblich hervorgehobenen Aminosäuren wurden einzeln gegen Cystein ausgetauscht. Eine rote Markierung zeigt an, wo extrazellulär appliziertes MTS-Reagenz zu einer Änderung der Leitfähigkeit führte. An den gelb gekennzeichneten Positionen waren keine signifikanten Effekte zu beobachten. Schwarz sind diejenigen Aminosäuren dargestellt, deren Austausch gegen Cystein zum Funktionsverlust des Kanals führte.

Der Schwerpunkt der Untersuchung lag im Abschnitt D3/D4, wo alle Aminosäuren zwischen Leucin 219 und Serin 247 ausgetauscht wurden. Prinzipiell bestand auch die Möglichkeit, daß D3 und D4 zusammen einen Membrandurchgang mit S-förmiger Anordnung des Peptidrückgrats ausbilden. Dann wäre das Ende von D4 unter Umständen an der Bildung des äußeren Porenmundes beteiligt. Um diesen Fall zu testen, wurden auch hier sechs Aminosäuren zu Cystein mutiert.

Die Region D11/D12 enthält einen evolutionär konservierten Abschnitt. Die Aminosäuren ...FELTG... sind bei CIC-1 bis -5, -Ka, -Kb, sowie beim Hefehomolog scCIC vorhanden. Noch stärker konserviert ist die Teilsequenz ...ELT..., und das Glutamat ist sogar bei allen klonierten CIC-Kanälen anzutreffen. In Mutagenesestudien an CIC-0 hatten sich hier signifikante Effekte auf die Gleichrichtung und das Schaltverhalten beobachten lassen. Der D11/D12-Abschnitt ist lang genug für zwei Membrandurchgänge und sowohl die Glykosylierungsstudie als auch der Proteinase-Protection-Assay hatten gezeigt, daß die Regionen vor D11 bzw. nach D12 intrazellulär liegen. Es bestand daher Grund zur Annahme, die „FELT“-Region liege auf der extrazellulären Seite der Membran. Hier eingefügte Cysteine sollten also einerseits für MTS-Reagenzien zugänglich sein, und zusätzlich sollte sich die MTS-Modifikation auf Kanaleigenschaften auswirken.

In der Region D9/D10 waren, im Gegensatz zu D11/D12, nur wenige Aminosäuren bekannt, deren Beteiligung an der Pore zu vermuten war: Die dominante Thomsen-Mutante P480L führt dazu, daß sich die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit zu positiveren

Potentialwerten verschiebt (Pusch *et al.*, 1995), während M485V eine Verschiebung ins Negative neben einer deutlich reduzierten Einzelkanalleitfähigkeit zeigt (Meyer-Kleine *et al.*, 1995; Wollnik *et al.*, 1997). Die beiden Mutanten G482R (Meyer-Kleine *et al.*, 1995) und R496S (Lorenz *et al.*, 1994) wurden bei Patienten mit Myotonie vom rezessiven Becker-Typ gefunden. Ein Austausch von Arginin 496 führt dabei zum Verlust der Kanalfunktion. Deswegen wurde von Glycin 495 an - also putativ auf zytoplasmatischer Seite - begonnen, die weiter N-terminal liegenden Aminosäuren gegen Cystein auszutauschen. Die Hoffnung war, mit zunehmender Annäherung an die extrazelluläre Seite MTS-Effekte wie in der „FELT“-Region zu finden. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit sind jedoch erst elf Mutanten getestet worden.

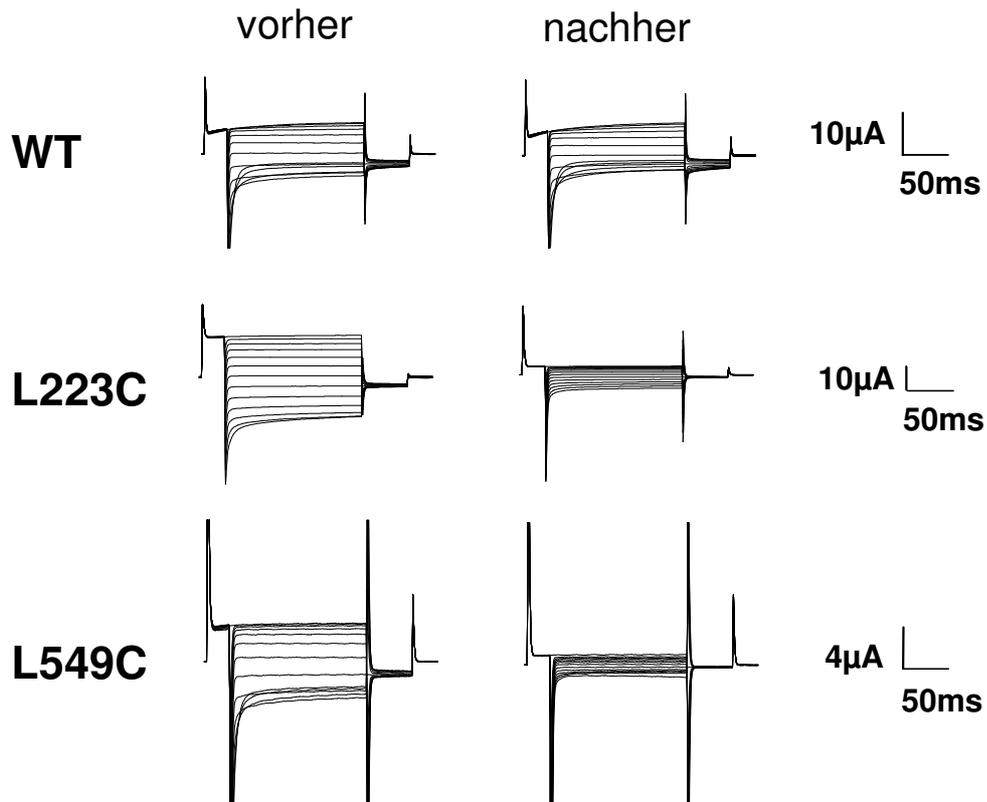


Abb. 35 Effekt von MTSES auf hClC-1-Ströme in *Xenopus*-Oozyten. Dargestellt sind exemplarische Stromkurven von Wildtyp (WT) und den Mutanten L223C und L549C, die mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen wurden. Die Kurven in der linken Spalte wurden vor Reagenzapplikation registriert. Dann erfolgte Zugabe von final 10mM MTSES in die Badlösung, die dem Extrazellulärraum entsprach. Anschließend wurde solange gewartet, bis keine Änderungen der Ströme mehr auftraten, mindestens aber 3min. Schließlich wurde mit frischer Badlösung gespült und die in der rechten Spalte dargestellten Ströme aufgezeichnet.

Die Abbildung 35 zeigt einige exemplarische Stromkurven vor und nach Zugabe von 10 mM MTSES in die Badlösung. Es wurde hier das membranimpermeable Sulfonatoethyl-Derivat verwendet, damit sichergestellt war, daß dessen Zutritt ausschließlich von der extrazellulären Seite aus erfolgt. Wie man sieht, treten keine irreversiblen Änderungen bei den Wildtyp-Strömen auf, eine Vorbedingung für die weiteren Experimente. Hingegen war sowohl bei der Mutante L223C als auch bei L549C eine signifikante Abnahme innerhalb von 3 min zu beobachten, wobei sowohl Auswärts- als auch Einwärtsströme reduziert wurden. Hieraus

ergibt sich, daß die jeweiligen Aminosäurepositionen vom Extrazellulärraum aus zugänglich sein müssen.

Bereits vor Reagenzapplikation bemerkt man bei der Mutation L223C eine verminderte Inaktivierung bei Hyperpolarisation. Schon der Aminosäureaustausch hat sich somit auf das Schaltverhalten des Kanals ausgewirkt. Derartige Effekte lassen sich durch Mutationen an unterschiedlichen Stellen im hCIC-1-Protein erzeugen. In den meisten Fällen handelt es sich dabei wahrscheinlich um indirekte Effekte, die durch Konformationsänderungen hervorgerufen werden.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse des „Cystein-Scannings“ im Bereich D3/D4 zusammengestellt. Es zeigt sich, daß bei relativ vielen Konstrukten eine Reduktion der Ströme um 0-20% zu verzeichnen ist. Wegen der recht deutlichen Schwankungen zwischen unterschiedlichen Chargen von Oozyten ergeben sich teilweise auch große Streuungen. Reduktionen in dieser Größenordnung sind wahrscheinlich auf unspezifische Effekte zurückzuführen. So hatten manche Mutanten reproduzierbar negative Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit injizierter Oozyten. Allgemein geschwächte Zellen waren dann auch sensibler gegenüber MTS-Reagenzien. Ganz eindeutige Effekte, auch bei unterschiedlichen Oozytenpräparationen, ergaben sich jedoch für die Mutanten L223C (83%), P228C (65%), E232C(45%) und G233C (40%). Hingegen sind die auf der putativ intrazellulären Membranseite gelegenen Mutationen S189C, T208C und A211C bezüglich MTSES-Reaktivität vom Wildtyp nicht signifikant verschieden.

Zur Beurteilung der Mutanten mit schwächer ausgeprägter MTS-Sensibilität wurden deren Meßergebnisse mittels *Student-t-Test* klassifiziert. Mit einer Signifikanzschwelle von $P < 0,01$ werden fünf Mutanten erfaßt (schwarze Balken in Abbildung 36), vier in der C-terminalen Hälfte von D3 und im anschließenden hydrophilen Abschnitt, aber nur eine in D4. Bei $0,01 < P < 0,05$ ergibt sich ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp für drei weitere Mutanten: A221C in D3 und I238C sowie A243C in D4 (graue Balken in Abbildung 36).

Die hier gezeigte positionsabhängige MTSES-Reaktivität ist kompatibel mit der topologischen Modellvorstellung, daß D3 eine Transmembrandomäne ist: Cysteine in der C-terminalen Hälfte von D3 sind für kleine geladene Moleküle wie MTSES von der extrazellulären Seite der Plasmamembran aus zugänglich. Die dabei auftretende Beeinflussung der Ionenpassage legt eine Beteiligung von D3 an der Kanalpore nahe. Da auch in D4 an drei Positionen ein MTS-Effekt auftrat, könnte sich dieser Abschnitt ebenfalls in Porennähe befinden. Da die absoluten Werte der Stromreduktion hier geringer waren, besteht die Möglichkeit, daß D4 am extrazellulären Poreneingang liegt, wo die sterische Behinderung für permeierende Ionen weniger stark ist. Diese Hypothese muß durch weitere Experimente überprüft werden.

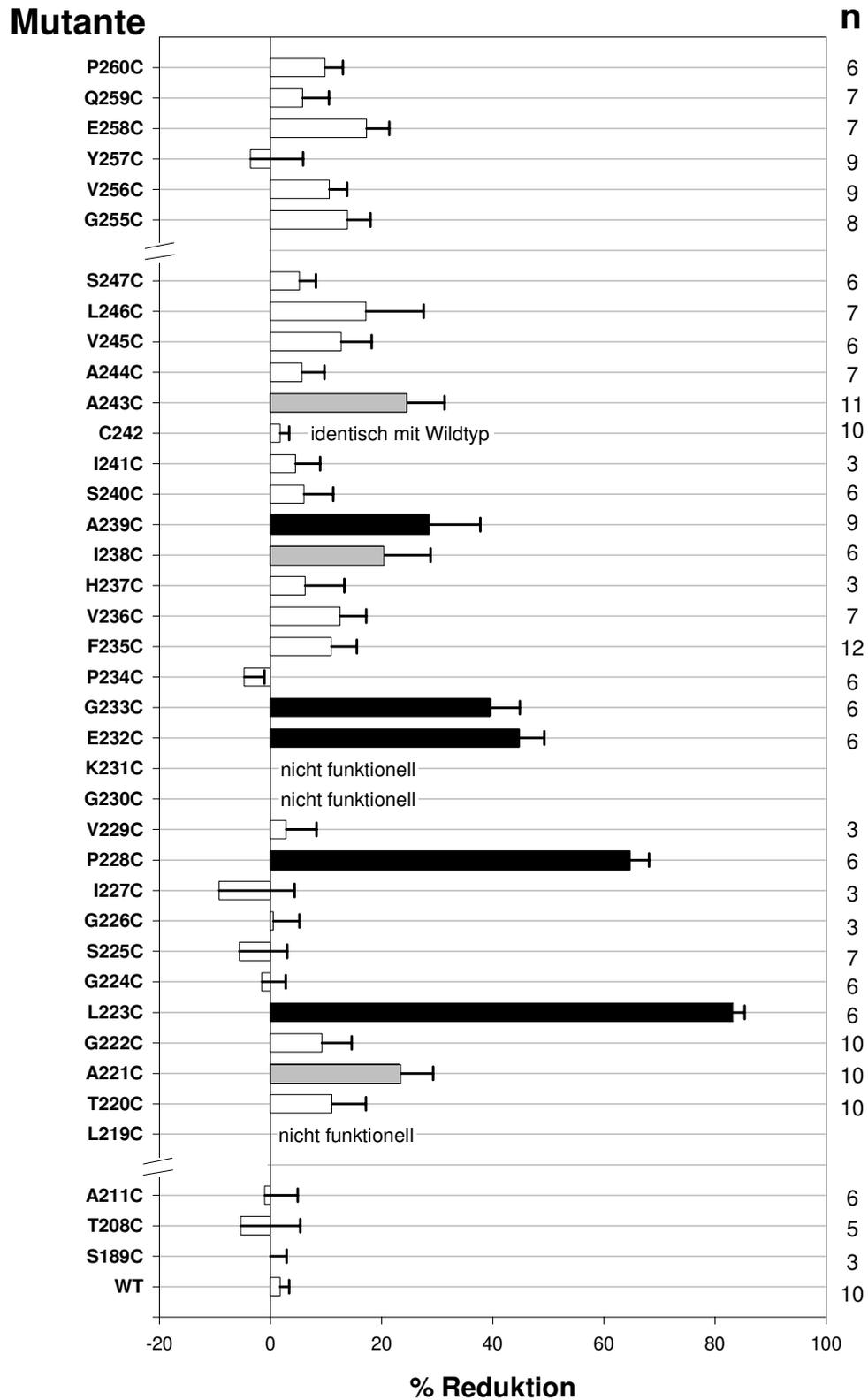


Abb. 36 Übersicht über die Effekte von MTSES auf Cystein-Substitutionsmutanten im Bereich D3/D4 von hCIC-1. Gemessen wurde mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an Oozyten. Dargestellt ist die prozentuale Reduktion der Ströme bei -20mV nach drei- bis fünfminütiger Applikation von 10mM MTSES in die Badlösung und anschließendem Spülen (Mittelwert ± SEM, n = 3-12). Im Vergleich zu WT signifikante Effekte sind gekennzeichnet: Student-t-Test; 0,01 < P < 0,05=grau; P < 0,01=schwarz.

Die Ergebnisse der MTSES-Behandlung auf Cystein-Substitutionsmutanten im Bereich D10 bzw. D11/D12 ist in Abbildung 37 dargestellt. In Domäne D10 fanden sich drei Positionen, L490C, V489C und P486C, deren Modifikation eine signifikante Stromreduktion auslöste. Gerade das Prolin an Position 486 ist innerhalb der CLC-Familie stark konserviert, was auf eine wichtige Funktion schließen läßt. Um so erstaunlicher ist es, das ein Austausch gegen das strukturell sehr verschiedene Cystein ohne Funktionsverlust möglich war. Die Stromkurven unterschieden sich nur wenig vom Wildtyp: Einwärtsrektifizierung und Inaktivierung bei Hyperpolarisation waren schwächer ausgeprägt.

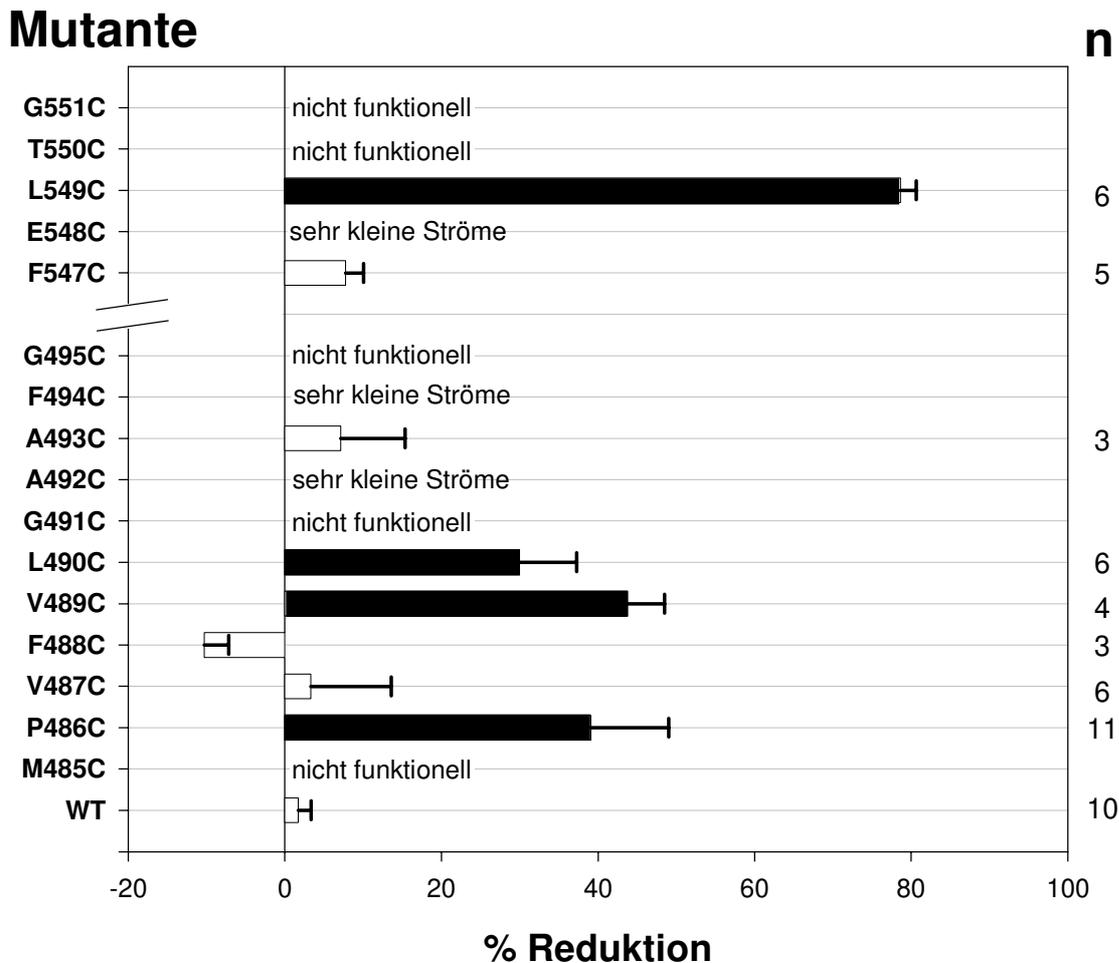


Abb. 37 Übersicht über die Effekte von MTSES auf Cystein-Substitutionsmutanten im Bereich D9/D12 von hCIC-1 in *Xenopus*-Oozyten. Gemessen wurde mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Dargestellt ist die prozentuale Reduktion der Ströme bei -20mV nach drei- bis fünfminütiger Applikation von 10mM MTSES in die Badlösung und anschließendem Spülen (Mittelwert \pm SEM, n = 3-11). Mutanten mit extrem kleinen Strömen waren nicht sinnvoll auswertbar. Im Vergleich zu WT signifikante Effekte (Student-t-Test, $P < 0,01$) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet.

Daneben führten drei Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich zu nichtfunktionellen Kanälen und zwei Mutanten zeigten nur sehr kleine Ströme. Sowohl G491 wie auch G495 sind ebenfalls bei allen CLC-Kanälen konserviert. Dies gilt zwar nicht für M485, aber die in (Wollnik *et al.*, 1997) beschriebene Mutation M485V zeigte bereits Effekte auf Einzelleitfähigkeit und Spannungsabhängigkeit.

Cysteinaustausche in der konservierten „FELT“-Region, Domänen D11/D12, führten bei drei Mutanten zum Verlust der Kanalfunktion. Unter den verbleibenden zwei Konstrukten erwies sich F547C als nicht sensitiv gegenüber MTSES, während bei L549C eine fast 80%ige Hemmung möglich war. Dieser Abschnitt des Kanalproteins muß also ebenfalls vom Extrazellulärraum aus zugänglich sein.

3.6 Weitere Charakterisierung der Region D3/D4

3.6.1 Chimäre Kanäle im Bereich D3/D4

In den bisher beschriebenen Experimenten hatten sich mehrfach Hinweise darauf ergeben, daß D3 eine Transmembrandomäne ist und Aminosäureaustausche hier zu einer Beeinflussung von Ionenpermeation und Schaltverhalten bei hCIC-1 führen. Die Domäne D4 ist offenbar nicht zytoplasmatisch gelegen, aber sie könnte sowohl komplett im Extrazellulärraum liegen, als auch teilweise in die Membran eintauchen. Cystein-Austauschmutagenese hatte, zumindest an den getesteten Positionen, keine direkten Effekte auf die Kanaleigenschaften erkennen lassen. Allein die relativ schwach ausgeprägte Hemmwirkung von MTSES auf die Mutanten I238C, A239C und A243C ließen auf eine eventuelle Porennähe schließen.

Um weitere Einsichten in die Funktion des Abschnittes D3-D4 zu gewinnen, wurde dieser durch rekombinante PCR zwischen den homologen Kanälen hCIC-1, hCIC-3 und hCIC-5 ausgetauscht und getestet, ob sich charakteristische Eigenschaften dabei übertragen lassen. So bestehen z.B. bei den genannten Kanälen Unterschiede in der Leitfähigkeit bei Anwesenheit verschiedener Ionensorten:

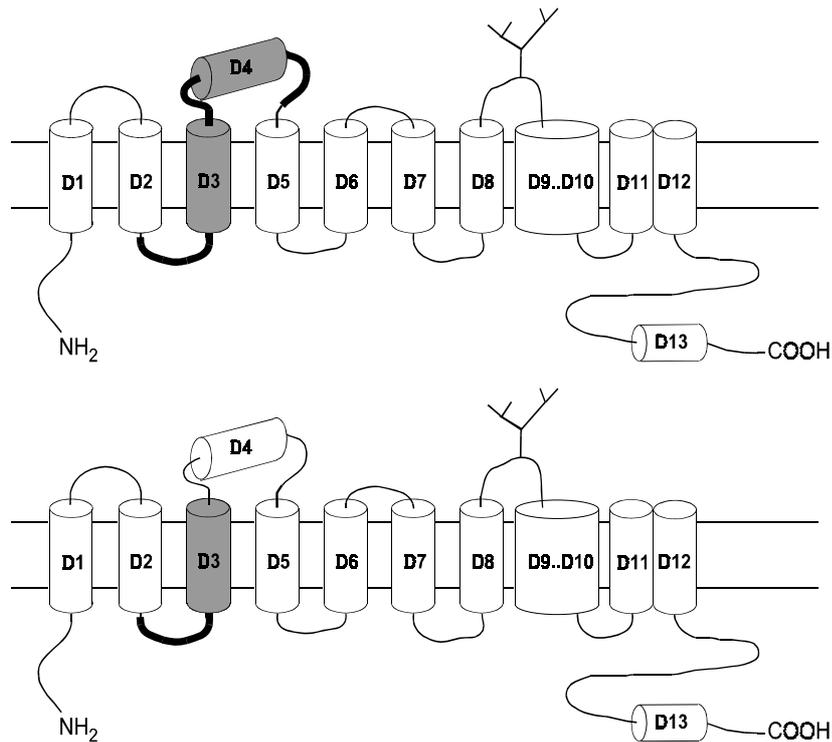
$$\begin{array}{lcl}
 \text{hCIC-1:} & g(\text{Cl}^-) & > g(\text{NO}_3^-) > g(\text{I}^-) \\
 (\text{hCIC-3:} & g(\text{I}^-) & > g(\text{Cl}^-) &)^5 \\
 \text{hCIC-5:} & g(\text{NO}_3^-) & \geq g(\text{Cl}^-) & > g(\text{I}^-)
 \end{array}$$

Die Änderung der Ionenselektivität wäre ein guter Hinweis auf eine Beteiligung dieser Region an der Pore. Auf diese Art könnte auch der Selektivitätsfilter eingegrenzt werden. Abb. 38 zeigt die konstruierten Chimären im Überblick.

Anschließende Expression der chimären Kanäle ergab nur für das Konstrukt hCIC-1(3/4)5 meßbare Chloridströme (s. Abb. 39). Als der chimäre Abschnitt bis auf die Domäne D3 weiter verkürzt wurde, war auch dieses Konstrukt, hCIC-1(3)5, nicht funktionell (ohne Abb.).

Der Austausch wirkte sich bei hCIC-1(3/4)5 nicht auf die Ionenselektivität aus, d. h. die höhere Nitratpermeabilität von hCIC-5 konnte nicht auf hCIC-1 übertragen werden. Jedoch war die Chimäre auswärtsrektifizierend wie hCIC-5. Der Zeitverlauf der Aktivierung ist bei der Chimäre jedoch langsamer als bei hCIC-5.

⁵ Die Angaben der Ionenselektivität für CIC-3 bezieht sich auf die bislang von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduzierten Daten von (Kawasaki *et al.*, 1994; Kawasaki *et al.*, 1995). Auch in unserem Labor konnte CIC-3 bisher nicht exprimiert werden.



Name	Rückgrat von	D3/D4-Region von	nur D3 von
hCIC-1(3/4)3	hCIC-1	hCIC-3	-
hCIC-1(3/4)5	hCIC-1	hCIC-5	-
hCIC-5(3/4)1	hCIC-5	hCIC-1	-
hCIC-1(3)5	hCIC-1	-	hCIC-5

Abb. 38 Konstruktion von chimären CLC-Kanälen. Oben: Austausch der Domänen D3 und D4. Unten: Austausch der Domäne D3. Kanalrückgrat in weiß, „Fremd“-Sequenzen in grau und als fette Linie.

Eine Gleichrichtung kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erreicht werden. Zum einen kann die Spannungsabhängigkeit des Öffnungsprozesses dafür sorgen, daß Ströme nur in einer Richtung fließen, zum anderen kann diese Eigenschaft direkt auf die Pore selber zurückzuführen sein. Als Beispiel für die erste Variante sei die hCIC-1-Mutante I556N gezeigt (s. Abb. 39; s. auch Abschnitt 3.11). Durch eine starke Verschiebung des potentialabhängigen Öffnens auf Werte oberhalb von -40mV, und damit jenseits des Gleichgewichtspotentials für Chlorid, findet man kaum Einwärtsströme. Erst ab etwa -20mV öffnet sich der Kanal, aber nun weist die Triebkraft für Chloridionen bereits nach außen. Mit einem speziellen Spannungsprotokoll kann man aber zeigen, daß bei geöffnetem Kanal auch Ionenfluß in Einwärtsrichtung möglich ist. Klemmt man das Membranpotential nämlich nach aktivierenden positiven Testpulsen rasch auf -60mV, so sind nun Einwärtsströme sichtbar, da der Kanal erst langsam wieder schließt (Pfeile in Abb. 39).

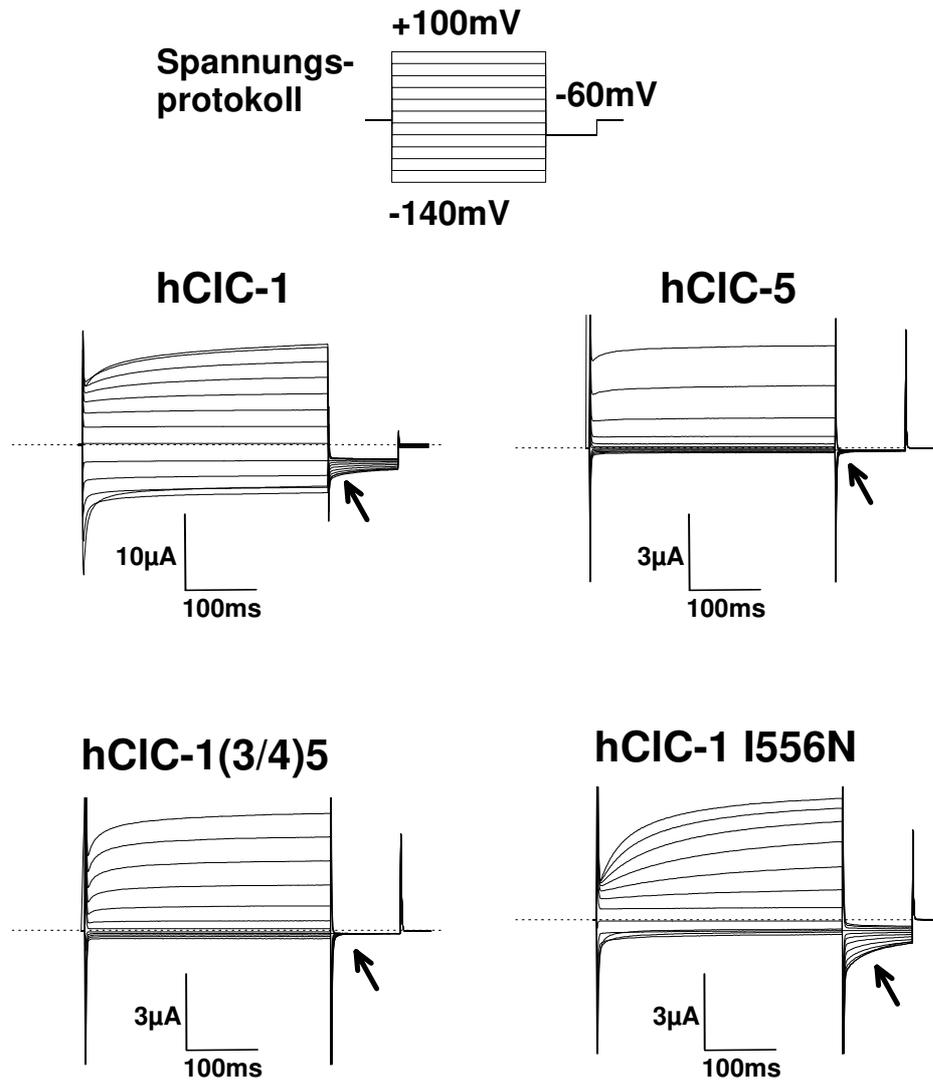


Abb. 39 Elektrophysiologische Charakterisierung des chimären Kanals der Region D3/D4. Oben: Spannungsprotokoll. Mitte und Unten: Exemplarische Stromkurven von hCIC-1, hCIC-5 und Konstrukt hCIC-1(3/4)5, sowie der Myotoniemutante I556N. Einwärtsströme, die durch den konstanten Testpuls bei -60mV hervorgerufen wurden sind durch Pfeile markiert, gestrichelte Linien geben die Nulllinie an.

Solche inaktivierenden Ströme findet man bei hCIC-1 und bei der scheinbar auswärts-
 rektifizierenden Mutante I556N, nicht aber bei hCIC-5 und der Chimäre hCIC-1(3/4)5. Hier
 ist der Kanal nach Testpulsen bis zu +100mV zwar offen, ein porenintrinsischer
 Mechanismus verhindert aber Einwärtsströme, entsprechend einer Chloridionen-Bewegung
 von innen nach außen.

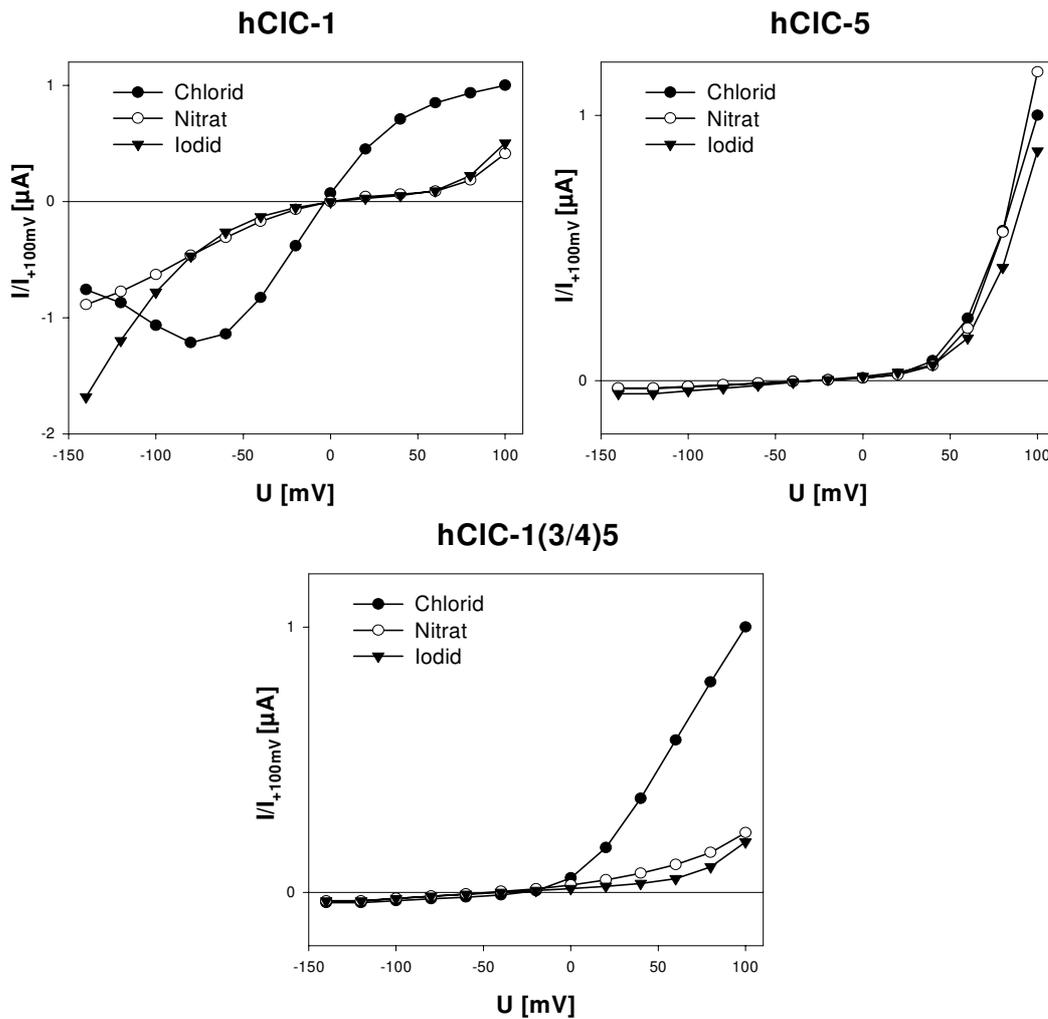


Abb. 40 Darstellung der Ionenselektivität von hCIC-1, hCIC-5 und der Chimäre hCIC-1(3/4)5 anhand von Strom-Spannungs-Kennlinien. Jeweils 80mM NaCl der Standard-Badlösung ND96 wurden gegen die gleiche Konzentration an NaNO_3 oder NaI ausgetauscht. Die Gleichgewichtsströme nach 300ms (s. Abb. 39) sind in Abhängigkeit vom jeweiligen Membranpotential aufgetragen, wobei die Werte auf die Stromstärke in ND96 bei +100mV normiert wurden.

Diese Rektifizierung wird auch in der Darstellung der Strom-Spannungs-Kennlinien deutlich, bei der die Gleichgewichtsströme am Ende der variablen Testpulse gegen die Klemmspannung aufgetragen sind. Bei hCIC-1 bewirkt ein Austausch von 80mM Chlorid in der Badlösung gegen Iodid oder Nitrat eine deutliche Abnahme der Ströme, wobei zusätzlich auch die Inaktivierung unterhalb von -60mV ausbleibt. Hingegen leitet hCIC-5 auch Nitrat und Iodid in Auswärtsrichtung etwa gleich gut. Die Chimäre hCIC-1(3/4)5 zeigt einen gemischten Phänotyp mit der Ionenselektivität von hCIC-1 WT aber der Gleichrichtung von hCIC-5, wobei allerdings die Kanalöffnung schon bei -20mV beginnt.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von hCIC-1 und hCIC-5 im ausgetauschten Bereich (s. Abb. 41), so fallen die Ladungsunterschiede vor und am Beginn von D3 auf. Noch größere Abweichungen ergeben sich in der Region zwischen D4 und D5. Hier gibt es bei hCIC-5 sechs positiv geladene Aminosäuren, aber keine bei hCIC-1. Obwohl auch relativ konservierte Aminosäureaustausche zu drastischen Unterschieden führen können, wie bei den CIC-0 Mutanten D70E in D1 (Ludewig *et al.*, 1997) und S123T hinter D2 (Ludewig *et al.*, 1996), so sind es doch häufig ladungsändernde Austausche von Aminosäuren, die bei Ionenkanälen zu

veränderter Ionenselektivität oder Rektifizierung führen. Weitere Experimente, bei denen die markierten kritischen Positionen einzeln mutiert werden, sollten daher folgen.

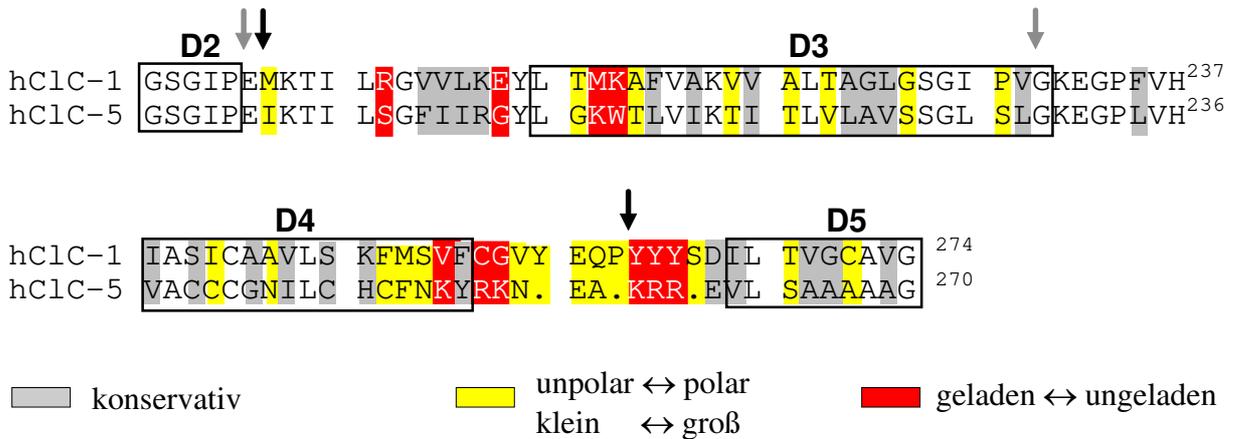


Abb. 41 Vergleich der Aminosäuresequenzen von hClC-1 und hClC-5 in der Region D2 bis D5. Unterschiede sind farblich hervorgehoben. Die Grenzen der in den Chimären ausgetauschten Bereiche sind durch Pfeile gekennzeichnet (schwarz: D3/D4, grau: D3).

3.6.2 Deletion von D4

Der chimäre Kanal, bei dem nur die Domäne D3 von hClC-5 in hClC-1 eingesetzt wurde, war in Oozyten nicht funktionell. Dies beweist aber noch nicht, daß D4 einen essentiellen Abschnitt des Kanals darstellt. Zudem hatten Cystein-Austauschmutationen in diesem Bereich für sich allein keine auffälligen Effekte auf die Ströme gehabt, und nur die Mutante A239C zeigte sich deutlich sensitiv gegenüber MTSES-Modifikation. Um zu klären ob D4 eine „überflüssige“ Domäne darstellt, wurden die Aminosäuren I241 bis Y257 deletiert. Anschließende Expression in Oozyten ergab jedoch keine Ströme (ohne Abbildung). Offensichtlich ist diese Region trotz ihrer schwachen evolutionären Konservierung für die Kanalfunktion wichtig. Bereits im Proteinase-Protection-Assay hatte sich auch gezeigt, daß die Unversehrtheit des Abschnitts D3 bis D5 für eine erfolgreiche Membranintegration essentiell ist.

3.6.3 Glykosylierungsversuche innerhalb D4

Um der Frage nachzugehen, ob die Domäne D4 innerhalb der Membran liegt oder in den extrazellulären Raum hinein ragt, wurden hier Glykosylierungsstellen durch die Punktmutationen I238N, V245N und F249N in Verbindung mit den an Position n+2 schon vorhandenen Serinen erzeugt.

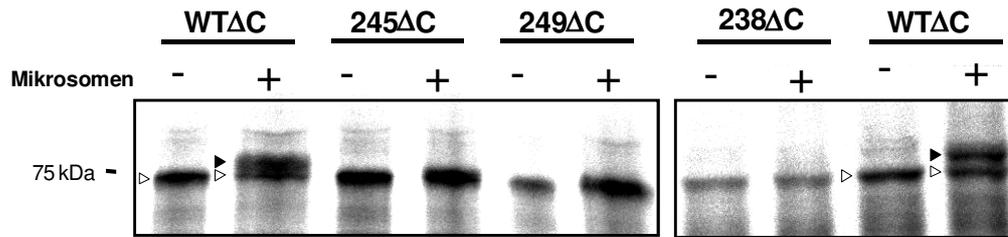


Abb. 42 Autoradiographien von *in vitro* translatierten Proteinen aus zwei getrennten Experimenten. Neben dem Wildtyp (WT) sind die Mutanten I238N, V245N und F249N gezeigt. Alle Konstrukte entsprechen der verkürzten Variante von hCIC-1 (ΔC). Jeweils 3 μ l Translationsansatz von Reaktionen ohne (-) oder mit (+) Mikrosomen sind auf einem 8%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt worden. Der schwarze Pfeil bei WT ΔC weist auf die Bande von glykosyliertem, der weiße auf unglykosyliertes Protein.

Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich ist, wird keine der drei Positionen glykosyliert. Aus diesen Daten läßt sich nicht die Aussage treffen, daß D4 in die Plasmamembran eintaucht, denn auch bei einer komplett extrazellulär liegenden Domäne kann eine - für das Experiment - ungünstige dreidimensionale Faltung den Zugang der Oligosaccharidtransferase behindern. Sollte D4 eine helikale Sekundärstruktur besitzen - obwohl die Wahrscheinlichkeit nach PREDICTPROTEIN (Abschnitt 3.2) gering ist - lägen die ausgetauschten Asparaginreste auf der selben Seite der Helix wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, d.h. es könnte sich bei allen drei Position um denselben schlecht zugänglichen Bereich handeln.

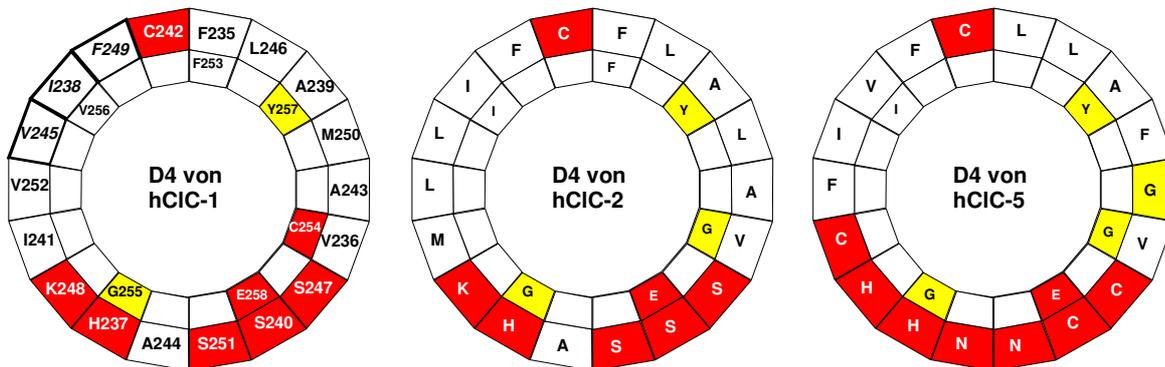


Abb. 43 „Helix-Rad“-Darstellung der Domäne D4 im Vergleich zwischen hCIC-1,-2 und -5. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt und im Fall von hCIC-1 numeriert, hydrophobe Aminosäuren farblos, hydrophile dunkelgrau und Gly, Tyr hellgrau. Die für Glykosylierungsstudien bei hCIC-1 zu Asn mutierten Aminosäuren sind fett umrandet eingezeichnet.

Wie Abbildung 43 verdeutlicht, gibt es bei helikaler Struktur in D4 eine klare Präferenz für die Lokalisation polarer und geladener Aminosäuren in einem $\sim 120^\circ$ -Segment, wobei sich nur ein schwach polares Cystein auf der Gegenseite findet. Diese Konfiguration ist sowohl beim CIC-2 als auch beim schwächer homologen hCIC-5 erhalten. Solche amphipathischen Helices sind typisch für Grenzflächen von Proteinen zum wässrigen Milieu (White, 1994). Derart kleiden sie wassergefüllte Poren aus oder liegen parallel zur Plasmamembran, wobei sie mit ihrem hydrophoben Anteil teilweise in die Lipiddoppelschicht eintauchen. Da die Glykosylierungsmutanten I238N, V245N und F249N alle auf dieser lipophilen Seite der Helix liegen würden, könnte das eine Erklärung für das Ausbleiben der Zuckermodifikation darstellen.

3.7 Amino- und carboxyterminale Trunkationen bei hClC-1

Sowohl der zytoplasmatische Amino- als auch der Carboxyterminus sind bei den Mitgliedern der CLC-Familie in der Sequenz nur schwach konserviert und in ihrer Länge sehr unterschiedlich. So variiert der N-Terminus zwischen ~110 Aminosäuren bei ClC-1 und nur 50-60 bei ClC-0 oder ClC-5. Außer bei ClC-2, wo der N-Terminus eine Inaktivierungsregion beinhaltet, konnte diesem Abschnitt bislang keine Funktion zugeordnet werden.

Es sollte darum untersucht werden, ob eine Trunkation des Aminoterminus die Kanalfunktion von hClC-1 beeinträchtigt. Zu diesem Zweck wurden im Konstrukt ΔN_{109} die 107 Aminosäuren von Gln3 bis einschließlich Val109 durch rekombinante PCR deletiert. Dabei verbleiben noch etwa 10 Aminosäuren vor der ersten Transmembrandomäne D1, darunter drei positiv geladene, was unter Umständen wichtig für die korrekte Topologie der Signalankersequenz ist („positive-inside“-Regel; von Heijne, 1989).

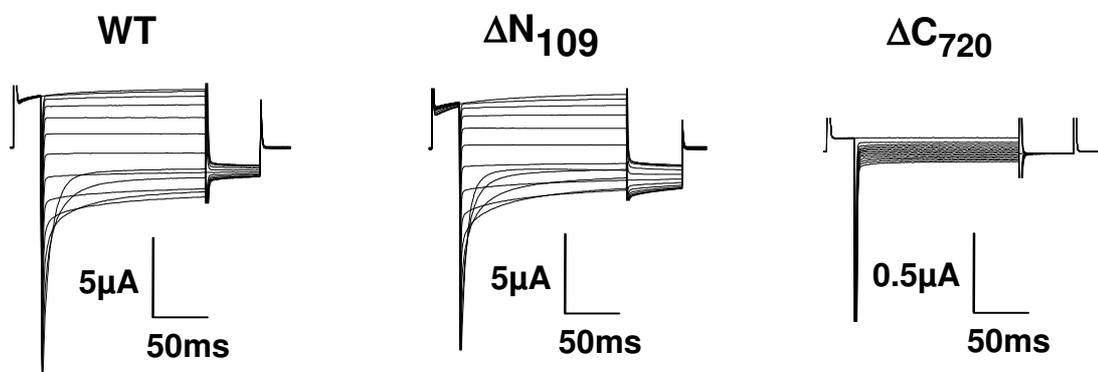


Abb. 44 Vergleich der Ströme von hClC-1 Wildtyp, der N-terminal verkürzten Variante ΔN_{109} und der C-terminal verkürzten Variante ΔC_{720} . Die Messung erfolgte mit dem Standard-Pulsprotokoll an *Xenopus*-Oozyten.

Anschließende Expression der cRNA in *Xenopus*-Oozyten ergab Ströme, die sich weder in ihrer Kinetik noch in der Amplitude von den Wildtypströmen unterschieden. Dies belegt, daß der Aminoterminus keine für die Kanalfunktion wichtigen Elemente enthält und zumindest im *Xenopus*-Expressionssystem für die korrekte Proteinprozessierung und den Transport zur Zellmembran entbehrlich ist.

Der zytoplasmatische Carboxyterminus beinhaltet die hydrophobe Domäne D13. Die C-terminal davon gelegene Myotoniemutation R894X (Meyer-Kleine *et al.*, 1995), bei der die letzten 95 Aminosäuren fehlen, ergibt in der Oocyte zwar kleinere aber qualitativ unveränderte Ströme. Eine Trunkation, die auch D13 einschließt, wie das Konstrukt ΔN_{720} , führt hingegen zum völligen Verlust der Kanalfunktion, hier befinden sich demnach unverzichtbare Sequenzabschnitte.

3.8 Rekonstitution des Kanals durch Koexpression von Fragmenten

3.8.1 Trennung von membrangebundenen und zytoplasmatischen Teilen

In weiteren Experimenten mit C-terminal trunziertem hClC-1-Protein zeigte sich, daß der durch die Deletion hervorgerufene Funktionsverlust kompensiert werden kann, wenn man gleichzeitig den fehlenden Abschnitt als separates Polypeptid exprimiert. Hierzu wurden zwei entsprechende cRNAs in die *Xenopus*-Oozyten koinjiziert. In diesen Versuchen wurden unterschiedliche Trunktionspositionen getestet. Dabei gelang die Wiederherstellung der Kanalaktivität zwar mit dem Konstruktpaar $\Delta C_{720}/\Delta N_{721}$, nicht aber mit der Variante $\Delta C_{597}/\Delta N_{598}$, obwohl in beiden Fällen die vollständige Anzahl an Aminosäuren vorhanden war. Auch die Kombination der Konstrukte $\Delta C_{720} + \Delta N_{598}$, die zur Duplikation eines Abschnitts führte, ergab Wildtypströme.

Der offenbar wichtige Bereich der Aminosäuren 598-720 beinhaltet eine Region, die erst kürzlich von zwei unabhängigen Gruppen bei Datenbankrecherchen als Sekundärstruktur-Motiv identifiziert wurde (Bateman, 1997; Ponting, 1997). Diese sogenannte CBS-Domäne ist nach ihrem Vorkommen in der Cystathionin- β -Synthase benannt. Anhand der Kristallstruktur der Inosin-5'-Monophosphatdehydrogenase, die ebenfalls eine CBS-Domäne enthält, konnte gezeigt werden, daß sie aus der Abfolge $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ (mit α = Helix und β = Faltblatt) besteht.

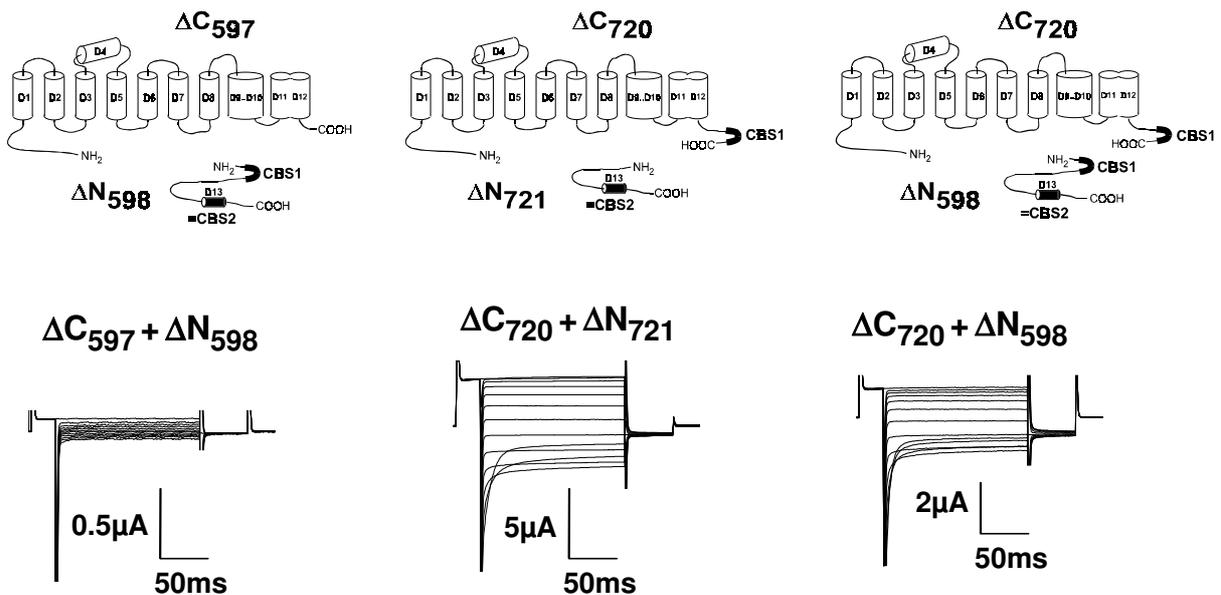


Abb. 45 Messung von Wildtyp-Strömen nach separater Expression des membranständigen Teils von hClC-1 und des Carboxyterminus durch Koinjektion zweier cRNAs. Oben: Schematische Darstellung der Konstrukte. Unten: Dazugehörige Stromspuren aus repräsentativen Messungen.

Bei allen eukaryontischen CLC-Kanälen kommt die CBS-Domäne zweimal vor. CBS1 liegt zwischen D12 und D13, während CBS2 praktisch vollständig der hydrophoben Domäne D13 entspricht. Bei den Koexpressionsversuchen waren nur diejenigen Fragmentkombinationen erfolgreich, bei denen sowohl der membranständige als auch der zytoplasmatische Partner über eine CBS-Domäne verfügten. Es liegt die Vermutung nahe, daß es bei der Interaktion der Kanalfragmente zu einer CBS-vermittelten Wechselwirkung kommt. Dabei scheint eine

Duplikation von CBS1 keine Behinderung zu sein, die Ströme der Kombination $\Delta C_{720} + \Delta N_{598}$ sind nur wenig kleiner als bei $\Delta C_{720} + \Delta N_{720}$.

Die Ströme nach Koexpression von $\Delta C_{720} + \Delta N_{721}$ waren in ihrer Amplitude praktisch genauso groß wie gleichzeitig injizierte Kontrollen von Wildtyp-hCIC-1 (ohne Abbildung), wobei die Mengen an eingesetzter WT- bzw. ΔC_{720} -cRNA gleich waren, und ΔN_{721} -cRNA in nur dreifachem molaren Überschuß vorlag. Dies ist erstaunlich, wenn man bedenkt, daß sich die Kanalteile erst finden und assoziieren müssen. Zudem kann sich das lösliche Fragment theoretisch im Zytoplasma verteilen, was die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens reduzieren würde. Andererseits wäre es möglich, daß es zu einem gesteuerten oder zumindest erleichterten Assoziationsprozeß kommt. Weitere Versuche hierzu werden in Abschnitt 3.9 beschrieben.

3.8.2 Trennung zwischen Transmembranabschnitten

Zunächst sollte untersucht werden, ob derartige Komplementationen auch möglich sind, wenn die „Schnittstelle“ zwischen Transmembranomänen plaziert wird. Dafür wurden eine Reihe weiterer N- und C-terminaler Trunkationen erzeugt (Abbildung 46).

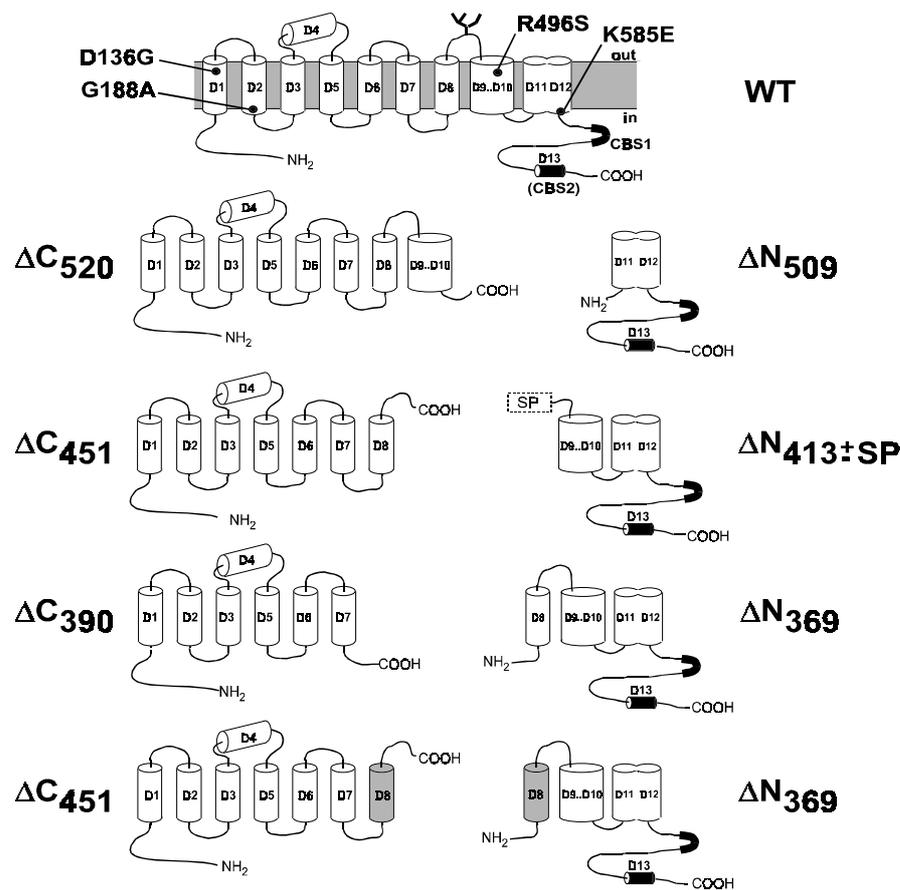


Abb. 46 Schematische Darstellung der Topologie von hCIC-1 Wildtyp (WT) und der im Bereich von Transmembranomänen trunkierten Varianten. Auf gleicher Höhe eingezeichnete Konstrukte wurden koexprimiert. Zusätzlich eingefügte „diagnostische“ Mutationen sind beim WT angegeben. Die hydrophobe Domäne D8 ist grau gezeichnet, um ihre Duplikation hervorzuheben.

Zahlreiche hydrophile Verbindungsstücke sind sehr kurz und zwischen CLC-0, -1 und -2 stark konserviert, v.a. D2-D3, D5-D6 und D6-D7. Dies legt eine wichtige Funktion nahe, wie auch Myotonie-auslösende Mutationen in diesen Bereichen belegen (Ludewig *et al.*, 1996; Pusch *et al.*, 1995). Weniger problematisch waren daher „Schnitte“ in den wenig konservierten Bereichen D7-D8 und D8-D9. Weiterhin erschien es sinnvoll, nicht zu dicht an Transmembrandomänen zu trunkieren, da flankierende Sequenzen u.U. essentiell für die Integration sein können. Aus diesem Grunde wurde ein leichtes Überlappen im Bereich der hydrophilen Verbindungsstücke in Kauf genommen. Wegen der erforderlichen extrazellulären Lage des Aminoterminus von ΔN_{413+SP} war N-terminal an dieses Konstrukt das Signalpeptid der α -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors fusioniert worden. Während der Proteinsynthese in den Oozyten sollte dadurch eine korrekte Positionierung erfolgen.

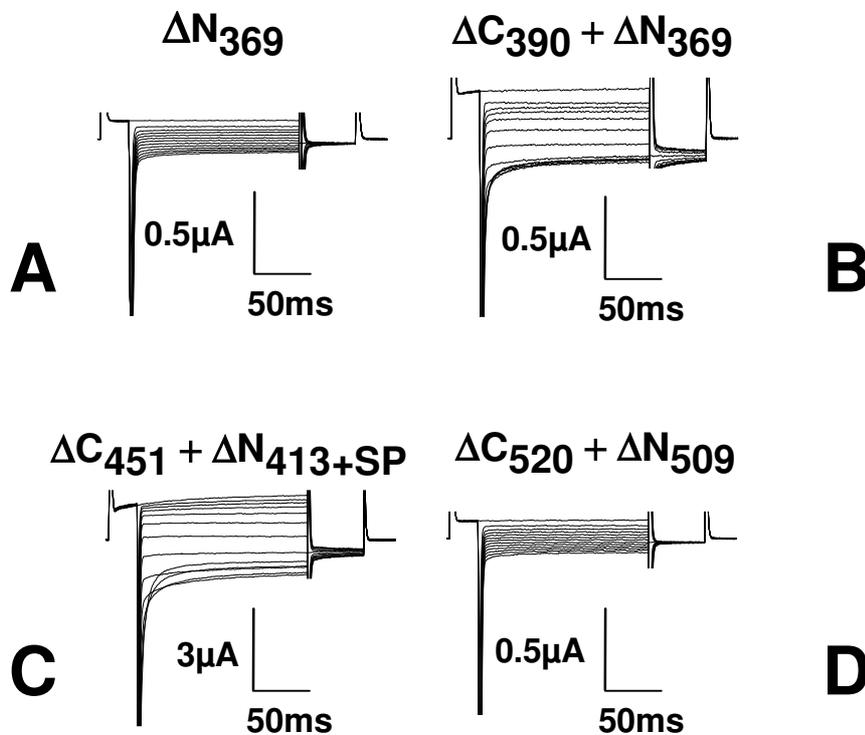


Abb. 47 Komplementation durch Koexpression von Kanalfragmenten, die zwischen den Membrandomänen trunkiert wurden. Die Messungen erfolgten mit dem Standard-Pulsprotokoll. Ströme nach Einzelexpressionen unterschieden sich nicht signifikant von Wasser-injizierten Oozyten wie in **A** exemplarisch für das Konstrukt ΔN_{369} gezeigt. In Grafik **B** ist die Trennstelle zwischen D7 und D8 und bei **C** im extrazellulären Segment D8-D9. Hierbei wurde Konstrukt ΔN_{369+SP} zusätzlich mit einem Signalpeptid fusioniert, um den N-Terminus korrekt in den Extrazellulärraum zu lokalisieren. Platzierung der Trennstelle zwischen D10 und D11 in **D** ergab keine Ströme. Man beachte die unterschiedlichen Skalen für die Stromstärke.

Expression der einzelnen trunkierten Kanalfragmente in *Xenopus*-Oozyten ergab keine Chloridströme, wie in Abbildung 47 exemplarisch für ΔN_{369} gezeigt. Auch wenn die Grenze zwischen den Kanalteilen in den Abschnitt D10-D11 gelegt wurde ($\Delta C_{520+} \Delta N_{509}$), konnten keine signifikanten Ströme gemessen werden. Jedoch war es möglich, sowohl im intrazel-

lulären Verbindungsstück D7-D8 als auch im extrazellulären Segment D8-D9 zu trennen. Die Ströme für die erste Kombination, $\Delta C_{390+} \Delta N_{369}$ waren relativ klein, aber in ihrer Kinetik und Ionenselektivität (hier nicht gezeigt) typisch für hCIC-1. Da hier eine Duplikation der Aminosäuren 369-390 vorlag, unter ihnen viele positiv geladene, ist es möglich, daß abstoßende Kräfte eine effektivere Assoziation verhindert haben. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß das Expressionsniveau einer oder beider Komponenten bereits reduziert war. Die zweite Kombination, $\Delta C_{451+} \Delta N_{413+SP}$, produzierte Ströme, die rund 20% der Wildtypkontrollen entsprachen, ein Anzeichen für offenbar effektive Assoziation.

Einige Punktmutationen in hCIC-1 verändern dessen Kinetik und Spannungsabhängigkeit in charakteristischer Weise. Es sollte nun überprüft werden, ob diese Effekte sich auch in Kanälen reproduzieren lassen, die aus zwei nicht-kovalent verbundenen Hälften bestehen. Die Mutation G188A in D2 verschiebt die Öffnung des Kanals zu positiveren Spannungen und erzeugt auswärtsrektifizierende Gleichgewichtsströme (M. Pusch und T. J. Jentsch, unpublizierte Beobachtung). Dieser Phänotyp blieb erhalten, als die Mutation in ΔC_{451} eingebaut und zusammen mit ΔN_{413+SP} in Oozyten exprimiert wurde. Der Austausch D136G in D1 (Fahlke *et al.*, 1995) führt zu starker Einwärtsgleichrichtung und die Ströme aktivieren langsam bei Potentialen negativer als -60mV. In diesem Falle gelang es jedoch nicht $\Delta C_{451}D136G$ mit ΔN_{413+SP} zu komplementieren (Abb. 48, Mitte unten).

In CIC-0 führt auch der Austausch des Aspartats zum ebenfalls negativ geladenen Glutamat zu einem gleichartigen Phänotyp (Ludewig *et al.*, 1997). Offenbar ist nicht nur die Ladung als solche, sondern auch die Länge der Seitenkette wichtig. Dies könnte z.B. auf eine Ionenbrücke hinweisen, die D136 mit einer basischen Aminosäure eingeht.

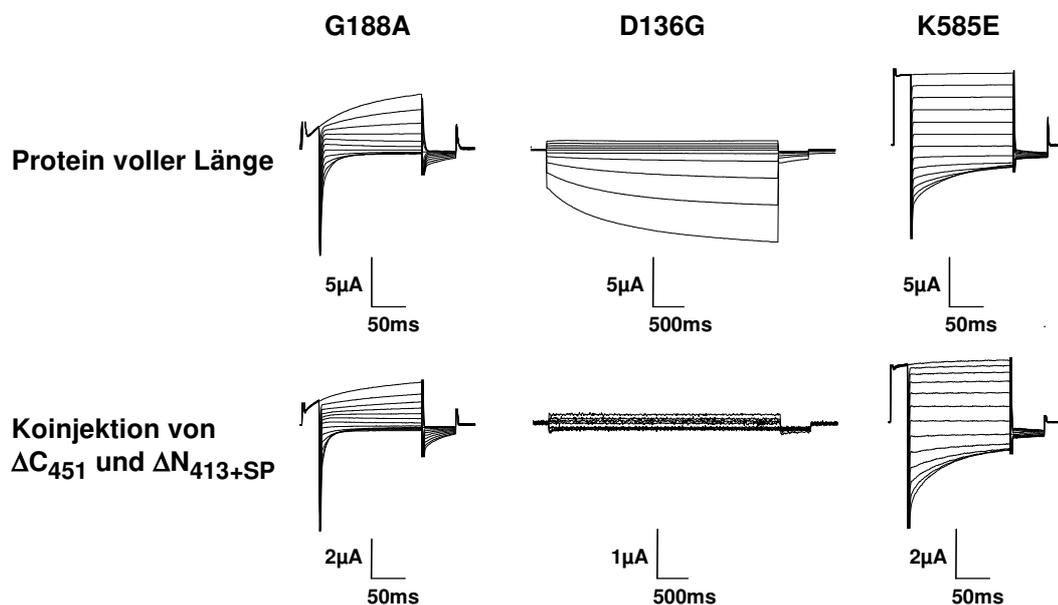


Abb. 48 Effekte von Punktmutationen auf hCIC-1-Ströme. Vergleich von charakteristischen Mutationen im Protein voller Länge (oben) und in koexprimierten „halben“ Kanälen (unten). Ein spezielles Pulsprotokoll wurde für die Mutante D136G verwendet: Vom Ruhemembranpotential aus wurden für 4s Testspannungen von +20mV bis -160mV (in Schritten von -20mV) angelegt. Abschließend erfolgte ein konstanter Testpuls von -85mV. Die Stromkurven sind repräsentative Beispiele von $n \geq 6$ Oozyten aus mindestens zwei unterschiedlichen *Xenopus*-Präparationen.

Ersetzt man Lysin 585 am Ende von D12 durch Glutamat, so entstehen Ströme, die bei negativen Potentialen langsamer inaktivieren. Zudem sind die Auswärtsströme größer als

beim Wildtyp. Die veränderte Inaktivierungskinetik der Mutante K585E bleibt bei Expression in „halben“ Kanälen erhalten, weniger jedoch die Auswärtsrektifizierung. Das Funktionieren von hCIC-1 setzt also keine kovalente Bindung im Bereich der Abschnitte D7-D8 und D8-D9 voraus, auch bestimmte phänotypische Änderungen am Kanal, hervorgerufen durch Aminosäureaustausche, bleiben erhalten.

Fragmentierungen des Kanals waren sowohl zwischen D8 und D9 als auch zwischen CBS1 und CBS2 erfolgreich, so daß der Abschnitt D8 bis D12 offensichtlich als selbständige strukturelle Einheit fungieren konnte. Daher sollte es auch möglich sein, hCIC-1 aus drei Teilen zu rekonstituieren. Tatsächlich ergaben sich Wildtypströme, wenn ΔC_{451} , $\Delta N_{413+SP}\Delta C_{720}$ und ΔN_{721} gemeinsam in Oozyten exprimiert wurden. Die Ströme waren kleiner als bei der Zweifach-Kombination $\Delta C_{451} + \Delta N_{413+SP}$, vermutlich wegen der abnehmenden Effizienz der Zusammenlagerung, aber immer noch wesentlich größer als bei $\Delta C_{390} + \Delta N_{369}$.

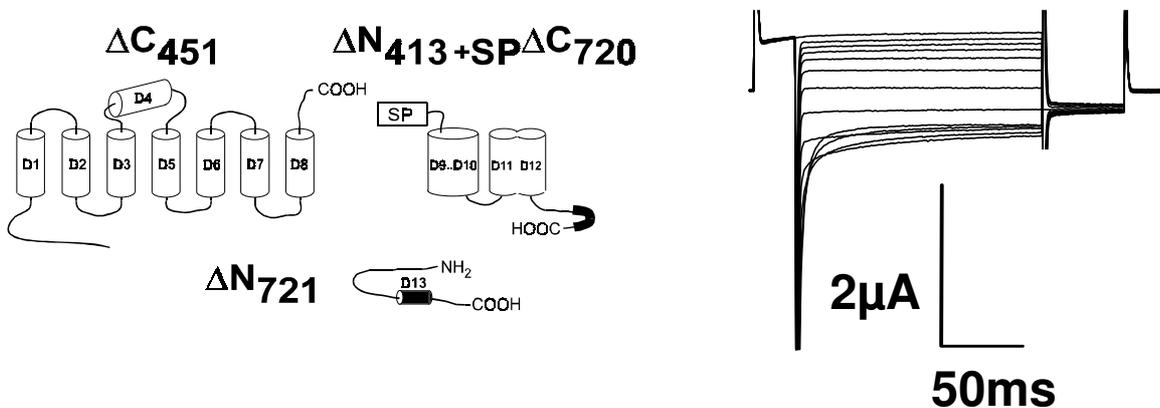


Abb. 49 Trimodulare Expression von hCIC-1 durch Koinjektion von drei cRNAs. Die Trennstellen entsprechen denen, die bereits für Doppelinjektionen verwendet wurden. Die Stromspuren sind repräsentativ für $n > 6$ Oozyten.

3.8.3 Der hydrophobe Block D9-D10 kann sich auch ohne Signalpeptid korrekt in die Membran einbauen

Bei einer Variante, ΔN_{413} , die eigentlich als Negativkontrolle gedacht war, fehlte gegenüber ΔN_{413+SP} das Signalpeptid. Dem lag die Überlegung zugrunde, daß so keine korrekte Topologie für diese Kanalhälfte, und dadurch auch keine funktionelle Komplementation, möglich sein sollte. Bei Koexpression mit ΔC_{451} resultierten dennoch Ströme, die knapp 10% der Wildtypströme ausmachten (Abb. 50). Offenbar ist es möglich, die Domänen D9 bis D12 in korrekter Orientierung in die Membran einzubauen, ohne daß das aminoterminal Ende sich zuvor im ER-Lumen befindet. Welche Schlüsse bezüglich der Struktur und der Proteinbiosynthese dieses hydrophoben Blocks daraus zu ziehen sind, soll in der Diskussion erörtert werden.

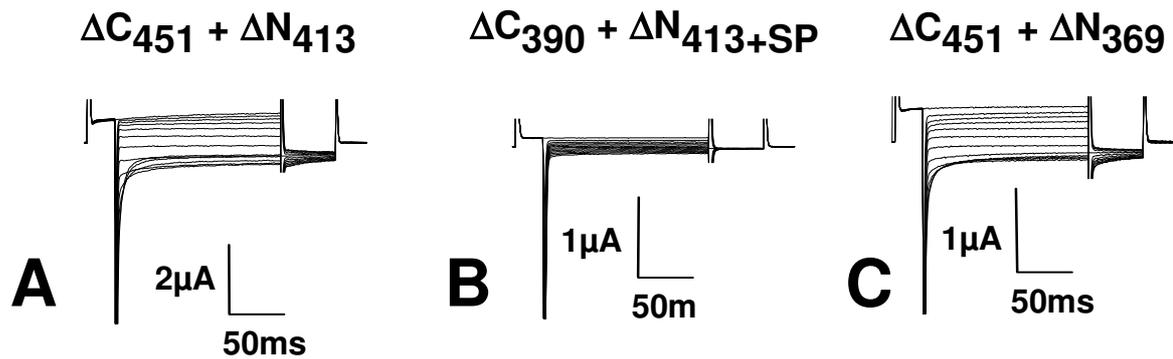


Abb. 50 A: Koexpression von ΔC_{451} mit dem carboxyterminalen „halben“ Kanal ΔC_{413} ohne vorausgehendes Signalpeptid. B: Koexpression von Fragmenten ohne D8. C: Duplikation von D8.

3.8.4 Domäne D8 ist essentiell, ihre Duplikation wird aber toleriert

Die Kanalhälften aus 3.8.2 können auch derart kombiniert werden, daß dabei die Domäne D8 entweder fehlt oder doppelt vorkommt. Dabei zeigte sich, daß bei Abwesenheit von D8 keine Ströme meßbar waren (Abb. 50B). Hingegen führte eine zusätzliche Kopie von D8 weder zu Funktionsverlust noch zu auffälligen Änderungen im Phänotyp (Abb. 50C). Die Ströme waren dabei auch nicht kleiner als bei der Fragmentkombination $\Delta C_{390} + \Delta N_{369}$, bei der keine Duplikation einer Transmembranhelix vorliegt. Offenbar kann eine der beiden Domänen bei der Assoziation aus dem Ensemble der Membrandomänen ausgeschlossen werden.

3.8.5 Carboxyterminale Kanalhälften können die homologen Regionen im Protein voller Länge nicht verdrängen

Wenn im Bereich der Transmembrandomänen von hCIC-1 genügend Flexibilität vorhanden war, ein dupliziertes hydrophobes Segment D8 zu tolerieren, so konnte es eventuell auch möglich sein, den gesamten Abschnitt D9-D12 durch einen „halben“ Kanal kompetitiv zu verdrängen.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Mutante von hCIC-1, die durch den Austausch R496S in D10 keine Ströme mehr passieren läßt, mit den Konstrukten ΔN_{369} bzw. ΔN_{413+SP} koexprimiert. Diese besaßen an der betreffenden Stelle die Wildtypsequenz. Wenn also in einer ausreichenden Anzahl von Molekülen ein „Halb-Kanal“ die mutierten Bereiche des „volle-Länge“-Kanals verdrängen könnte, so sollten Ströme meßbar sein. Auch bei Koinjektion eines zwei- bis sechsfachen Überschusses von cRNA des „halben“ Kanals gab es keine derartige Komplementation. Auch Koexpression von nichtmutiertem ΔC_{520} mit ΔN_{413+SP} , wobei die Domänen D10 bis D12 dupliziert wurden, ergab keine Ströme (ohne Abbildung).

Die folgende Tabelle zeigt noch einmal zur Übersicht alle in den Koexpressionsversuchen gemessenen Leitfähigkeiten. Die Ergebnisse resultieren jeweils aus $n \geq 6$ Messungen und sind als Mittelwerte \pm SE in MikroSiemens angegeben (Leitfähigkeit bei -20mV). Werte für Einzelinjektionen trunkierter Kanäle außer ΔC_{720} und ΔN_{721} sind nicht aufgelistet, lagen aber in der gleichen Größenordnung. Leckströme wurden nicht subtrahiert, es sind aber Wasser-injizierte Kontroll-Oozyten zum Vergleich angegeben.

Konstrukt	Leitfähigkeit [μ S]	Konstrukt	Leitfähigkeit [μ S]	Konstrukt	Leitfähigkeit [μ S]
Wasser-injiziert	1.7 ± 0.2	$\Delta C_{720} + \Delta N_{721}$	63.2 ± 9.4	$\Delta C_{390} + \Delta N_{369}$	$3.1 \pm 0.2^{*)}$
WT	78.2 ± 9.4	$\Delta C_{597} + \Delta N_{598}$	1.6 ± 0.2	$\Delta C_{390} + \Delta N_{413+SP}$	1.5 ± 0.3
ΔN_{109}	73.9 ± 8.6	$\Delta C_{720} + \Delta N_{598}$	40.3 ± 5.2	$\Delta C_{451} + \Delta N_{369}$	$5.0 \pm 0.8^{*)}$
ΔC_{720}	1.2 ± 0.2	$\Delta C_{520} + \Delta N_{509}$	1.1 ± 0.1	R496S + ΔN_{413+SP}	2.2 ± 0.2
ΔN_{721}	2.2 ± 0.8	$\Delta C_{451} + \Delta N_{413}$	$5.9 \pm 1.2^{*)}$	$\Delta C_{451} + \Delta N_{721}$	10.2 ± 0.9
		$\Delta C_{451} + \Delta N_{413+SP}$	19.2 ± 1.1	+ $\Delta N_{413+SP} \Delta C_{720}$	

*) Trotz geringer Absolutwerte konnten diese Ströme anhand ihrer charakteristischen Kinetik als typisch für hCIC-1 identifiziert werden.

3.9 Membranaffinität des Carboxyterminus

3.9.1 Proteinchemische Untersuchung

In den Koexpressionsversuchen mit separatem Carboxyterminus fällt auf, daß die Stromstärke des Konstrukt-paares $\Delta C_{720} + \Delta N_{721}$ fast genauso groß war wie bei Wildtypkanälen (siehe obige Tabelle). Die effektive Assoziation zwischen dem membranständigen Protein, das am ER synthetisiert wird, und seinem zytoplasmatischen Partner, dessen Translation an freien Ribosomen stattfindet, könnte auf einer spezifischen Wechselwirkung des C-Terminus mit Membranen, sei es ER oder Plasmamembran, beruhen.

Diese Hypothese wurde getestet, indem das zytoplasmatische Fragment ΔN_{721} allein oder zusammen mit ΔC_{720} in *Xenopus*-Oozyten und in HEK293- sowie COS-7 Zellen exprimiert wurde. Anschließend wurden Membranpräparationen durchgeführt und diese mit alkalischem Carbonatpuffer (NaCO_3 , pH 11.8) behandelt. Durch diese Prozedur werden alle nicht-integralen Membranproteine, sowie alle luminalen Proteine aus dem ER und anderen Vesikeln extrahiert (Fujiki *et al.*, 1982; Howell und Palade, 1982). Nach anschließender hochtouriger Zentrifugation sollten sich nur membranassoziierte Proteine im Pellet finden. Als rein zytoplasmatische Kontrollproteine wurden „Grün-Fluoreszierendes-Protein“ (GFP) und β -Galaktosidase in den gleichen Zellen exprimiert und entsprechend behandelt. Als Positivkontrolle diente der hCIC-1 Wildtyp.

Abbildung 51A zeigt zunächst die Ergebnisse nach Expression in Oozyten. Der Kanal voller Länge fand sich gleichermaßen im Totalhomogenisat und in den Membranen, wie es für ein integrales Protein zu erwarten war. Aber auch die carboxyterminalen Abschnitte mit zwei

(ΔN_{598}) sowie mit nur einer CBS-Domäne (ΔN_{721}) blieben nach Carbonatextraktion mit den Membranen assoziiert. Dabei spielte es keine Rolle, ob gleichzeitig die membranintegrierten Abschnitte (ΔC_{597} und ΔC_{720}) anwesend waren. Die Kontrollen (GFP und β -Gal) in Abbildung 51B belegen, daß zytosolische Proteine durch Behandlung mit NaCO_3 -Puffer effektiv entfernt wurden.

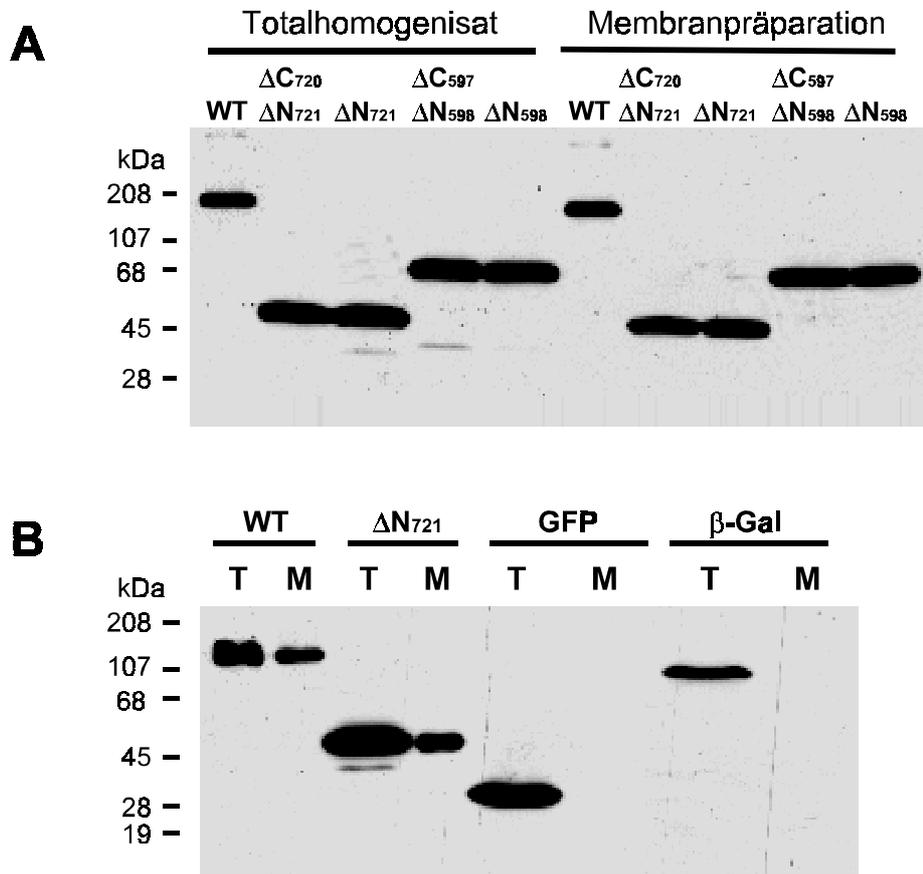


Abb. 51 Westernblots von Oozyten-Totalhomogenisaten (T) und Carbonatpuffer-extrahierten Membranpräparationen (M). Die Proben wurden nach Reduktion in Auftragspuffer auf 5-20%igen SDS-PAA-Gelen getrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels spezifischer Antikörper detektiert. Im Falle von hCIC-1 WT und ΔN_{nm} -Konstrukten war dies ein Antiserum gegen den äußersten C-Terminus. **A:** Expression von C-terminalen Fragmenten allein oder mit dem entsprechenden komplementierenden Fragment. **B:** Gegenüberstellung von ΔN_{721} mit Positiv- und Negativkontrollen.

Als nächstes wurde überprüft, ob sich dieser Effekt in Säugerzellen reproduzieren läßt, oder ein Artefakt des *Xenopus*-Oozyten Expressionssystems darstellt. Zum einen wurden hierfür HEK-Zellen verwendet, in denen hCIC-1 bereits mittels der „Patch-Clamp“-Methode elektrophysiologisch charakterisiert worden war. Da sich diese Zellen aber wegen mangelhafter Adhärenz an Objektträgern aus Glas schlecht für Immunfluoreszenz-Untersuchungen eignen, wurden auch COS-7-Zellen verwendet.

Auch hier findet man, daß die C-terminalen Fragmente - sowohl mit einer als auch mit zwei CBS-Domänen - der Carbonatextraktion widerstehen und es dabei keine Rolle spielt, ob gleichzeitig die Region der Transmembrandomänen anwesend ist. Hingegen wird auch bei Säugerzellen das zytoplasmatische GFP komplett entfernt.

In Abbildung 52 zeigt sich zudem ein Phänomen, daß teilweise auch bei Oozytenmembran-Präparationen auftrat (nicht in Abb. 51). Zusätzlich zu den Proteinbanden mit erwartetem Molekulargewicht findet man auf den Blots carbonatbehandelter Membranen eine weitere mit etwa doppelter Größe. Solche SDS/Mercaptoethanol-resistenten Dimerisierungen findet man manchmal auch bei CLC-2 (S. E. Jordt, persönl. Mitteilung). Bei der regulatorischen RI α -Untereinheit der Proteinkinase A bilden sich ebenfalls Dimere, die gegen Reduktion und Detergenz stabil sind (Léon *et al.*, 1997). Trotz der Zerstörung einer beteiligten Cysteinbrücke durch Aminosäureaustausch (C37H) blieben Dimerbanden im Proteingel sichtbar.

Für die CLC-Kanäle liegen bislang noch keine systematischen Studien vor. Es ist aber naheliegend, daß der Zutritt von Luftsauerstoff im vorliegenden Fall eine Rolle spielt, denn die Homogenisate für Membranpräparationen (M) wurden mehrfach kräftig durch enge Spritzenkanülen gepreßt, wobei es zu leichtem Schäumen kam. Hingegen wurden die Totalhomogenisate (T) weniger drastisch mittels gelber Eppendorf-Pipettenspitzen hergestellt.

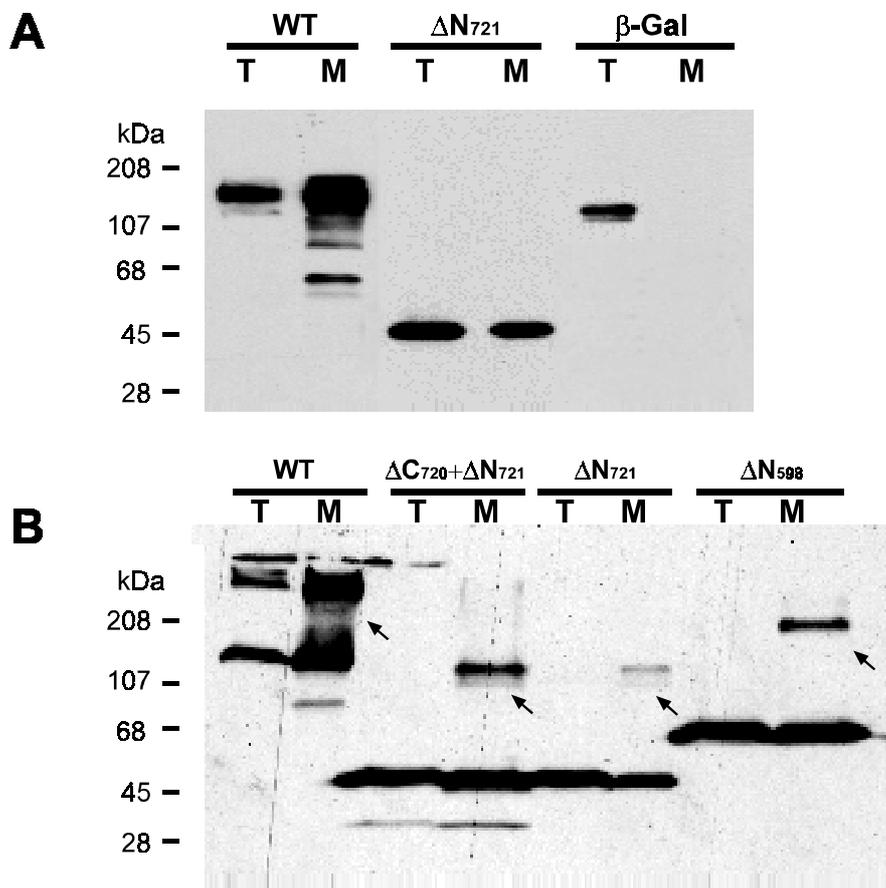


Abb. 52 Westernblots von Totalhomogenisaten (T) und Carbonatpuffer-extrahierten Membranpräparationen (M) aus COS-7 (A) und HEK293-Zellen (B). Die Proben wurden nach Reduktion in Auftragspuffer auf 5-20%igen SDS-PAA-Gelen getrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels spezifischer Antikörper detektiert. Pfeile weisen auf „Dimer-Banden“, die das doppelte Molekulargewicht des erwarteten Fragments besitzen und vorzugsweise nach Carbonatextraktionen auftraten.

3.9.2 Immunzytochemische Lokalisation

Mit Hilfe der proteinchemischen Methoden der Membranisolierung und des Westernblots war eine ungewöhnliche „Membranaffinität“ des C-Terminus nachgewiesen worden. Nun sollte die zelluläre *in vivo*-Verteilung der unter 3.9.1 untersuchten Proteine (hCIC-1, Fragment ΔN_{721} , GFP und β -Galaktosidase) analysiert werden. Insbesondere interessierte die Frage, ob sich ΔN_{721} selektiv an Membran-begrenzten Kompartimenten anlagert, oder doch eher eine allgemeine zytoplasmatische Verteilung besitzt.

Hierzu wurden die gleichen transfizierten COS-7-Zellen, die auch schon für die Westernblots verwendet wurden, auf Objektträgern ausgesät, und nach Formaldehydfixierung mit proteinspezifischen Antikörpern inkubiert. Nach anschließender Zugabe von markierten Sekundärantikörpern konnte deren Fluoreszenz mittels konfokalem Lasermikroskop ausgewertet werden. Die folgende Abbildung zeigt für jedes Protein drei repräsentative Zellbeispiele.

Bei der Aufnahme der Bilder wurden vier unterschiedliche Fokussierungsebenen pro Zelle ausgewählt, von denen in Abb. 53 jeweils eine gezeigt wird. Eine Summation über mehrere Ebenen wurde zwar durchgeführt, ergab aber nur größere Unschärfe und keine zusätzlichen Informationen.

Zellen, die mit hCIC-1 WT transfiziert waren, zeigten in vielen Fällen eine starke perinukleäre Färbung und davon ausgehende Verzweigungen. Obwohl hCIC-1 ein Plasmamembrankanale ist, findet man bei Überexpression - wie in diesem Fall - den größten Teil des Proteins intrazellulär. Diese zytoplasmatischen „Netze“ könnten von ER-Ausläufern gebildet werden, oder auch durch Bindung des Kanals an Teile des Zytoskeletts entstehen. Für eine genauere Bestimmung müßten Doppelmarkierungen vorgenommen werden, bei denen zusätzlich Markerproteine der genannten Strukturen angefärbt werden.

Für die vorliegende Arbeit ist aber zunächst ausreichend, die Verteilung des Wildtyps von hCIC-1 mit den zytoplasmatischen Kontrollproteinen GFP und β -Galaktosidase zu vergleichen. Diese ergaben eine mehr homogene Anfärbung der Zelle, mit zahlreichen Aussparungen, die kleinlumigen Vesikeln entsprechen. Intensive Markierungen an der Peripherie sind wahrscheinlich auf ein „Umklappen“ der losen Zellränder zurückzuführen, so daß dort doppelte Cytoplasmassichten vorliegen.

Das mikroskopische Bild von solchen Zellen, die mit dem carboxyterminalen Fragment von hCIC-1 (ΔN_{721}) transfiziert wurden, ähnelt stärker der GFP- und β -Galaktosidase-Expression. In keiner der durchmusterten Zellen ($n > 100$) war eine vergleichbare netzartige Struktur zu beobachten gewesen wie bei hCIC-1 WT.

Sehr aufschlußreich wäre in diesem Zusammenhang die zelluläre Verteilung des kompletären, membranständigen Kanalfragmentes ΔC_{720} . Leider existiert bislang kein Antikörper gegen den Aminoterminus von hCIC-1 und ein dort eingefügtes künstliches FLAG-Epitop führte zu unbefriedigenden Resultaten. Daher ist bislang unbekannt, ob ΔC_{720} auch allein solche netzartigen Strukturen annimmt, oder ob dazu die komplette Aminosäuresequenz erforderlich ist.

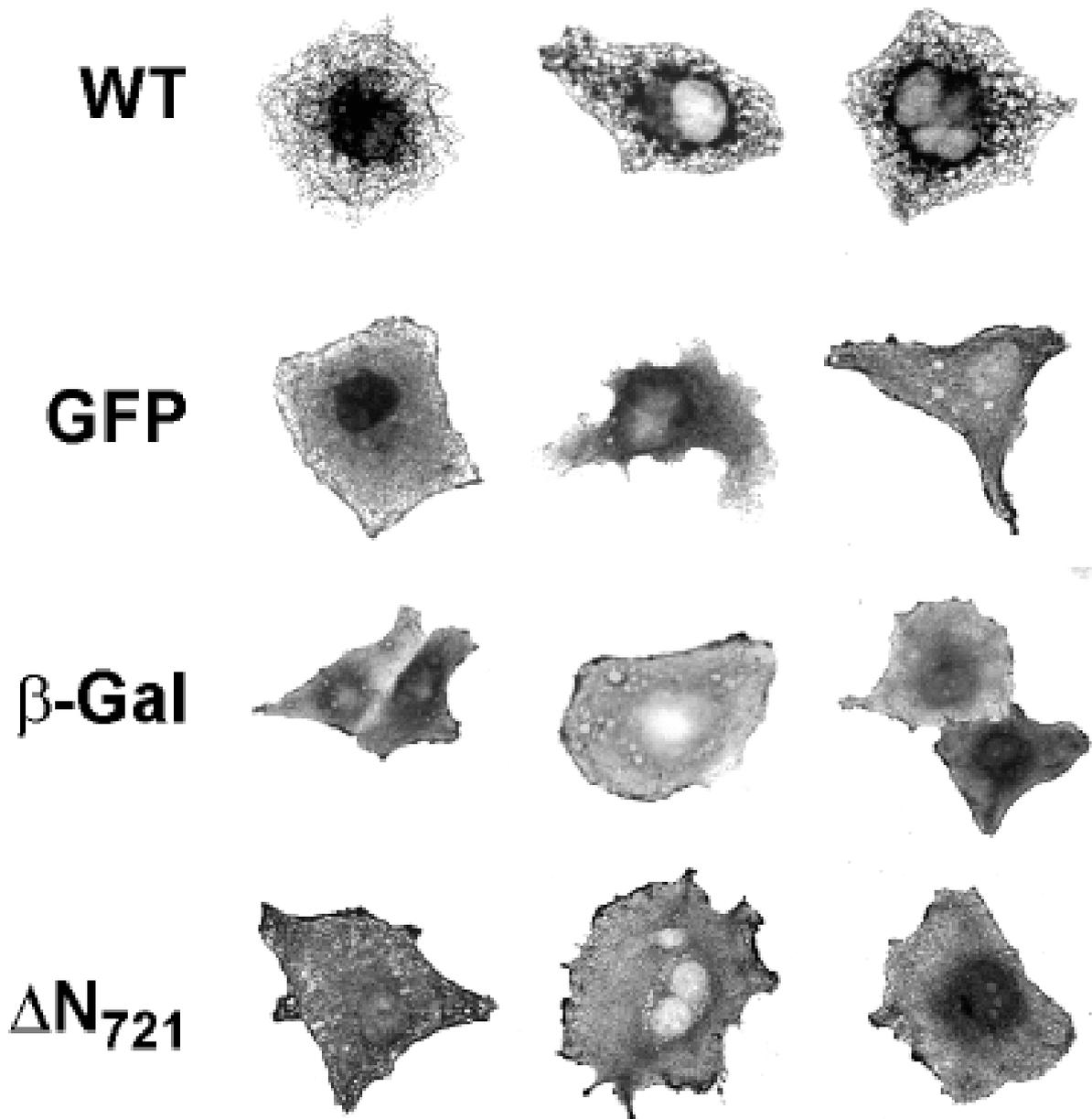


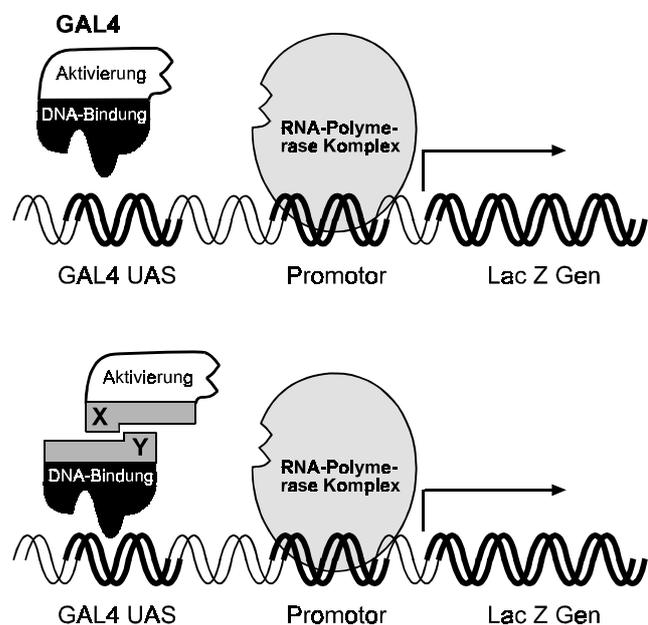
Abb. 53 Immunzytochemische Lokalisation von hCIC-1 WT (A), ΔN_{721} (B), GFP (C) und Galaktosidase (D) in transfizierten COS-7 Zellen. Zur Detektion von hCIC-1 WT und ΔN_{721} wurde das gleiche Antiserum wie bei den Westernblots verwendet. Als Sekundärantikörper diente monoklonales anti-Kaninchen-IgG, welches mit dem Cyanin-Konjugat Cy3 markiert war. Es werden jeweils Aufnahmen von drei repräsentativen Zellen gezeigt.

3.10 Untersuchung der Interaktionen zwischen CBS-Domänen mit dem „Hefe-Zwei-Hybrid“-System

Bei der Koexpression von zytoplasmatischem Carboxyterminus und dem Abschnitt der Transmembrandomänen gelang die funktionelle Rekonstitution der Kanäle nur dann, wenn die Fragmentgrenze zwischen den CBS-Domänen lag. Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, daß der C-Terminus über eine Interaktion der CBS-Domänen untereinander an den Rest des Proteins gekoppelt ist.

Um eine potentielle Wechselwirkung zweier Proteine oder von Teilen eines Proteins zu testen, gibt es zahlreiche *in vitro*-Techniken, wie Koimmunpräzipitation oder Affinitätschromatographie. Diese haben z.T. den Nachteil, daß zunächst ausreichende Mengen der Proteine aufgereinigt werden müssen. Dabei besteht die Gefahr, daß ihre Tertiärstruktur verloren geht. Auch entsprechen die experimentellen Bedingungen, unter denen die Wechselwirkung untersucht wird, in der Regel nicht dem intrazellulären Milieu, so daß einige Interaktionen nicht detektierbar sind. Von FIELDS *et al.* stammt eine Methode, die es erlaubt, Proteinwechselwirkungen *in vivo* zu testen (Fields und Song, 1989). Der Transkriptionsaktivator GAL4 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist für die Expression von Enzymen des Galaktosestoffwechsels notwendig. Er besteht aus zwei separaten Domänen, einer aminoterminalen DNA-Bindungsdomäne (BD) und einer carboxyterminalen sauren Domäne, die den RNA-Polymerasekomplex aktiviert. Die direkte kovalente Bindung zwischen diesen Domänen kann durch andere Proteinabschnitte ersetzt werden. Exprimiert man zwei Testproteine, X und Y, die miteinander nicht-kovalent interagieren, jeweils als Hybride mit AD und BD, so werden letztere durch die Wechselwirkung von X und Y zusammengebracht und der Transkriptionsaktivator ist funktionell.

Abb. 54 Prinzip des Zwei-Hybrid-Systems zum Testen von Protein-Interaktionen. Oben: Der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 mit DNA-Bindungsdomäne (BD, schwarz) und Aktivierungsdomäne (AD, weiß) als monomeres Protein. Unten: BD und AD als separate Fusionen mit Testproteinen (X und Y, dunkelgrau). Bei Interaktion von X und Y kommt es zur funktionellen Rekonstitution des Transkriptionsfaktors. GAL4 UAS steht für „GAL4 upstream activating sequence“ und bezeichnet die DNA-Erkennungssequenz für GAL4. Das LacZ-Gen kodiert für β -Galaktosidase, deren Aktivität als Reporter der GAL4-Aktion dient.



Als Indikatoren der GAL4-Aktivität dienen einerseits Reporterenzyme wie LacZ, die einen Farbttest ermöglichen. Andererseits erlauben induzierte Genprodukte, die einen Wachstumsdefekt der Hefe, z.B. Histidinabhängigkeit, komplementieren ein Wachstum auf Selektivmedien.

In der vorliegenden Arbeit wurde das MATCHMAKER™ System (Clontech, Palo Alto, CA USA) verwendet. Hier enthält der Vektor pACT2 die Sequenz für die Aktivierungsdomäne und trägt das *LEU2* Gen als Selektionsmarker, während pAS2-1 mit dem Marker *TRP2* die Sequenz für die DNA-Bindungsdomäne trägt.

Von CBS1 und CBS2 wurden Fusionskonstrukte sowohl mit der DNA-Bindungs- als auch mit der Aktivierungsdomäne hergestellt. Dabei wurden jeweils unterschiedliche flankierende Bereiche mit eingeschlossen, wie in Abbildung 55 schematisch gezeigt ist. Die sechs Varianten von CBS1 und CBS2 wurden sowohl in den Aktivierungsdomänen-Vektor pACT2 als auch in den DNA-Bindungsdomänen-Vektor pAS2-1 ligiert, so daß insgesamt 12 Plasmide mit 36 paarweisen Kombinationsmöglichkeiten vorlagen.

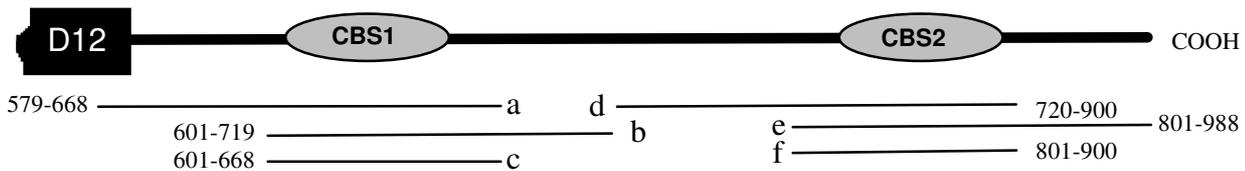


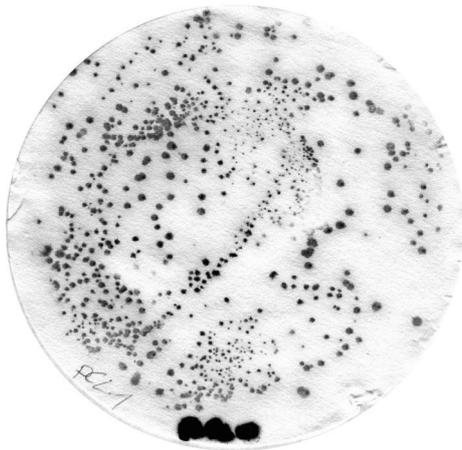
Abb. 55 Lage der CBS1- und CBS2-Fusionsanteile in Relation zur Sequenz von hCIC-1. Die letzte Transmembrandomäne, D12, ist als schwarzer Block dargestellt, die CBS-Domänen als graue Ovale. Dünne Linien symbolisieren die eingeschlossenen Bereiche, und Nummern bezeichnen die Position der ersten bzw. letzten Aminosäure, kleine Buchstaben dienen als Kurzbezeichnung der Konstrukte.

Zellen des *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes Y187 wurden mit jeweils zwei dieser Vektoren kotransformiert und auf -Leu/-Trp-Selektivmedien ausplattiert. Als Positivkontrolle diente zum einen der Vektor pCL, der die komplette GAL4-Sequenz beinhaltet, zum anderen die Vektorkombination pSE1111/pSE1112, die für bekanntermaßen interagierende Proteine kodieren (siehe Materialien). Als Negativkontrolle wurden alle CBS-Fusionskonstrukte einzeln transformiert, sowie in ausgewählten Kombinationen mit dem entsprechenden komplementären Vektor ohne CBS-Anteil.

Nach drei bis vier Tagen Wachstum waren die Kolonien auf einen Durchmesser von 1-2 mm herangewachsen und konnten auf β -Galaktosidaseaktivität getestet werden. Hierzu wurde ein Filterabklatsch hergestellt und die Zellen durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff aufgebrochen. Anschließende Inkubation des Filters auf einem X-Gal-haltigen Phosphatpuffer ergab nach etwa einer Stunde bei Raumtemperatur eine Blaufärbung bei der Positivkontrolle pCL. Die entsprechende Reaktion mit zweigeteiltem GAL4 (pSE1111/pSE1112) erfolgte erst nach etwa vier Stunden, bei zusätzlich reduzierter Farbtintensität.

Einzeln transformierte CBS-Domänen ergaben keine Induktion der β -Galaktosidase (ohne Abbildung), ebenso blieben solche Kolonien ohne Blaufärbung, die mit zwei CBS1-Konstrukten kotransformiert wurden. Jedoch erfolgte die Farbreaktion innerhalb von zwei bis vier Stunden bei solchen Kolonien, die entweder die Paarungen CBS1/CBS2 enthielten oder mit zwei CBS2-Konstrukten kotransformiert worden waren.

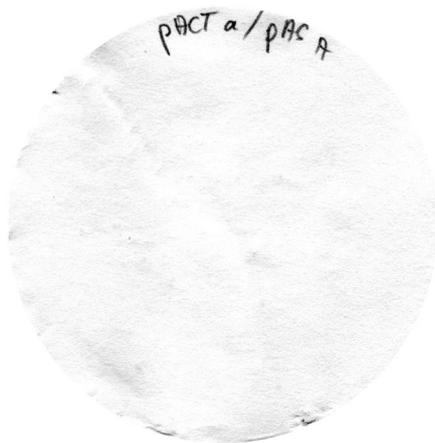
Auffällig war, daß Hefen mit den Kombinationen von pACT2 b mit pAS2-1 d-f deutlich langsamer wuchsen als andere Kotransformanden, so daß sie erst am 5. Inkubationstag getestet werden konnten. In der folgenden Abbildung sind einige Filter als repräsentative Beispiele für hetero- und homophile Interaktionen dargestellt.



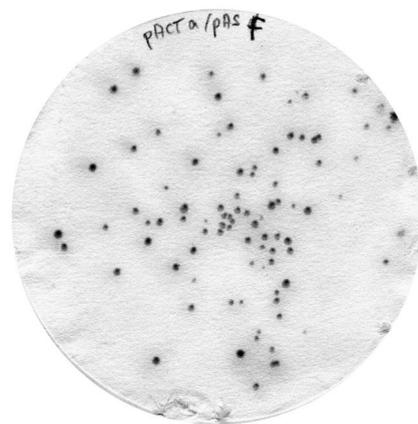
Positivkontrolle pCL1



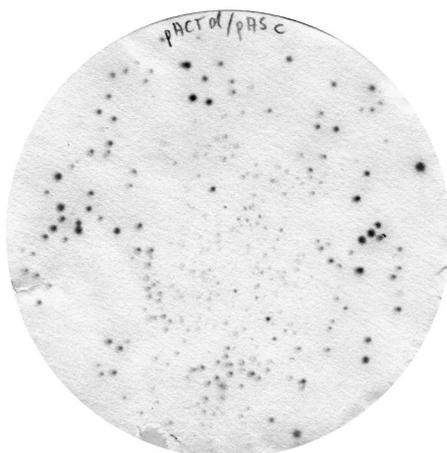
Positivkontrolle pSE1111/pSE1112



CBS1 / CBS1



CBS1 / CBS2



CBS2 / CBS1



CBS2 / CBS2

Abb. 56 β -Galaktosidasetest mit Filterabklatschen von Hefekolonien. Eine Blaufärbung zeigt die Induktion des Enzyms an und weist auf eine positive Interaktion der transformierten Proteinkonstrukte hin. Da die Positivkontrolle pCL1 nur die Aufnahme eines Plasmids in die Hefezelle erforderte, sind hier mehr Kolonien zu sehen, als bei den Kotreformationen.

Von den 36 möglichen Kombinationen wurden nur 25 ausgeführt, da diese bereits ein eindeutiges Ergebnis erbrachten. Wegen der ausbleibenden Galaktosidaseinduktion bei Kotransformation mit zwei CBS1-Konstrukten wurden hier alle möglichen Paarungen getestet.

Alle heterophilen Kombinationen aus CBS1 und CBS2 führten zu einer Blaufärbung, nur beim Paar pAS2-1a/ pACT2e war die Farbintensität so schwach, daß hier keine eindeutig positive Beurteilung möglich war. Die reziproke Kombination, pACT2a/pAS2-1e, führt hingegen zu sehr starker Farbreaktion, obwohl hier dieselben interagierenden Proteinregionen vorlagen. Ebenso ergab sich bei der Paarung a/f eine stärkere Induktion, wenn CBS1a als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne vorlag, während das Signal bei Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne schwächer ausfiel. Umgekehrt schien CBS2f besser im Kontext mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne zu interagieren. Dies zeigt, wie wichtig es ist, die zu testenden Proteinregionen in beide „Zwei-Hybrid“-Vektoren zu klonieren. Man kann jedoch nicht verallgemeinern, daß eine inverse Korrelation zwischen der Länge der flankierenden Sequenzen und der Stärke der Enzyminduktion bestand.

			pACT2 mit Aktivierungsdomäne					
			CBS1			CBS2		
			a	b	c	d	e	f
pAS2-1 mit DNA-Bindungsdomäne	CBS1	a	-	-	-	++	-/+	+
		b	-	-	-			
		c	-	-	-	++	+	++
	CBS2	d	++	++		++		+/-
		e	++	+				
		f	++	++		++		+/-

Positivkontrollen	pSE1111 / pSE1112	++
	pCL1	+++
Negativkontrollen:	pACT2 / pAS2-1	-
	pAS2-1 f / pACT2	-
	pAS2-1 / pACT2 a	-/+ *)

*) nach 5 Tagen Inkubation

Abb. 57 Übersicht über die Ergebnisse des β -Galaktosidase-Aktivitätstests. Minuszeichen: Keine Farbreaktion. Pluszeichen: Blaufärbung der Kolonien, wobei die Zahl der Pluszeichen die Farbintensität bzw. die Schnelligkeit der Farbentwicklung widerspiegeln soll.

Die erhaltenen Daten weisen darauf hin, daß eine Affinität zwischen den CBS-Domänen besteht. Interessant ist dabei, daß nicht nur eine Wechselwirkung zwischen CBS1 und CBS2 auftreten kann, was nach den Koexpressionen mit Kanalfragmenten bereits vermutet wurde, sondern auch eine homophile Affinität der CBS2-Domäne existiert. Da CLC-Kanäle *in vivo*

als Di- oder Multimere vorkommen, ergeben sich aus dieser Beobachtung vielversprechende Ansatzpunkte für weitere Experimente. Da das Hefe-Zwei-Hybrid-System in einigen Fällen auch falsch-positive Ergebnisse liefern kann, sollten die Effekte zunächst anhand einer anderen, biochemischen Technik, wie z. B. dem Western-Blot-Overlay reproduziert werden. Die folgende Grafik verdeutlicht noch einmal das Resultat:

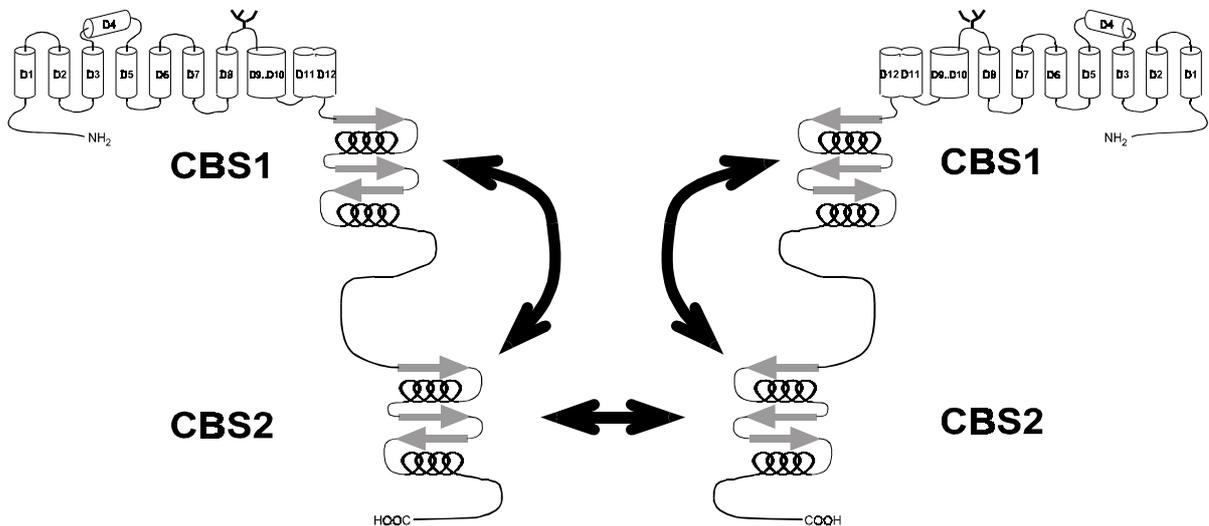


Abb. 58 Wechselwirkungen der CBS-Domänen im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Graue Pfeile stehen für β -Faltblattstrukturen und schwarze Spiralen repräsentieren α -Helices.

3.11 Charakterisierung von Myotonie-Mutationen

In unserer Arbeitsgruppe (Dr. Christian Kubisch) und in der Gruppe von FONTAINE, INSERM/Paris (Plassart-Schiess *et al.* 1997), wurden neue Mutationen bei Myotonie-Patienten gefunden. Eine elektrophysiologische Charakterisierung des resultierenden Phänotyps erfolgte in der vorliegenden Arbeit, indem die entsprechenden Mutationen in die Wildtyp-cDNA von hCIC-1 eingebaut und die daraus hergestellten cRNAs in *Xenopus*-Oozyten exprimiert wurden.

In einer zurückliegenden Untersuchung (Pusch *et al.*, 1995) war bereits gezeigt worden, daß die dominant vererbte Thomsen-Myotonie auf Mutationen im hCIC-1 beruht, die die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals spannungsabhängig zu positiven Werten verschieben. Da die funktionellen Chloridkanalkomplexe Oligomere sind, beeinflussen mutierte Untereinheiten den Wildtyp derart, daß diese ebenfalls erst bei höheren Potentialwerten öffnen. Der Gesamtstrom durch mutierte Kanäle, Wildtyp-Homomere und Heterooligomere ist letztendlich kleiner als 50% des Normalwertes, und es kommt bei den betroffenen Patienten zu den Symptomen der Myotonie.

Mutation	Myotonieform des Patienten
F161V	rezessiv ?
V236L	rezessiv
G285E	rezessiv
V286A	dominant
R300Q	rezessiv ?
F307S	dominant
A313T	dominant
I556N	rezessiv/levior

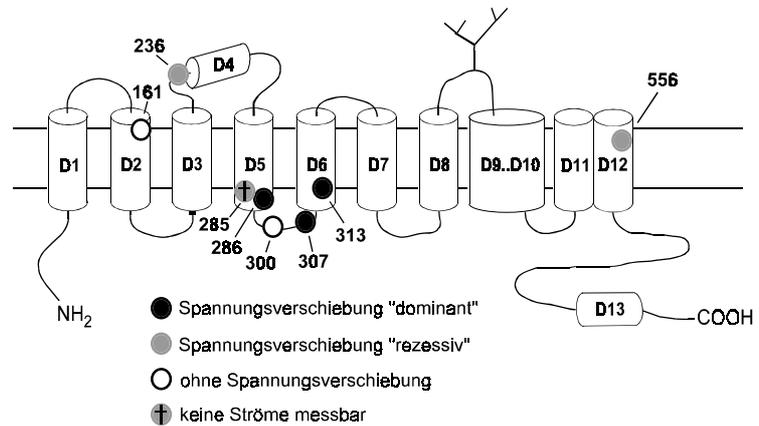


Abb. 59 Mutationen in hCIC-1, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die Tabelle links gibt den Erbgang in der Familie an, bei der die Myotonie gefunden wurde. In der Grafik rechts sind die Mutationen in das aktuelle Topologiemodell des Kanals eingezeichnet. Die Farbe gibt an, wie sich die Mutante bei Koexpression mit dem Wildtyp verhielten. Bei F161V und R300Q handelt es sich wahrscheinlich um Polymorphismen.

Eine Quantifizierung des „dominanten Effekts“, den mutierte Untereinheiten auf normale Kanalmonomere ausüben, läßt sich durchführen, indem man die Offenwahrscheinlichkeit von Mutante, Wildtyp und der Koexpression beider in Abhängigkeit des Membranpotentials bestimmt. Hierfür wurde ein spezielles Pulsprotokoll verwendet (s. Abb. 60A), bei dem die Kanäle zunächst durch eine Haltespannung von -100 mV inaktiviert werden. Anschließend werden Konditionierungspulse im Bereich von -140 mV bis +100 mV appliziert. Jeweils nach Erreichen des neuen Gleichgewichtszustandes erfolgt ein konstanter Testpuls bei -80 mV. Durch den schnellen Spannungswechsel ist die instantane Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle noch dieselbe wie beim vorangegangenen Konditionierungspotential. Da es im Moment des Umschaltens vom Prä- zum Testpuls zu einer „Umladung“ der Oozytenmembran kommt, verfälschen kapazitive Ströme die initialen Meßwerte (senkrechte Linien in Abb. 60B). Indem man die sich anschließenden Ströme auf diesen Zeitpunkt zurückextrapoliert, erhält man die

korrekten Werte für die Stromstärke. Diese Berechnung wurde mit einem QuickBasic-Programm (M. Pusch) durchgeführt.

Bei der Auswertung werden die Ströme einer Oozyte anschließend auf den jeweils maximalen Strom - der nach dem Konditionierungspuls von +100 mV gemessen wurde - normiert. Die resultierenden Werte zwischen null und eins entsprechen dann der relativen Offenwahrscheinlichkeit, p_o , die in ihrer Spannungsabhängigkeit einer Boltzmannverteilung folgt (s. Gl. 5 in Abschnitt 2.13.5.3). Dies ist in Abb. 60C am Beispiel des hCIC-1 Wildtyps und der Mutante A313T grafisch dargestellt.

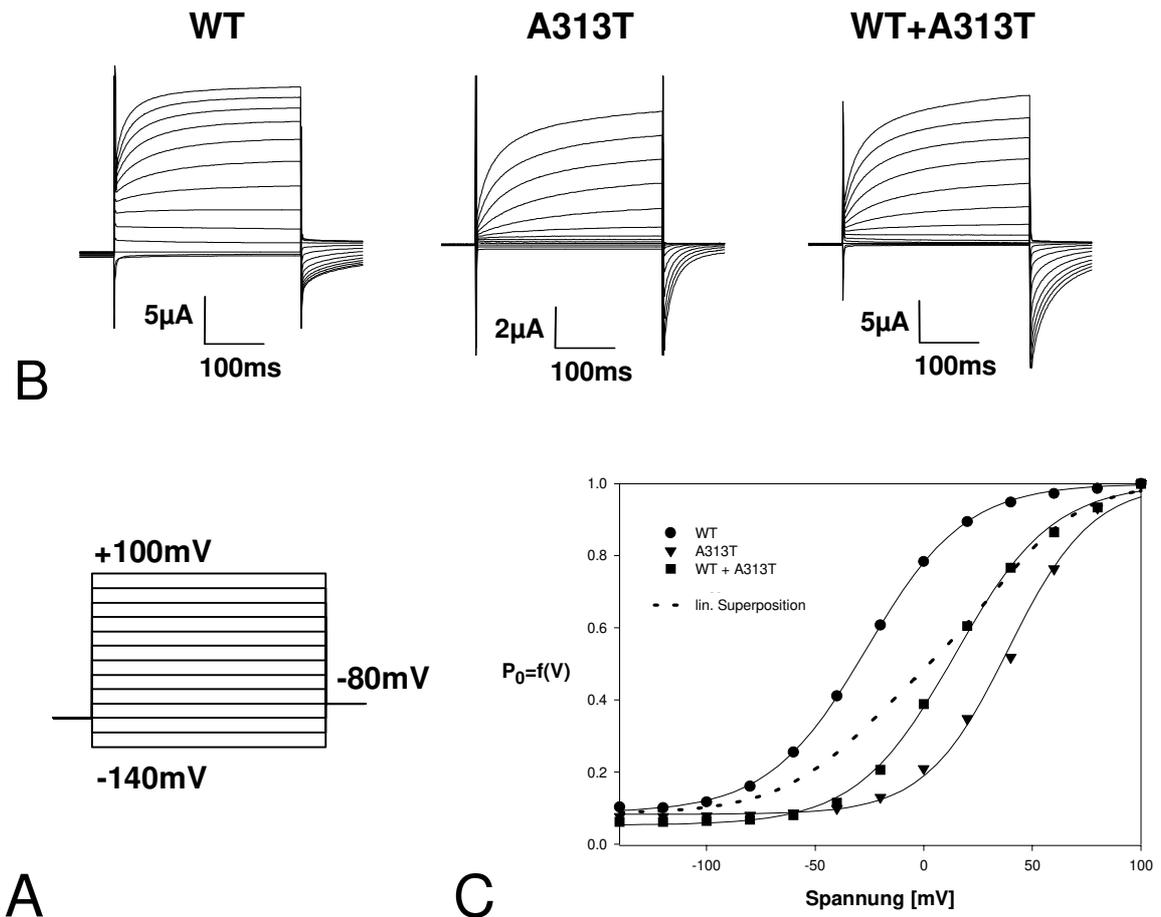


Abb. 60 Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung am Beispiel von Wildtyp und der Mutante A313T. (A) Spannungsprotokoll; (B) resultierende Stromkurven von Wildtyp, A313T und deren Koexpression; (C) grafische Darstellung der Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Membranpotential. Nach Konditionierungspulsen im Bereich von -140 bis +100 mV wurde die Oozyte auf eine konstante Testspannung von -80 mV geklemmt und die instantanen Ströme bestimmt. In (C) sind die auf den Maximalstrom normierten Werte (gemäß Gl. 5 und 6 in Abschnitt 2.13.5.3) gezeigt. Die gestrichelte Linie ergibt sich aus der rein rechnerischen Überlagerung der Kurven von WT und Mutante.

Der Wendepunkt der Kurven entspricht einer halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle ($p_o(V) = 0,5$) und liegt beim hCIC-1 Wildtyp etwa bei -20 mV. Die Steigung des Grafen am Wendepunkt korreliert mit der apparenten Schaltladung z in Gl. 5, die bei hCIC-1 Werte um eins annimmt. Im Vergleich dazu ist die Kurve der Mutante A313T nach rechts zu höheren Spannungswerten verschoben. Halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit wird erst bei etwa +40 mV erreicht, jedoch ist die Kurvensteigung wie beim Wildtyp. Nach Koinjektion gleicher cRNA-Mengen von WT und Mutante in die Oozyte ergeben sich Ströme, die in ihrer

Spannungsabhängigkeit zwischen WT und Mutante liegen, der Wendepunkt ist hier bei rund +20 mV. In der Oozyte tragen auch endogene Kanäle und „Lecks“ zum Gesamtstrom bei und erhöhen die scheinbare Offenwahrscheinlichkeit, insbesondere bei hyperpolarisierendem Potential. Daher sinkt der minimale Wert für $p_0(V)$ in Abb. 60 nur auf Werte um 0,1, obwohl hCIC-1 weitgehend inaktiviert ist.

Bei Koexpression zweier Kanalvarianten bilden sich einerseits Heteromere mit neuen Eigenschaften, andererseits existieren zusätzlich noch Homomere. Die Häufigkeiten folgen einer Binomialverteilung. Bei Kanälen aus zwei Untereinheiten ergeben sich je 25% Homomere und 50% Heteromere (1:2:1), bei vier Untereinheiten sind nur noch je 6,25% Homomere und 87,5% Heteromere vorhanden (1:4:6:4:1), gleiche Assoziationswahrscheinlichkeiten vorausgesetzt.

Bilden sich keine Mischformen aus, so liegen zwei Homomerpopulationen nebeneinander vor. Da an der Oozyte nur die Summe aller Ströme gemessen wird, wären auch im diesem Fall die Kurven gegenüber reinem WT oder Mutante verschoben, allerdings nur scheinbar, aufgrund der meßtechnische Superposition zweier unabhängiger Kanaltypen. Daß dies bei der Koinjektion in Abb. 60 nicht der Fall war, sondern tatsächlich eine Heteromerisierung der Untereinheiten erfolgte, erkennt man an der simulierten Überlagerung der Kurven von WT und Mutante A313T, die als gestrichelte Linie in Abb. 60C eingetragen ist: Die Kurve verläuft deutlich flacher, der Wert für z unterscheidet sich von WT und Mutante. Eine solche Verringerung der Kurvensteigung bei Koexpression würde somit als Anzeichen für fehlende Heteromerisierung gewertet.

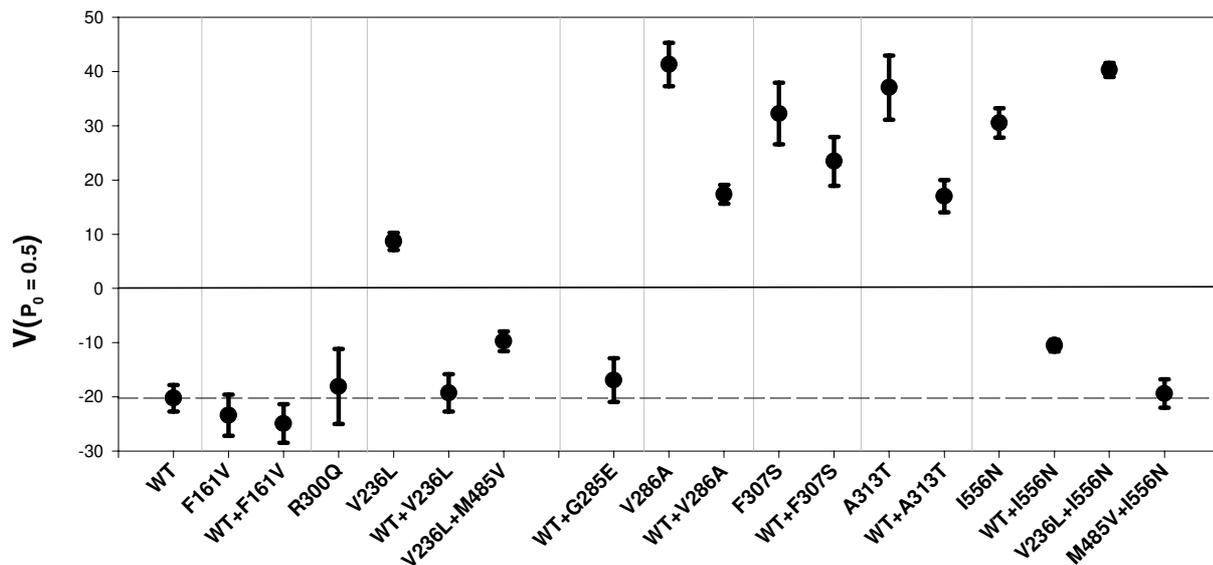


Abb. 61 Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit von hCIC-1-Mutanten, gemessen nach Einzelinjektion oder bei Koexpression mit WT. Dargestellt ist die Spannung, die zu halbmaximaler Kanalaktivierung führte (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 5$). Der Wert des hCIC-1-Wildtyps ist als Referenz durch eine gestrichelte Linie angedeutet. Weitere Erklärungen im Text.

Auf die beschriebene Art wurden alle Mutanten untersucht. Die nächsten Grafiken geben eine Übersicht über alle Ergebnisse. Zunächst ist in Abb. 61 die Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit anhand der Spannungswerte für $p_0(V) = 0,5$ gezeigt. Anschließend werden in Abb. 62 die Größe der Ströme und in Abb. 63 der berechnete Wert der Schaltladung dargestellt.

Die erste, rezessive Mutation F161V zeigte keine vom Wildtyp abweichende Spannungscharakteristik, auch nicht bei gleichzeitiger Anwesenheit von WT-Kanälen. Die Stromamplitude betrug jedoch nur ca 50% des Wildtyp-Wertes (s. Abb. 62). Bei Koexpression mit WT lag der Mittelwert der Stromstärke zwar zwischen denen der Einzelinjektionen, wegen der starken Meßwertstreuung ist die Signifikanz aber nur gering. Aus niedrigen Strömen im Oozyten-Expressionssystem kann nicht unmittelbar gefolgert werden, daß die Chloridleitfähigkeit aufgrund dieser Mutation *in vivo* ebenfalls erniedrigt ist. Dies müßte durch direkte Messung an der Muskelzelle bestätigt werden. Trotzdem stehen die vorliegenden Meßdaten im Einklang mit einem rezessiven Typ der Mutation. Das Gesagte gilt gleichermaßen für die Mutante R300Q. Auch hier sind die Ströme kleiner (Koexpressionsdaten nicht gezeigt). Bei beiden könnte unter Umständen eine Einzelkanalmessung mit der „Patch-Clamp“-Technik zeigen ob die verringerten Ströme auf einem niedrigem Expressionsniveau des Proteins oder einer reduzierten Kanalleitfähigkeit beruhen.

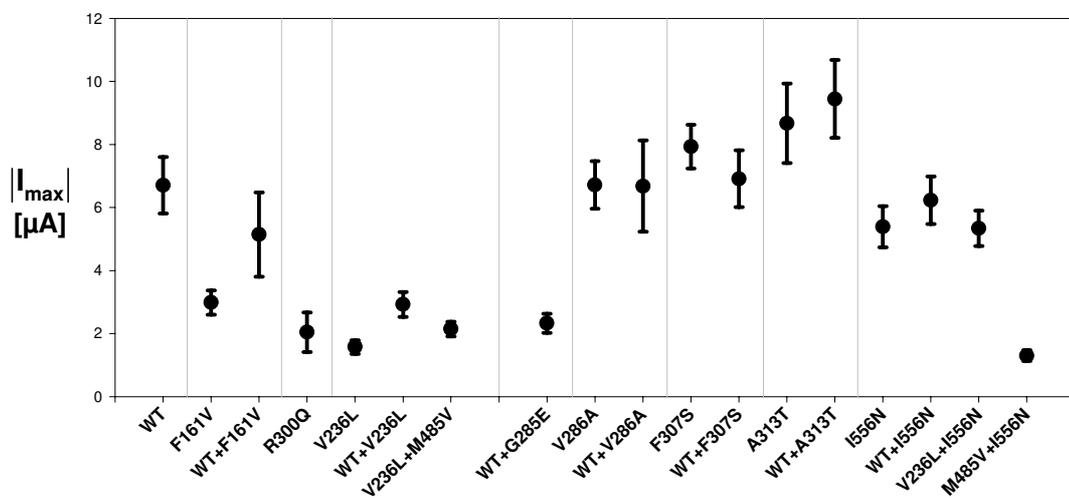


Abb. 62 Maximale Stromamplituden nach einem Präpuls von +100 mV bei hCIC-1 WT, Mutanten und Koinjektionen (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 5$).

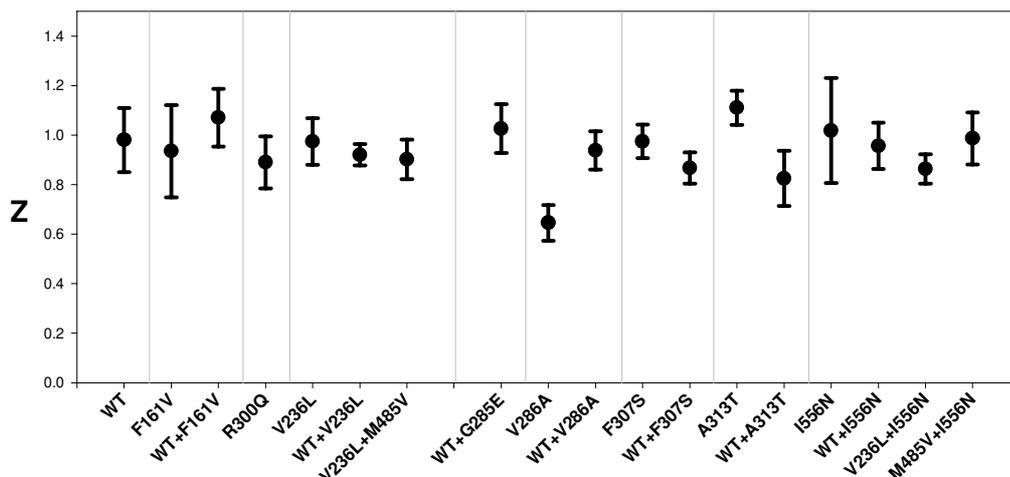


Abb. 63 Aus den Stromkurven berechnete Werte der Schaltladung z von hCIC-1 und Mutanten, bzw. deren Koexpression (Mittelwert \pm SE, $n \geq 5$).

Bei der Mutante V236L ist das potentialabhängige Öffnen des Kanals deutlich zu positiven Werten verschoben ($V_{p_0=0,5} = +9,0$ mV). Allerdings ergibt sich bei Koinjektion mit WT

eine normale Spannungsabhängigkeit. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits wäre es möglich, daß keine Heteromerbildung erfolgt. Dagegen spricht aber der nahe bei eins liegende Wert für z . Andererseits sind die Ströme der Mutante V236L sehr viel kleiner ($I_{\max} = 1,8 \text{ mV}$) als die des WT ($I_{\max} = 6,8 \text{ mV}$). Die ausbleibende Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit könnte daher auch dadurch erklärt werden, daß V236L die Potentialabhängigkeit des WT trotz Heteromerisierung nicht beeinflußt und der Gesamtstrom betragsmäßig vom WT dominiert wird. Drittens bleibt noch die Möglichkeit eines „dominanten“ Einflusses der WT-Spannungscharakteristik, welcher die Offenwahrscheinlichkeit mutanter Untereinheiten wieder in „normale“ Bereiche bringt.

Weiterhin wurden die im selben Myotoniepatienten auftretenden Mutanten V236L und M485V (Wollnik *et al.*, 1997) koexprimiert. Letztere zeichnet sich ebenfalls durch kleine Ströme ($I_{\max} = 0,96 \mu\text{A}$, ohne Abb.) und darüberhinaus durch eine zu negativem Potential verschobene Offenwahrscheinlichkeit aus ($V(p_0 = 0,5) \leq -150 \text{ mV}$). so findet man die halbmaximale Aktivierung nun bei $V(p_0 = 0,5) = -10 \text{ mV}$. Dies ist deutlich näher am Phänotyp der Mutante V236L als an M485V. Offenbar ist das Ausmaß, mit dem sich die Spannungscharakteristik eines Kanals bei der Oligomerisierung auf das Ensemble auswirkt variabel und hängt von den beteiligten Partnern ab.

Die Mutante G285E ergab bei Einzelinjektion in die Oozyte keine Ströme und bei Koexpression mit Wildtyp dessen unveränderte Potentialabhängigkeit. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine „klassisch rezessive“ Mutante, bei welcher der totale Funktionsverlust bzw. ausbleibende Expression im homozygoten Fall zur Krankheit führt.

Hingegen verhalten sich die Mutanten V286A, F307S und A313T typisch „dominant“, das heißt sie prägen bei Koexpression den heteromeren Kanälen ihre Spannungscharakteristik auf. Ihre Homomere öffnen bei sehr positiven Membranpotentialen zwischen +30 und +41 mV, bei etwa gleich großen Werten für I_{\max} wie beim WT. In der Koexpression liegen die Mittelwerte für $V(p_0 = 0,5)$ allesamt oberhalb von +15mV und damit dichter an der Mutante als am Wildtyp.

Interessant sind die Eigenschaften der Mutante I556N, die selbst über eine stark positiv verschobene Offenwahrscheinlichkeit verfügt ($V(p_0 = 0,5) = +31 \text{ mV}$). Koexprimiert man diese mit dem WT, so ergibt sich eine „schwache Dominanz“, d.h. die halbmaximale Öffnung liegt mit $V(p_0 = 0,5) = -11 \text{ mV}$ nahe am WT. Erstaunlicherweise ergibt aber die Koexpression von I556N mit V236L keinen „intermediären Phänotyp“, also einen Wert zwischen +9 mV und +31 mV, sondern diese ist noch positiver, nämlich +40 mV. Offenbar verhalten sich die Spannungsverschiebungen der einzelnen Mutationen sogar partiell additiv. Wegen dieses bisher noch nicht beobachteten Effektes wurden die Messungen an drei Chargen von Oozyten wiederholt ($n = 10$).

Im Gegensatz dazu resultiert die Koexpression mit der schon beschriebenen Mutante M485V, die erst bei Hyperpolarisation öffnet, wieder in einem Wert für $V(p_0 = 0,5)$, der mit -19 mV zwischen denen der Einzelinjektionen liegt. Erneut zeigt sich, daß die resultierende Spannungscharakteristik bei Koexpression zweier Kanäle nicht in jedem Fall intermediär und damit vorhersagbar ist, sondern im Einzelfall durch das Experiment ermittelt werden muß. Ob sich die in diesem Abschnitt beschriebenen Effekte auch in Säugerzellen reproduzieren lassen, oder nur im *Xenopus*-Oozytensystem auftreten, muß noch geklärt werden.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung von Transmembrandomänen

4.1.1 Vorhersagen anhand der Aminosäuresequenz

Will man die Funktion von Biomolekülen verstehen und ihre molekularen Mechanismen aufklären, so braucht man Informationen über ihren dreidimensionalen Aufbau. Gerade für Membranproteine ist die Beschaffung von detaillierten Strukturdaten aber sehr schwierig. In den vergangenen 20 Jahren sind zwar die Aminosäuresequenzen vieler Kanäle, Transporter und Rezeptoren analysiert worden, aber nur bei wenigen gelang die Kristallisation. Im Gegensatz zu zyttoplasmatischen Proteinen gibt es offenbar keine Standardbedingungen, unter denen sich dreidimensionale Kristalle von Membranproteinen erzeugen lassen, und es ist nach wie vor eine mühevoll Aufgabe, die viele Jahre beanspruchen kann.

Man braucht jedoch keinesfalls solange zu warten, bis eine Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von wenigen Ångström vorliegt. Zur Interpretation experimenteller Befunde und Planung neuer Versuche ist bereits ein gröberes Bild der Topologie sehr hilfreich. Ein erster Schritt besteht darin, herauszufinden, welche Abschnitte des Proteins in die Membran eingebettet sind, welche extra- und welche intrazellulär liegen. Dabei kommen einem gerade diejenigen Eigenschaften zu Hilfe, welche die Kristallisation erschweren. Die Integration eines Polypeptids in die Lipiddoppelschicht zwingt diesem nämlich zahlreiche strukturelle Beschränkungen auf, die die Anzahl möglicher Konformationen in Grenzen halten. Bereits in der Einleitung ist darauf hingewiesen worden, daß für Transmembranbereiche nur einige wenige Sekundärstrukturen erlaubt sind. Die aus physikochemischen Überlegungen abgeleitete Notwendigkeit der intramolekularen Absättigung von Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren, das sind vor allem die Sauerstoff- und Stickstoffatome der Peptidbindung, wird durch die bisherigen Strukturanalysen bestätigt: Die innerhalb der Membran vorherrschenden Motive sind α -Helices oder β -Faltblätter. Aber wegen der geringen Anzahl gut untersuchter Membranproteine sollte man nicht annehmen, dies seien die einzigen möglichen Sekundärstrukturen.

Vor kurzem ist in der Pektat Lyase C aus der Pflanze *Erwinia chrysanthemi* (Yoder und Jurnak, 1995; Yoder *et al.*, 1993) und in der Rhamnogalakturonase A aus dem Pilz *Aspergillus aculeatus* (Petersen *et al.*, 1997) zum ersten Mal die β -Helix als Strukturmotiv gefunden worden, welche ebenfalls alle Wasserstoffbrücken absättigt und somit theoretisch auch als Transmembranabschnitt denkbar ist.

Das Polypeptid Gramicidin aus *Bacillus brevis* besteht alternierend aus L- und D-Aminosäuren und dimerisiert zu einer Membranpore. Eine dabei auftretende Sekundärstruktur ist ebenfalls die β -Helix, ursprünglich als $\pi^6_{(L/D)}$ -Helix bezeichnet (Urry, 1971). Neben der „klassischen“ α -Helix, die systematisch als 3.6₁₃-Helix benannt wird⁶, und der β -Helix gibt es weitere mögliche Helixformen: 2.2₇, 3₁₀, 4.3₁₄, 4.4₁₆ (π) und 5.4₁₇ (γ).

Neben der spezifischen Sekundärstruktur ist auch die Auswahl der Aminosäuren für Transmembranabschnitte eingeschränkt. Es ist einleuchtend, daß an den Protein-Lipid-Grenzflächen bevorzugt hydrophobe Aminosäuren verwendet werden, die keine fest gebundene Hydrathülle besitzen und mit den Lipiden Van-der-Waals'sche Wechselwirkungen eingehen können. Hierauf beruht die vergleichsweise einfache Hydrophobizitätsanalyse nach KYTE und DOOLITTLE (Kyte und Doolittle, 1982) zur Vorhersage von Transmembranabschnitten. Das Kriterium der Gesamt-Hydrophobizität ist bei einfach aufgebauten Proteinen mit wenigen membranspannenden Segmenten recht gut geeignet, da der relative Anteil an Kontaktflächen zur Lipidschicht hoch ist.

⁶ Die groß geschriebenen Ziffern geben hierbei die Anzahl der Aminosäuren pro Helixwindung an, während die tiefgestellten die Zahl der Atome pro Windung repräsentieren.

An interhelikalen Kontaktstellen sind jedoch polare und geladene Reste möglich, die sich dann gegenseitig abschirmen. Je größer ein Membranprotein ist und je mehr Transmembransegmente vorhanden sind, desto geringer wird der Anteil an Lipidinteraktionen. Insbesondere Kanalproteine mit einer zentralen, wassergefüllten Pore besitzen einen überdurchschnittlichen Anteil an polaren und geladenen Aminosäuren, was die Strukturvorhersage über die Hydrophobizität erschwert und zum Teil sogar zu falschen Modellen führt. So läßt der hohe Anteil an basischen Aminosäuren in der vierten Helix (S4) von *shaker*-artigen K⁺-Kanälen diese nicht als typisches Transmembransegment erscheinen, und alternative Topologien mit intrazellulär lokalisiertem S4-Abschnitt wurden diskutiert (White, 1994).

Bei der Hydrophobizitätsanalyse ergeben sich weiterhin Variationen im Ergebnis, je nachdem welche relative Hydrophobizitätsskala und welche Fensterfunktionen verwendet werden (s. Abschnitt 3.1). Die nachträgliche Anwendung dieser Methode auf bereits kristallisierte Membranproteine hat gezeigt, daß zwar für ein gegebenes Polypeptid eine Optimierung der Parameter möglich ist, es aber keine optimalen Startwerte für ein unbekanntes Protein gibt (White, 1994). Allgemein ist es günstig, eine Fensterfunktion zu verwenden, die die Hydrophobizität zentraler Aminosäuren stärker gewichtet als die im Randbereich. Dies spiegelt den Aufbau der Phospholipid-Membran wieder.

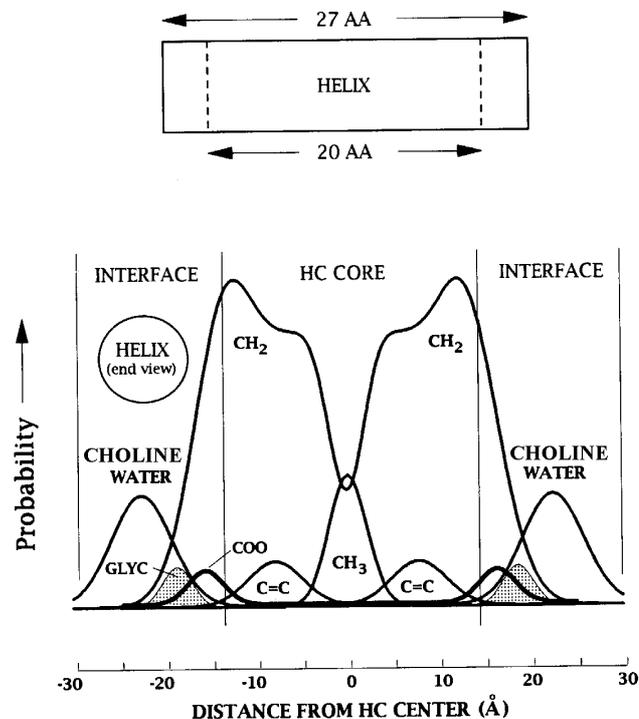


Abb. 64 „Querschnitt“ durch eine Modell-Lipiddoppelschicht mit den mittleren Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der wichtigsten funktionellen Gruppen (nach: Wiener und White, 1992; aus: White, 1994). Links ist die Aufsicht auf eine oberflächenparallele Helix, die außerhalb der Membran liegt, angedeutet.

Wie Abb. 64 verdeutlicht, wird der Kern der Doppelschicht, dessen Dicke etwa der Länge einer Helix aus 20 Aminosäuren entspricht, von den gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren gebildet. Beiderseits flankierend liegen die Carbonylgruppen der Fettsäuren und der ebenfalls polare Glyzerolanteil, anschließend findet man geladene Aminoalkohole, wie Cholin, und eine Hydrathülle aus Wassermolekülen. Die zentralen 20 Aminosäuren einer Transmembranhelix befinden sich dabei in überwiegend apolarem Milieu, während an den Helixenden bereits eine polare Umgebung vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hydrophobizitätsanalyse nach KYTE und DOOLITTLE mit einer Rechteck-Fensterfunktion durchgeführt, da das dafür verwendete Computer-Programm

DNASTAR™ keine individuellen Einstellungen außer der Fensterbreite zuließ. Um die Variationsbreite der Ergebnisse zu testen, wurden Fensterbreiten von 11 bis 21 Aminosäuren verwendet. Während die Maxima D1-D3 und D5-D12 dabei eine relativ konstante Breite von >20 Aminosäuren und Hydrophobizitätswerte oberhalb der Signifikanzschwelle von Eins zeigten, „verschwand“ die Domäne D4 aufgrund der stärkeren Mittelung mit der breiteren Fensterfunktion. Bei allen CLC-Kanälen sind hier weniger als 10 aufeinanderfolgende Aminosäuren hydrophob und der nur etwa 20 Aminosäuren lange Bereich enthält rund 10-20% polare oder geladene Reste. Diese schwache Hydrophobizität ist nach bisherigen Erkenntnissen nicht ausreichend um *per se* eine Transmembrandomäne zu konstituieren (Adams und Rose, 1985; Chen und Kendall, 1995; Davis und Model, 1985; Kuroiwa *et al.*, 1991). Es bestünde allerdings die Möglichkeit, daß D4 trotzdem in der Membran liegt und seine hydrophilen Reste gar nicht mit Membranlipiden in Kontakt kommen, sondern Interaktionen mit benachbarten Teilen des Proteins eingehen; oder die polaren und geladenen Gruppe in D4 zeigen zur wassergefüllten Pore. Die Domäne D4 hätte dann aber sicher eine große Bedeutung für die CLC-Kanalfunktion, und ihre Aminosäuresequenz sollte innerhalb der Proteinfamilie stärker konserviert sein, als dies der Fall ist.

Die Strukturvorhersagen mit den Programmen TMAP und PREDICTPROTEIN kommen bezüglich D4 zum selben Ergebnis, indem sie diese als Transmembrandomäne ausschließen. Diese Algorithmen sind in ihrer Validität deutlich höher einzuschätzen, als die KYTE-DOOLITTLE-Analyse, da sie mehrere Kriterien verwenden. Sie gewichten die Hydrophobizität differenziert zwischen Kernbereich und Peripherie einer potentiellen Transmembranhelix und berücksichtigen auch die Eignung der vorkommenden Aminosäuren, helikale Strukturen auszubilden. Vor allem aber greifen sie auf den Sequenzvergleich zwischen Vertretern der gleichen Superfamilie oder anderen homologen Proteinen zurück. Nimmt man an, daß alle CLC-Proteine tatsächlich Kanäle sind, sollten sie auch eine prinzipiell gleiche Topologie besitzen. Diese Annahme ist berechtigt und bislang nicht durch Gegenbeispiele bereits untersuchter Proteine widerlegt worden.

Allerdings wird z. B. in Veröffentlichungen über das P-Glykoprotein die Möglichkeit diskutiert, daß unterschiedliche Funktionszustände - Chloridpermeation vs. Transport von Zytostatika - mit unterschiedlichen Proteinstrukturen einhergehen (Gill *et al.*, 1992; Skach *et al.*, 1993; Valverde *et al.*, 1992). Da nicht für alle CLC-Proteine die Kanalfunktion nachgewiesen ist, bleibt zumindest theoretisch die Möglichkeit, daß diese eine andere physiologische Aufgabe haben und dabei auch eine abweichende Raumstruktur besitzen. Eine in der Hydrophobizität schwach ausgeprägte Domäne D4 korreliert aber nicht mit fehlender Chloridleitfähigkeit, wie das Beispiel CIC-5 belegt (s. Einleitung und eigene Messungen).

Die Domänen D1 und D2, D5-D8 sowie D11 und D12 werden von TMAP und PREDICTPROTEIN gleichermaßen als Transmembranhelices vorgeschlagen, dies steht im Einklang mit der Hydrophobizitätsanalyse. Die Domäne D3 wird nur von TMAP als Membrandurchquerung klassifiziert. Auch hier treten polare oder geladene Aminosäuren auf, zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit für eine helikale Sekundärstruktur gemäß PREDICTPROTEIN relativ klein. Trotzdem finden sich hier zahlreiche konservierte Aminosäuren, und Mutationsanalysen an CIC-0 (M. Pusch, persönliche Mitteilung) sowie Daten aus der vorliegenden Arbeit, wie z.B. die MTSES-Effekte auf die Mutanten L223C und P228C, zeigen eine Beteiligung dieser Region an der Pore.

Eine weitere Region wird von den beiden Vorhersagealgorithmen unterschiedlich beurteilt. In der Hydrophobizitätskurve erscheinen die Domänen D9 und D10 als ununterbrochener (CIC-0) oder zweigipfliger (hCIC-1 und hCIC7) hydrophober Abschnitt von fast 50 Aminosäuren Länge. Die Helixwahrscheinlichkeit ist über den gesamten Bereich laut PREDICTPROTEIN hoch. Nur in der Mitte gibt es ein Intervall von vier Aminosäuren - unter denen sich zwei Proline befinden (P478 und P480) - mit auf 70% reduzierter Helixwahrscheinlichkeit. Dies veranlaßt PREDICTPROTEIN zwei separate Transmembranhelices vorzuschlagen. TMAP hingegen geht von einer einzelnen Membrandomäne aus, wobei nur die zentralen Aminosäuren des hydrophoben Segmentes dazugerechnet werden. Hierbei würden jedoch zehn lipophile Aminosäuren (VVIIFLFFV) am

Anfang von D9 in der wässrigen Phase verbleiben und die zwei o.g. Proline in die Mitte der Helix plaziert. Eine solche Situation ist relativ unwahrscheinlich, daher erscheint die Vorhersage von PREDICTPROTEIN glaubwürdiger.

Wieder in Übereinstimmung beider Algorithmen wird der carboxyterminale hydrophobe Bereich D13 als Transmembrandomäne ausgeschlossen. Dieser ist mit der CBS2-Domäne identisch und offenbar an intramolekularen Protein-Wechselwirkungen beteiligt, wie sich bei den Untersuchungen mit separat exprimiertem C-Terminus, sowie im Hefe-Zwei-Hybrid-Test gezeigt hat. Im Gegensatz zu CIC-0 macht sich bei hCIC-7 (und bei anderen CIC-Kanälen) auch CBS1 als lokales Hydrophobizitätsmaximum bemerkbar. Schon frühere Arbeiten hatten D13 als Transmembrandomäne ausgeschlossen, da sich die aminoternale, zytoplasmatische Inaktivierungsdomäne von CIC-2 ohne Funktionsverlust sowohl vor als auch hinter D13 transplantieren ließ (Gründer *et al.*, 1992).

4.1.2 Anwendung experimenteller Techniken

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Abschnitt 1.3.3), stehen eine ganze Reihe von experimentellen Methoden für die Topologieanalyse zur Verfügung. Die Mehrzahl von ihnen versucht die hydrophilen Verbindungssegmente zwischen den Helices jeweils dem extra- oder intrazellulären Raum zuzuordnen. Es existieren nur wenige Techniken, bei denen die Primärsequenz des Proteins nicht verändert wird. Hierzu gehören z. B. die Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Verbindungssegmente oder Proteaseverdau *in situ* an Zellen oder Membranvesikeln. Hierbei kann man davon ausgehen, daß das Protein in nativer Topologie vorliegt. Die Antikörpertechnik ist wegen des hohen Aufwandes bei deren Herstellung nur für Proteine mit wenigen Transmembranhelices sinnvoll. Man muß pro Epitop meist mehrere Tiere immunisieren und die erhaltenen Seren ausführlich auf ihre Spezifität für das Epitop prüfen. Dieses muß sowohl im nicht-denaturierten Zustand, als auch - bei der Detektion intrazellulärer Bereiche - in Anwesenheit von Detergenz erkannt werden. Hierbei kann es zu falscher Interpretation von Ergebnissen kommen, wie beim nikotinischen Acetylcholinrezeptor geschehen, für den aufgrund immunologischer Studien ein Modell mit fünf statt vier Membrandurchgängen und intra- statt extrazellulärem C-Terminus vorgeschlagen wurde (Young *et al.*, 1985).

Die proteolytische Fragmentierung eines in der Membran befindlichen Proteins setzt voraus, daß die außerhalb der Lipidschicht liegenden Abschnitte groß genug und für Proteasen zugänglich sind. Die entstehenden Spaltprodukte sollten sich in ihrer Größe unterscheiden, damit sie eindeutig identifiziert werden können. Die Erzeugung von „right-side-out“- und „inside-out“-Vesikeln für topologisch selektive Enzymzugabe erfolgt nicht immer mit hoher Spezifität, statt dessen bilden sich Mischpopulationen von Vesikeln, oder die Integrität der Membranen leidet, so daß die Ergebnisse nicht eindeutig sind (Cafiso, 1994). Bei hCIC-1 findet man überwiegend kurze hydrophile Verbindungssegmente. Die Größe der Proteolyseprodukte ist daher gering und wird im wesentlichen durch die Transmembrandomänen bedingt. In der Anfangsphase dieser Arbeit durchgeführte Trypsin- und Proteinase K-Verdaue von *in vitro* und in Anwesenheit von Mikrosomen translatiertem hCIC-1 führten dann auch zu sehr kleinen, in SDS-Gelen schlecht trennbaren Fragmenten. Diese Methode wurde daher nicht weiter verfolgt.

Die Mehrzahl der gebräuchlichen experimentellen Techniken beinhaltet eine mehr oder weniger starke Veränderung der ursprünglichen Aminosäuresequenz. Insertionen von Epitopen und sogar einzelne Aminosäureaustausche können sich aber auf die Topologie auswirken, so daß besondere Vorsicht in der Beurteilung der Resultate geboten ist. Im allgemeinen kann man davon ausgehen, daß die native Raumstruktur vorliegt, wenn die Funktion des Proteins nach Mutagenese erhalten bleibt.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Einführung von Glykosylierungsstellen in die hydrophilen Verbindungssegmente zwischen hydrophoben Domänen als geeignete Methode angesehen. Da das Erkennungsmotiv der Oligosaccharid-Transferase nur aus den drei Aminosäuren NXS/T besteht, stellt deren Insertion in die Originalsequenz eine relativ kleine Störung dar und die Gefahr des Funktionsverlustes ist gering. Diese Technik wurde zuerst am nikotinischen Acetylcholinrezeptor *in vitro* unter Verwendung des Retikulozyten-Translationssystems angewendet (Chavez und Hall, 1991). Ermutigende Daten lagen bereits von Topologiestudien am CFTR vor (Chang *et al.*, 1994), der - ebenso wie hClC-1 - recht kleine extrazelluläre Schleifen besitzt. Hier waren Glykosylierungsstellen durch Punktmutation oder Insertion von maximal fünf Aminosäuren erzeugt worden. Alle Konstrukte behielten dabei ihre Chloridtransportaktivität.

Leider blieben die anfänglichen Experimente an hClC-1 mit Punktmutationen ohne Erfolg (s. Abschnitt 3.3.1). Eine anschließende sorgfältige Prüfung der aktuellen Literatur lieferte dafür eine Erklärung. Sowohl die Analyse von natürlich vorkommenden Proteinen (Landolt-Marticorena und Reithmeier, 1994), als auch Studien mit artifiziellen Konstrukten (Nilsson und von Heijne, 1993; Popov *et al.*, 1997) haben gezeigt, daß die minimale Größe einer glykosylierbaren Schleife 25-33 Aminosäuren beträgt, wobei das Asparagin nicht dichter als 12 Reste an der Membran liegen darf. Dies spiegelt die Geometrie des aktiven Zentrums der Oligosaccharidtransferase wider. Angesichts dieser Daten ist das positive Ergebnis der Untersuchung am CFTR nicht nachzuvollziehen.

Um trotz der kleinen Schleifen beim hClC-1 (5-28 Aminosäuren gemäß Hydrophobizitätsanalyse) die Glykosylierungstechnik anwenden zu können, wurden größere Sequenzabschnitte eingefügt, eine methodische Variante, die z. B. beim Glukosetransporter Glut 1 (Hresko *et al.*, 1994) erfolgreich war. Da der Wildtyp von hClC-1 über eine durch Zuckerketten modifizierte Schleife zwischen D8 und D9 verfügt, wurde ein Abschnitt daraus als „Transplantat“ verwendet. Eine zusätzliche Trunkation der carboxyterminalen Proteinabschnitte hinter D12 erwies sich als notwendig, um den Mobilitätsunterschied zwischen glykosyliertem und unmodifiziertem hClC-1 zweifelsfrei detektieren zu können. Da die Translation ein sequentiell vom N- zum C-Terminus fortschreitender Vorgang ist und die Insertion von Transmembrandomänen offenbar bereits kotranslational erfolgt (Mothes *et al.*, 1997), sollte sich das Fehlen des putativ zytoplasmatischen Carboxyendes nicht auf die Topologie auswirken. Die Gültigkeit dieser Annahme für hClC-1 bestätigte sich nachträglich anhand der Koexpressionsexperimente von Kanalfragmenten (s. Abschnitt 3.8.1). Dabei zeigte sich, daß trotz fehlendem Carboxyterminus der Rest des Kanals die native Raumstruktur einnimmt, da sich Ströme messen ließen. Weil der trunkierte Kanal jedoch allein keine Chloridionen leitet, wurden für funktionelle Tests die gleichen Insertionen auch innerhalb der kompletten Polypeptidkette erzeugt. Die Funktionstests hätten allerdings auch durch Komplementation der trunkierten Konstrukte mit separat exprimiertem C-Terminus erfolgen können, doch zum damaligen Zeitpunkt war diese Rekonstituierbarkeit noch nicht bekannt.

In den Experimenten dieser Arbeit ergab sich eine Glykosylierung für die Schleifen D1-D2, D4-D5 (hier mit verlängertem Transplantat), D6-D7 und, wenn man den Wildtyp von hClC-1 einbezieht, D8-D9 (s. Abb. 65). Jedoch fand keine Modifikation zwischen D2-D3, D3-D4, D5-D6, D7-D8, D10-D11 sowie D12-D13 statt. Im hydrophoben Block D9 bis D12 wurde nur im Bereich des hydrophilen Abschnitts in dessen Mitte (D10-D11) eine Glykosylierungsstelle eingefügt, da eine willkürliche Insertion innerhalb D9/D10 oder D11/D12 nicht sinnvoll erschien.

Hervorzuheben ist, daß bei fast allen Konstrukten, insbesondere bei sämtlichen glykosylierbaren, die Chloridkanalfunktion erhalten blieb und rund 5-30% der Wildtyp-Stromstärken erreicht wurden. Zum Funktionsverlust führten hingegen Insertionen zwischen D3 und D4, was wegen der dort sehr konservierten Aminosäuresequenz zu erwarten war. Die fehlenden Ströme beim Konstrukt 12T13 lassen sich dadurch erklären, daß das Glykosylierungstransplantat genau in die CBS1-Domäne kloniert wurde, die zu dem Zeitpunkt noch nicht bekannt war.

Da zwar die Glykosylierung eindeutig eine extrazelluläre Lage anzeigt, ihr Ausbleiben aber kein sicherer Beweis für eine zytoplasmatische Position der Schleife ist, war es erforderlich, speziell diese Lokalisation durch eine andere Technik zu überprüfen. Hierzu käme beispielsweise die

spezifisch zytoplasmatische Phosphorylierung von Serinen oder Threoninen durch Kinasen in Frage. In der Literatur finden sich allerdings nur wenig Anwendungsbeispiele für diese Methode, so daß davon abgesehen wurde.

Am Beginn dieser Arbeit wurde statt dessen versucht, spezifische Proteaseschnittstellen in das Polypeptid einzufügen, z. B. die für den Blutgerinnungsfaktor Xa. Diese Protease hydrolysiert selektiv hinter der Aminosäurefolge Ile-Glu-Gly-Arg (Sahin-Toth *et al.*, 1994). Die Spaltungseffizienz war jedoch gering, was wahrscheinlich an einer mangelhaften Zugänglichkeit der Schnittstellen für das Enzym lag.

Gute Erfolgsaussichten haben carboxyterminale Fusionen zwischen dem Membranprotein und einem Reporterprodukt. Diese Methode wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Topologieanalyse eingesetzt (Übersicht in: Boyd *et al.*, 1993). Die beiden möglichen Varianten, Fusion mit einem katalytisch aktiven Enzym (Beja und Bibi, 1995; Bibi und Beja, 1991; Ehrmann *et al.*, 1990; Henn *et al.*, 1995; Manoil, 1991; Schulein *et al.*, 1997) oder einem immunologisch detektierbaren Reporterepitop (Bennett und Dingle, 1995; Chavez und Hall, 1991; Kuroiwa *et al.*, 1991; Lin und Addison, 1994; Seal *et al.*, 1994; Skach *et al.*, 1994), sind bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.3.3) erwähnt worden. Gegen die Anwendung der Enzymfusionen auf hCIC-1 in der vorliegenden Arbeit sprach die für die Aktivitätstests notwendige bakterielle Expression. Bei der Translation in Prokaryonten weichen die Mechanismen der Membranintegration gegenüber denen bei Eukaryonten teilweise ab, und die Signifikanz der topologischen Signalsequenzen ist unterschiedlich (Boyd und Beckwith, 1990; Hartmann *et al.*, 1989). So haben direkte Vergleiche dieser beiden Expressionssysteme mit identischen Proteinkonstrukten zu abweichenden Resultaten geführt (Geller *et al.*, 1996).

Für den „Proteinase-Protection-Assay“ mit hCIC-1 wurde die *in vitro* Translation an mikrosomalen Membranen gegenüber der Expression *in vivo* vorgezogen. Trunkation der Membranproteine führt in eukaryontischen Zellen oftmals zu gegenüber dem Wildtyp reduzierter Ausbeute. Eine effektive Qualitätskontrolle der Zellen sorgt für frühzeitige Aussonderung und Degradation anormaler Proteine. Auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten trunkierten hCIC-1-Konstrukte mit Prolaktin als Reporterepitop ließen sich in *Xenopus*-Oozyten nur schlecht exprimieren (Daten nicht gezeigt).

In Übereinstimmung mit den Glykosylierungsstudien ergab sich eine Abbaubarkeit durch Proteinase K und damit eine zytoplasmatische Lokalisation für die Schleifen D2-D3, D5-D6, D7-D8, D10-D11 und D12-D13 (s. Abb. 65). Abweichende Daten resultierten hingegen für die Konstrukte, bei denen das Prolaktinepitop hinter D3 oder hinter D4 fusioniert wurde. So schien das Segment zwischen D3 und D4 extrazellulär zu liegen, obwohl sich diese Position nicht glykosylieren ließ. Dies stellt jedoch nicht zwangsläufig einen Widerspruch dar, denn das Ausbleiben der Zuckermodifikation kann seine Ursache auch darin haben, daß die Oligosaccharidtransferase aus räumlichen Gründen keinen Zugang hatte. Möglicherweise entsprach die Topologie des Glykosylierungskonstruktes 3T*4 auch nicht der nativen Form, wofür auch der Funktionsverlust spräche (s. Ströme unter 3.3.2.2).

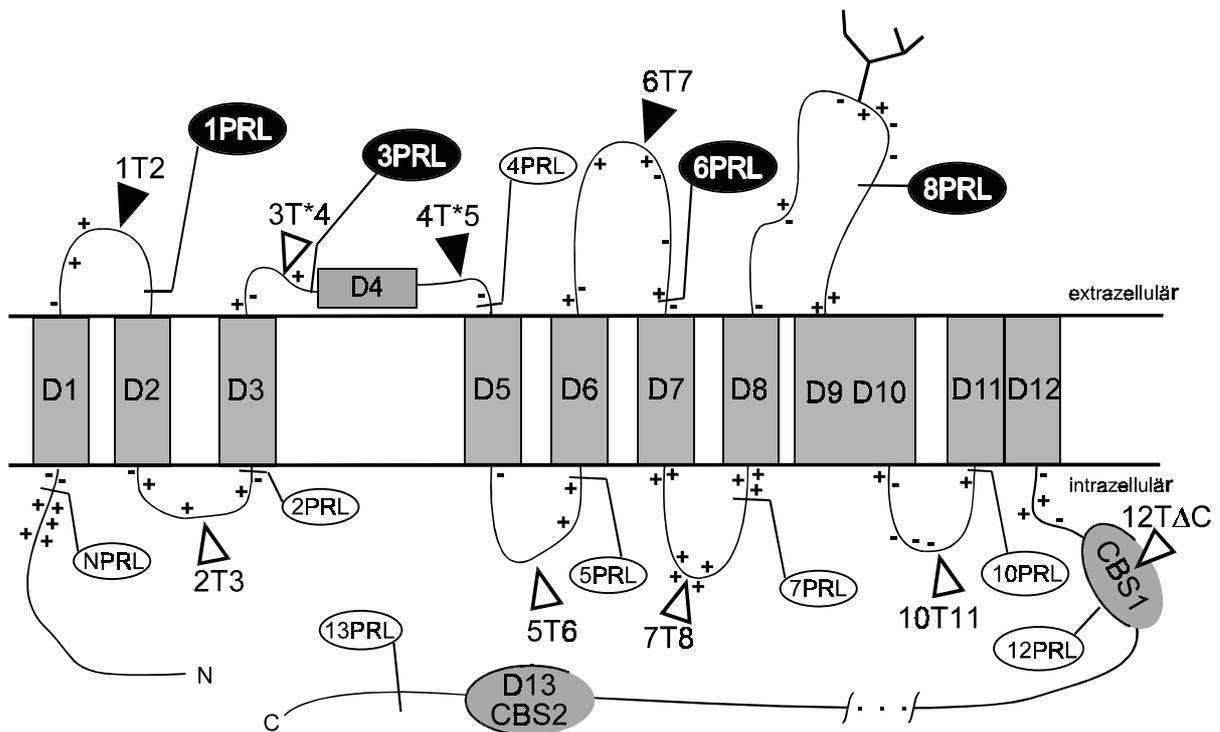


Abb. 65 Gegenüberstellung der Resultate von Glykosylierungsstudie und Proteinase-Protection-Assay an hCIC-1. Zusätzlich sind positive und negative Ladungen in den hydrophilen Schleifen eingezeichnet. Dreiecke kennzeichnen die Einfügepositionen für Glykosylierungssequenzen, wobei schwarz gefüllte Symbole deren tatsächliche Modifikation anzeigen. Die Fusionsstellen mit dem Prolaktin-Reporterepitop sind durch Linien und Ovale markiert. Weiße Schrift auf schwarzem Grund zeigt den Schutz vor proteolytischem Abbau an.

Das gegenüber Proteinase ungeschützte Epitop hinter D4 deutete eine intrazelluläre Lage an, jedoch ist die Glykosylierbarkeit im Konstrukt 4T*5 in Verbindung mit der erhaltenen Kanalaktivität als zuverlässigere Evidenz zu werten. Die offenbar verhinderte Translokation der Domäne D4 im trunkeierten Protein konnte durch zusätzliche topologische Studien an isolierten Transmembranabschnitten belegt werden. Dies wird im folgenden Abschnitt 4.1.3 noch ausführlicher diskutiert.

Bis auf die Schleife zwischen D10 und D11 überwiegen im Modell der Abb. 65 in Übereinstimmung mit der „positiv inside“-Regel (Sipos und von Heijne, 1993; von Heijne und Gavel, 1988) die positiven Ladungen in intrazellulären Schleifen. Das stark geladene Segment zwischen D7 und D8 ist auch in CIC-2 als eindeutig zytoplasmatisch identifiziert worden. Es bildet dort einen wesentlichen Teil des Rezeptors für die N-terminale Inaktivierungsdomäne (Jordt und Jentsch, 1997). Die extrazelluläre Lage der D8-D9-Schleife wird nicht nur in hCIC-1 durch die WT-Glykosylierung belegt, auch in CIC-0 (Middleton *et al.*, 1994) und CIC-K (Kieferle *et al.*, 1994) ist dort eine entsprechende Modifikation nachgewiesen.

4.1.3 Topologische und funktionelle Besonderheiten in der Region D3/D4/D5

Die Bedeutung der Domäne D4 für die CLC-Kanäle ist nach wie vor unbekannt. Sie ist relativ reich an polaren und geladenen Aminosäuren, aber ihre Sequenz ist innerhalb der Proteinfamilie nur schwach konserviert. Die Glykosylierungsstudien haben deutliche Hinweise dafür erbracht, daß die Schleife zwischen D4 und D5 extrazellulär liegt. Die Daten des „Proteinase-Protection Assays“ sprachen hingegen für eine zytoplasmatische Lage.

Bereits die nur mäßig hydrophobe Domäne D3 besaß eine schlechte Signalanker-Aktivität und war allein nicht in der Lage, das C-terminale Reporterepitop ins Lumen der Mikrosomen zu translozieren (Konstrukt N3PrI, Abschnitt 3.4). Wenn D3 jedoch im Zusammenhang mit D1 und D2 vorlag (Konstrukt 3PrI), fand die Translokation zumindest bei einem Teil der Proteinmoleküle statt. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß die Membranintegration von D3 durch die stark hydrophoben Domänen D1 und D2 gefördert wird. Folgt dann aber noch in sehr geringem räumlichem Abstand D4, wirken die zusätzlichen polaren Gruppen weiter destabilisierend und die Translokation bleibt ganz aus.

Durch die Anwesenheit von D5, welches drei Cysteine als mögliche H-Brücken-Akzeptoren enthält, scheint die Membranintegration wieder effizienter zu sein. Für das Konstrukt N34T*5PrI konnte nämlich sowohl die extrazelluläre Lage der Schleife zwischen D4 und D5 durch deren Glykosylierbarkeit als auch die zytoplasmatische Position des Endes von D5 durch Protease-Zugänglichkeit des Reporterepitops nachgewiesen werden.

Solche kooperativen Effekte bei der Integration von Transmembrandomänen sind auch an anderen Proteine beobachtet worden. Beim humanen P-Glykoprotein müssen die Domänen TM1 und TM2, sowie TM3 und TM4 jeweils als Paar vorliegen, um stabil in die Lipiddoppelschicht inserieren zu können (Skach und Lingappa, 1993; Skach und Lingappa, 1994). Beim Wasserkanal CHIP-28 kann die Integration erst erfolgen, wenn mindestens die ersten beiden hydrophoben Domänen in der Polypeptidkette vorhanden sind (Skach *et al.*, 1994). Auch für die ersten beiden Membrandomänen der *Neurospora* H⁺-ATPase, welche geladene Reste enthalten, wird eine paarweise Insertion angenommen (Lin und Addison, 1995).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einem Modell, das bereits zu Beginn der achtziger Jahre von ENGELMAN und STEITZ (1981) für die spontane Integration von kleinen Membranproteinen vorgeschlagen wurde. Später wurde dieses „Haarnadelprinzip“ (helical hairpin) allgemein auf die Biosynthese von polytopen Membranproteinen übertragen (Gafvelin und von Heijne, 1994; Popot und Engelman, 1990; Szczesna-Skorupa und Kemper, 1993). Hiernach bilden sich während der Translation zunächst lokale Teilbereiche topologisch korrekt angeordneter Helices aus, welche sich anschließend durch laterale Bewegung in der Lipidschicht zum fertigen Helixbündel arrangieren. Hierbei treten nur noch geringfügige Biege- oder Kippbewegungen auf. Unterstützende Befunde hierzu gibt es aus der detaillierten Analyse der Translationprozesse am ER. BOREL und SIMON (1996) fanden, daß sich mehrere Transmembranhelices des P-Glykoproteins im Kanal des Translokons ansammeln, bevor sie in die Lipidschicht wandern.

Gute Evidenzen gibt es für die Lage von D3 innerhalb der Membran und eine Beteiligung an der Pore. In dieser Arbeit konnten durch cysteinspezifische MTS-Reagenzien mehrere Aminosäurepositionen in der C-terminalen Hälfte dieser Domäne modifiziert werden. Dabei kam es zu einer in der Amplitude positionsabhängigen Stromreduktion mit einem maximalen Effekt bei der am weitesten zentral gelegenen Aminosäure (Mutante L223C, Abschnitt 3.5). Durch den Austausch zu Cystein war bereits vor Reagenzapplikation bei einigen Mutanten (wie L223C) die Schaltkinetik der Kanäle verändert, insbesondere konnte eine verminderte Deaktivierung beobachtet werden. Die Zugänglichkeit dieses Endes von D3 vom Extrazellulärraum belegt, daß diese Domäne zumindest von zytoplasmatischer Seite aus weit in die Membran hineinragt. Eine zu dominanter Myotonie führende Mutation, G230E, auf putativ extrazellulärer Seite von D3 soll zu einer erhöhten Iodidleitfähigkeit und veränderter Rektifizierung bei hCIC-1 führen (Steinmeyer *et al.*, 1994; Fahlke *et al.*, 1997).

Beobachtungen an CIC-0 zeigen ebenfalls die Beteiligung von D3 an der Pore (M. Pusch, persönliche Mitteilung). Mutationen korrespondierend zur hCIC-1-Position 215 in der Mitte von D3 wirken sich auf die Ionenselektivität aus, und einige Positionen weiter C-terminal gibt es Aminosäuren, deren Mutation die Blockierbarkeit des Kanals durch Iodid verändert. In den Chimären, bei denen der Abschnitt D3 bis D4 von hCIC-1 durch die korrespondierende Sequenz von hCIC-5 ausgetauscht wurde, konnte die für hCIC-5 typische Auswärtsrektifizierung auf

hClC-1 übertragen werden, nicht aber dessen erhöhte Iodid-/Nitrat-Leitfähigkeit. Sollte hClC-1 ebenfalls wie ClC-0 (Ludewig *et al.*, 1996) eine Pore pro Polypeptid bilden, so sind sicher mehrere Transmembranabschnitte an deren Auskleidung beteiligt. Bei Natrium-, Kalzium- und *shaker*-artigen Kaliumkanälen sind es vier Haarnadelschleifen und die ligandengesteuerten Ionenkanäle bestehen aus fünf Untereinheiten, die jeweils eine Transmembrandomäne zur Pore beisteuern. Schon aus geometrischen Gründen ist es daher unwahrscheinlich, daß D3, D4 und eventuell D5 allein die Pore bei ClC-Kanälen bilden. Außer den in den hClC-1/hClC-5 Chimären ausgetauschten Aminosäuren müssen noch zusätzliche aus anderen Regionen des Kanals für die erhöhte Iodid-/Nitratleitfähigkeit verantwortlich sein.

Während für D3 kumulative Hinweise dessen wichtige Rolle für die Kanalfunktion andeuten, fehlen derartige Befunde für D4. Obwohl in der vorliegenden Arbeit viele Cystein-Mutationen in diese Domäne eingeführt wurden, resultierten daraus an keiner Stelle besondere Auffälligkeiten in der Kinetik oder der Spannungsabhängigkeit des Kanals. Nur an einer Position (Konstrukt A239C) ergab sich eine moderate Inhibierung durch MTSES. Gleichwohl ist D4 eine unverzichtbare Domäne, denn ihre Deletion resultierte in nichtfunktionellen Kanälen. Mehrere getestete Positionen in D4 ließen sich nicht *in vitro* glykosylieren. Dies spricht aber nicht unbedingt gegen eine extrazelluläre Lage dieser Domäne, da die Zugänglichkeit dieses Bereiches auch aus anderen Gründen behindert sein kann.

Auffällig ist die charakteristische, zwischen ClC-0 und hClC-1 bis hClC-5 konservierte Verteilung von hydrophoben und polaren Aminosäuren. Nimmt man eine α -helikale Sekundärstruktur für D4 an, so ergibt sich eine amphipathische Helix mit einer hydrophilen und einer lipophilen Seite (s. Abschnitt 3.6). Unter den Säugerkanälen weichen hClC-6 und hClC-7, sowie die nierenspezifischen Kanäle hClC-Ka/b von diesem Muster ab. Das Vorliegen einer α -Helix wird allerdings von den verwendeten Strukturvorhersageprogrammen als nicht sehr wahrscheinlich beurteilt. Mit den bislang akkumulierten Daten sind alternative Topologien für die Region um D4 möglich, zwei Varianten sind in Abbildung 66 skizziert.

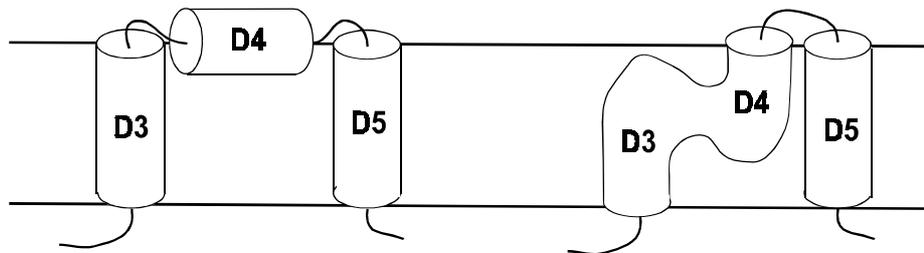


Abb. 66 Alternative Topologien der Region D3 bis D5, die mit den bisherigen Daten vereinbar sind.

4.1.4 Die Region D9-D12 ist eine topologisch selbständige Proteinregion

Bei allen ClC-Proteinen findet sich ein rund 120 Aminosäuren langer hydrophober Bereich, der die Domänen D9 bis D12 umfaßt. Der hydrophile Abschnitt in seiner Mitte ist von variabler Länge und gemäß Glykosylierungsstudie und „Proteinase-Protection-Assay“ zyttoplasmatisch. Die beidseits flankierenden Domänen D9/D10 und D11/D12 sind lang genug, um die Membran in α -helikaler Anordnung zweimal zu durchspannen. Es erschien jedoch zu willkürlich, in diese ununterbrochen hydrophoben Sequenzen weitere Glykosylierungstransplantate oder Prolaktinfusionen einzubauen. Aus Studien an ClC-0 war bekannt, daß die hoch konservierte

Region in der Mitte von D11/D12 das Schalten des Kanals und seine Rektifizierung beeinflussen (M. Pusch, U. Ludewig und T. J. Jentsch, unpublizierte Daten). Dies war Anlaß für die Cysteinsubstitutionen an equivalenter Stelle in hCIC-1. Die Mutante L549C war sensitiv gegenüber MTSES, was die Zugänglichkeit dieser Position vom Extrazellulärraum belegt. Da die Abschnitte vor D11 und hinter D12 zytoplasmatisch sind, muß D11/D12 die Membran zweimal passieren, oder zumindest sehr weit in die Lipiddoppelschicht eintauchen. Der Austausch eines Lysinrestes hinter D12 in der CIC-0-Mutante K519E (Pusch *et al.*, 1995) ergab eine Auswärtsrektifizierung, was mit einer Ladungsumkehr auf zytoplasmatischer Seite der Pore erklärt werden kann. Die intrazelluläre Lage dieses Restes wurde in CIC-0 durch Cysteinaustausch und anschließender Modifikation mit MTS-Reagenzien bestätigt (Middleton *et al.*, 1996).

Für die Domänen D9/D10 existieren wenig Vorinformationen bezüglich einer Porenbeitragsung. Hier liegen die dominante Thomsen-Mutation P480L (Pusch *et al.*, 1995; Steinmeyer *et al.*, 1994) sowie die rezessiven Mutanten G482R (Meyer-Kleine *et al.*, 1995) und M485V (Meyer-Kleine *et al.*, 1995). Die verschobene Potentialabhängigkeit von P480L kann durch indirekte Mechanismen hervorgerufen werden, denn dominante Mutationen kommen auch in anderen Kanalabschnitten vor. Die Mutante G482R ist bislang nicht elektrophysiologisch charakterisiert; nur ihr rezessiver Erbgang ist bekannt.

Aufschlußreich ist allerdings die reduzierte Einzelkanalleitfähigkeit von M485V (Wollnik *et al.*, 1997), denn diese Größe gilt, ebenso wie die Ionenselektivität, als Poreneigenschaft. Aus diesem Grunde wurden die Aminosäuren M485 bis G495 gegen Cystein ausgetauscht und auf ihre MTS-Sensitivität untersucht (s. Abb. 37 in Abschnitt 3.5). Bezeichnenderweise resultiert der Austausch M485C in nichtfunktionellen Kanälen, und auch G491C und G495C ergaben keine Ströme. Zwei weitere Mutanten lagen in der Größe ihrer Stromamplitude kaum über den Wasser-Kontrollen. WT-ähnliche Ströme und eine signifikante Beeinträchtigung der Ionenpermeation durch MTSES-Applikation wurde an drei Positionen gefunden, das waren P486C, V489C und L490C. Daher ist sowohl eine Zugänglichkeit der Aminosäuren vom Extrazellulärraum, als auch eine Beteiligung dieser Region an der Pore wahrscheinlich. Auffallend ist die große Anzahl von Funktionsverlusten durch Cysteinsubstitution in diesem Abschnitt. Im Vergleich dazu gab es bei den 35 Mutanten in den Domänen D3/D4 nur drei Ausfälle. Die wichtige Rolle dieses Bereiches für die Kanalfunktion wird auch durch die große Anzahl konservierter Aminosäuren in D9 und vor allem D10 unterstrichen. Dazu gehören die kleinen Aminosäuren G491 und G495, deren Austausch zum größeren Cystein bereits zum Funktionsverlust führte. Weitere Untersuchungen, insbesondere der N-terminal von M485 gelegenen Positionen sollten sich anschließen.

Wichtige Informationen zum hydrophoben Block D9-D12 ergaben sich aus der Versuchsreihe mit koexprimierten Kanalfragmenten. Die Rekonstitution von Membranproteinen aus künstlichen Fragmenten ist sowohl bei Prokaryonten (Bibi und Kaback, 1990; Zen *et al.*, 1994) als auch bei Eukaryonten beschrieben. So konnte z. B. der adrenerge β_2 -Rezeptor in *Xenopus*-Oozyten in Form zweier getrennter Polypeptide funktionell exprimiert werden, die jeweils die ersten fünf, bzw. die letzten zwei Transmembrandomänen enthielten. (Kobilka *et al.*, 1988). Ähnliche Versuche gelangen mit den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren M2/M3 (Maggio *et al.*, 1993) und dem Anionenaustauscher AE1 (Groves und Tanner, 1995). Die aminoterminale Hälfte von CFTR (inklusive erster Nukleotidbindungs- und regulatorischer Domäne) soll mit sich selber dimerisieren können und eine funktionstüchtigen Chloridkanal bilden (Sheppard *et al.*, 1994). Ein derartig trunkierter CFTR wurde auch *in vivo* in der Niere gefunden (Morales *et al.*, 1996). Diese Befunde spiegeln die Symmetrie der ABC-Transporter wider, obwohl die Sequenzhomologie zwischen der ersten und zweiten Hälfte von CFTR, abgesehen von den NBF-Regionen, nicht sehr groß ist. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit keine CLC-Teilproteine allein funktionell exprimiert werden, wenn Transmembrandomänen fehlten. Der zytoplasmatische N-Terminus konnte jedoch ohne Beeinträchtigung auf 11 Aminosäuren verkürzt werden.

In vielen Membranproteinen sorgen interne topogene Sequenzen für einen korrekten Einbau nachfolgender Abschnitte, auch wenn der normale Translationsstartpunkt fehlt. Die

Membranintegration von α -helikalen Transmembranproteinen stellt man sich nach dem bereits erwähnten „Zwei-Schritt-Modell“ (Popot und Engelman, 1990) so vor, daß zunächst die hydrophoben Domänen in die Lipiddoppelschicht inserieren und dann miteinander wechselwirken, um die native dreidimensionale Struktur einzunehmen. Prinzipiell macht es dann keinen Unterschied, ob es sich um eine *intra*- oder *inter*-molekulare Assoziation handelt, abgesehen von der erhöhten Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens kovalent verbundener Polypeptide.

Die Expression verkürzter Proteine kann jedoch zu Fehlfaltungen führen, wenn eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren notwendig ist, damit der Integrationsprozeß der wachsenden Kette korrekt abläuft. Neu synthetisierte Transmembrandomänen können auf die „Mithilfe“ bereits translaterter Abschnitte angewiesen sein, wie die kooperative Integration der Domänen D3/D4/D5 von hClC-1 und Beispiele aus der Literatur zeigen (s. Abschnitt 4.1.3). Die erfolgreiche Assoziation von Teilproteinen ist ein Hinweis darauf, daß diese strukturell autonome Regionen oder „Module“ darstellen, und ihre Tertiärstruktur nicht zu sehr von der im nativen Protein abweicht. Zusätzlich müssen Kräfte zwischen den Fragmenten vorhanden sein, die die Assoziation trotz fehlender kovalenter Verknüpfung bewirken.

Beispiele für modular aufgebaute Proteine finden sich in verschiedenen Superfamilien: Die spannungsabhängigen Kationenkanäle bestehen aus vier Untereinheiten, welche bei *shaker*-artigen Kaliumkanälen durch separate Polypeptide gebildet werden, bei Natrium- und Kalziumkanälen jedoch verbunden sind. ABC-Transporter können durch ein, zwei oder vier Gene kodiert werden, deren Produkte sich posttranslational zusammenlagern (Higgins, 1992). Hierbei kommen auch Proteine ohne Transmembrandomänen vor, wie beim Ribosetransporter in *E. coli* (Bell *et al.*, 1986) oder dem Histidintransporter in *S. typhimurium* (Higgins *et al.*, 1982).

Bei hClC-1 erwiesen sich in den Koexpressionsversuchen zumindest drei Regionen als strukturell autonom: Der N-terminale Bereich bis D8, das Segment D9-D12 und der zytoplasmatische Teil des Carboxyterminus mit D13, auf den im Abschnitt 4.1.6 eingegangen wird, ergaben zusammen typische hClC-1-Wildtypströme. Es war außerdem möglich, die Mutationen G188A und K585E, die zu einem veränderten Schaltverhalten des Kanals führen, in das jeweils amino- bzw. carboxyterminale Transmembranfragment einzubauen. Der resultierende elektrophysiologische Phänotyp blieb - trotz fehlender kovalenter Verknüpfung zwischen D8 und D9 - erhalten. Die Mutante D136G verhinderte hingegen eine funktionelle Rekonstitution. Möglicherweise ist die negative Ladung an dieser Stelle für eine Interaktion von Transmembrandomänen durch eine „Salzbrücke“ notwendig. Die Störung führt zwar im Kanal voller Länge nicht zum völligen Funktionsverlust, ändert aber bereits drastisch dessen Schalteigenschaften.

Eine „Schnittstelle“ im hydrophoben Verbindungsstück zwischen D10 und D11 (Konstrukte ΔC_{520} und ΔN_{509}) wurde allerdings nicht toleriert. Dies mag zur Mißfaltung der jeweiligen Teilproteine oder zu einer gestörten Assoziation geführt haben. Da die Sekundärstruktur der breiten hydrophoben Region D9-D12 unbekannt ist und Analysealgorithmen Abschnitte von α -Helix, β -Faltblatt und „Knäuel“ vorhersagen, könnte es sein, daß der ganze Bereich als ununterbrochenes Polypeptid vorliegen muß, um sich komplett in die Membran zu integrieren. Ob dies ko- oder posttranslational erfolgt, ist nicht bekannt. Ein Anzeichen dafür, daß hier möglicherweise andere Mechanismen der Topogenese eine Rolle spielen könnten, liefert die erfolgreiche Expression des Konstruktes ΔN_{413} ohne vorangehendes Signalpeptid, wobei offenbar trotzdem der Aminoterminus in den Extrazellulärraum transloziert wurde. Die intrinsische topogene Aktivität dieser Region kann nicht durch Ladungseffekte gemäß „positive-inside“-Regel erklärt werden, da eine Asymmetrie in diesem Bereich nicht vorliegt.

Letztlich kann aber noch keine Aussage zur exakten Topologie der Region D9-D12 in den CLC-Kanälen gemacht werden, außer daß die hydrophilen Verbindungssegmente D8-D9 extrazellulär, sowie D12-D13 intrazellulär liegen und hier mindestens drei Transmembransegmente existieren. Unter Berücksichtigung einer potentiell gestörten Integration von D9/D10 in Abwesenheit von D11/D12 ist die Protease-Zugänglichkeit des Prolaktinepitops im Konstrukt 10Prl, die als zytoplasmatische Lokalisation gedeutet wurde, vorsichtig zu bewerten.

4.1.5 Duplikation von D8 und Teilen von D9-D12

Eine Separation des Kanalproteins war bei hClC-1 auch zwischen den Transmembrandomänen D7 und D8 möglich. Die Koexpression mit den komplementären Fragmenten ΔC_{390} und ΔN_{309} führte zu geringeren Strömen als bei Trennung in der Schleife D8-D9. Das Segment zwischen D7 und D8 ist kürzer als das zwischen D8 und D9 und reich an basischen Aminosäuren. Durch die Überlappung der Konstrukte ΔC_{390} und ΔN_{309} wurden vier davon verdoppelt, so daß die Anhäufung positiver Ladungen möglicherweise die Assoziation oder/und die Kanalfunktion behinderte.

Die tolerierte Duplikation der Domäne D8 im Paar ΔC_{390} und ΔN_{309} legt die Vermutung nahe, daß diese Helix relativ peripher im Kanalprotein lokalisiert ist und leicht in die Lipidschicht verdrängt werden kann. Im Gegensatz dazu führte die Duplikation von D9/D10 nicht zu funktionellen Chloridkanälen. Daraus könnte man auf eine mehr zentrale Lage dieses Abschnitts schließen, was mit der potentiellen Porenbeteiligung, die im vorigen Abschnitt diskutiert wurde, korrespondieren würde.

4.1.6 Intra- und intermolekulare Wechselwirkungen im C-Terminus unter Beteiligung der CBS-Domänen

Während der zytoplasmatische Aminoterminus bei hClC-1 ohne Funktionsverlust weitgehend deletiert werden konnte, trifft dies nicht auf den Carboxyterminus zu, obwohl dessen Länge innerhalb der CLC-Familie zwischen etwa 160 Aminosäuren bei hClC-Ka/b und 480 bei hClC-1 variiert. Konservierte Sequenzen beschränken sich im wesentlichen auf den Bereich von D13 und deuten auf eine wichtige, bislang unbekannte Funktion hin. In den beiden CLC-Proteinen von *E. coli* fehlt D13 hingegen völlig. Bereits kurze C-terminale Trunkationen in hClC-1, wie in der Myotoniemutante R894X (Meyer-Kleine *et al.*, 1995), ergeben in *Xenopus*-Oozyten reduzierte Ströme und in hClC-5 führen Nonsensmutationen in und vor D13 wegen des Funktionsverlusts zu Dent's-Disease (Lloyd *et al.*, 1996; Lloyd *et al.*, 1997). Auch im Konstrukt ΔN_{721} zerstörte die Deletion von D13 die Kanalaktivität völlig, gleichzeitige Expression des fehlenden Sequenzabschnittes als separates Polypeptid erlaubte jedoch die Rekonstitution von Kanälen mit Wildtypeigenschaften. Ähnliche Experimente an ClC-0 (Maduke und Miller, 1997) zeigten, daß auch eine Komplementation durch nachträgliche Injektion des C-Terminus als bakteriell exprimiertes Protein möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Assoziation des Carboxyterminus mit dem in der Membran verankerten aminoterminalen Abschnitt auf die spezifische Wechselwirkung zweier definierter Sequenzabschnitte zurückzuführen ist. Legt man die Trennstelle zwischen den beiden Teilproteinen in den Bereich zwischen D12 und Aminosäureposition 660, so unterbleibt die Komplementation. Das kürzlich von BATEMAN (1997) und PONTING (1997) unabhängig voneinander durch Datenbanksuche entdeckte CBS-Strukturmotiv wurde nach seinem Vorkommen in der Cystathionin- β -synthase benannt. Aufgrund von Röntgenstrukturdaten der Inosinmonophosphatdehydrogenase, welche ebenfalls über eine CBS-Domäne verfügt, konnte die Sekundärstruktur als charakteristische Abfolge von α -Helices und β -Faltblättern identifiziert werden ($\beta\alpha\beta\beta\alpha$). Auch ABC-Transporter und einige Proteinkinasen besitzen dieses Motiv. Eine Funktion konnte der CBS-Domäne aber bislang in keinem der Proteine zugeschrieben werden.

Alle eukaryontischen CLC-Proteine verfügen über zwei CBS-Motive im Carboxyterminus. Die Insertion des Glykosylierungstransplantates in CBS1 (Konstrukt 12T13) führte zum Funktionsverlust des Kanals, und eine funktionelle Rekonstitution aus zwei Kanalfragmenten war nur möglich, wenn beide Teile über eine CBS-Domäne verfügten. Diese Beobachtungen deuteten stark auf eine direkte Wechselwirkung zwischen diesen Motiven hin. Durch Studien mit dem

„Hefe-Zwei-Hybrid-System“ konnte die direkte Interaktion zwischen CBS1 und CBS2 und auch eine homophile Wechselwirkung von CBS2 mit sich selbst nachgewiesen werden. Dabei wurden zahlreiche Fusionsproteine getestet, die neben den CBS-Domänen noch weitere, flankierende Aminosäuren beinhalteten. Es zeigte sich, daß der CBS-Abschnitt allein für die Affinität ausreichend ist. Die heterophile Interaktion zwischen CBS1 und CBS2 könnte erklären, warum die Koexpression der Kanalfragmente ΔC_{597} und ΔN_{598} keine funktionellen Kanäle ergab, denn wenn der membranintegrierte Teil des Kanals über keine CBS-Domäne verfügt, kann er offenbar nicht mit dem C-Terminus assoziieren.

Die Koinjektion, die zur Duplikation von CBS1 führte (Konstrukte ΔC_{720} und ΔN_{598}), resultierte in signifikant kleineren Strömen als die des nicht überlappenden Paares ΔC_{720} und ΔN_{721} . Hierbei mußte CBS1 des membranständigen Fragmentes erst CBS1 im C-Terminus aus dessen Bindung an CBS2 verdrängen.

In einem weiteren Koexpressionsversuch in Oozyten gelang es nicht, das trunkierte Protein ΔC_{720} durch den C-Terminus der nicht leitenden Kanalvariante R496S zu komplementieren. Eine Erklärung könnte sein, daß die intramolekulare CBS1-CBS2-Wechselwirkung zu stark ist, um CBS2 zu erlauben, zu einem benachbarten ΔC_{720} -Molekül zu „schwingen“. Allerdings widerspricht dem die erfolgreiche Komplementation bei der Paarung ΔC_{720} und ΔN_{598} , denn auch hier muß zunächst eine intramolekulare CBS1-CBS2-Bindung gelöst werden.

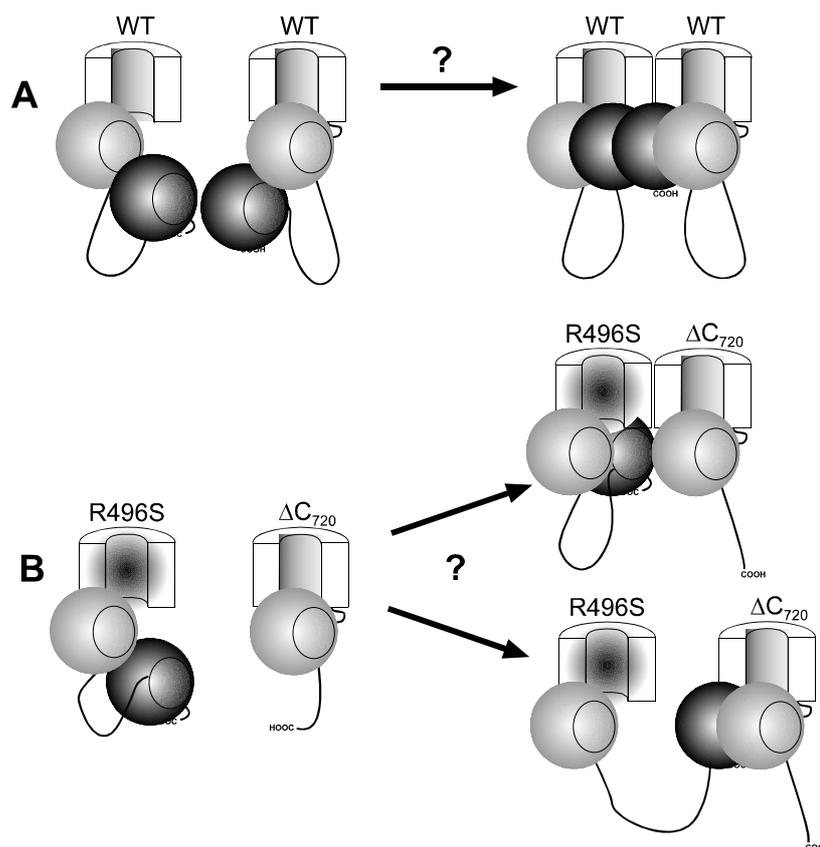


Abb. 1 Hypothetische Vorgänge bei der Bildung funktioneller Kanaloligomere. **A:** Die Assoziation erfordert sowohl die Interaktion zwischen CBS1 und CBS2, als auch CBS2/CBS2-Kontakte zwischen benachbarten Monomeren. **B:** Die CBS2-Domäne kann von der nicht-leitenden Kanalmutante R496S nicht zum trunkierten Kanal hinüberspringen oder die notwendige Assoziation von Monomeren bleibt wegen fehlender CBS2/CBS2-Kontakte aus. Die RS-Mutante ist in Oozyten zwar im Westernblot zu detektieren (K. Steinmeyer, pers. Mitteilung) ergibt aber bei Einzelinjektion keine Ströme.

In Anbetracht der homophilen Affinität von CBS2 zu sich selbst kann aber auch an eine Ankerfunktion zwischen Kanalmonomeren gedacht werden, die für die Bildung funktioneller di/oligomerer Kanäle notwendig sein könnte. In Abb. 67 ist diese Hypothese graphisch dargestellt. Schließlich besteht auch die Möglichkeit, daß die Mutante R496S nicht bis in die Plasmamembran transportiert, sondern vorher degradiert wird.

Eine Überprüfung der gefundenen Wechselwirkungen mit proteinchemischen Methoden steht noch aus. Dies ist notwendig, da das Hefe-Zwei-Hybrid-System in manchen Fällen auch falsch positive Resultate liefert. Auch die negativen Resultate der CBS1/CBS1-Interaktionstests sind kein Beweis für die Abwesenheit von Interaktionen *in vivo*. Weiterhin muß noch gezeigt werden, daß diese Wechselwirkungen auch bei anderen CLC-Kanälen auftreten. Außerdem ergeben sich interessante Möglichkeiten, die Spezifität bei der Bildung heteromerer Kanaloligomere zu untersuchen, die sich nach Koinjektion von CIC-1 und CIC-2 (Lorenz *et al.*, 1996), nicht aber z. B. zwischen CIC-1 und CIC-5 in Oozyten bilden.

Die relativ großen Ströme nach Koinjektion von membranständigem und zytoplasmatischem Fragment hatten zu der Vermutung geführt, daß ein bislang unbekannter Mechanismus zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der beiden Kanalteile führen könnte. Tatsächlich fand sich in unterschiedlichen Zelltypen eine hohe Affinität des Carboxyterminus zur Lipiddoppelschicht, obwohl keine Transmembrandomänen mehr in ihm enthalten sind. Selbst nach Extraktion mit stark alkalischem Carbonatpuffer - eine Prozedur, die periphere Membranproteine ganz und sogar luminale ER-Proteine teilweise entfernt - blieb der Gehalt an Carboxyterminus im Membranpellet weitgehend konstant. Zwar ist die CBS2-Domäne deutlich hydrophob, aber eine kotranslationale Membranintegration ist unwahrscheinlich, da der C-Terminus bei CIC-0 auch als injiziertes lösliches Protein zur Komplementation fähig ist (Maduke und Miller, 1997). Allerdings ist bei Apolipoprotein B eine temporäre Insertion in die luminale Hälfte der Lipiddoppelschicht des ER beobachtet worden (Pease *et al.*, 1991). Dieser Mechanismus scheint der kotranslationalen Stabilisierung dieses großen, sehr hydrophoben Proteins zu dienen, bevor dieses sezerniert wird. Posttranslationale Membraninsertionen sind bei bakteriellen Porinen die Regel, werden aber auch für einige eukaryontische Membranproteine diskutiert (Mueckler und Lodish, 1986; Wiedmann *et al.*, 1988). Eine spezielle Gruppe bilden dabei Proteine mit einem extrem C-terminalen Signalanker und großer N-terminaler Region (Kutay *et al.*, 1993). Hierzu gehören unter anderem die vesikulären SNARE-Proteine, wie Synaptobrevin. Es handelt sich dabei aber offenbar nicht um spontane Insertionen, denn mindestens ein „nicht-klassischer“ Proteinfaktor und ATP werden benötigt (Kutay *et al.*, 1995).

Eine spezifische Anreicherung des C-terminalen Fragmentes an Membranen konnte jedoch durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht nachgewiesen werden. Statt dessen schien es zytoplasmatisch verteilt zu sein, wie auch die Kontrollproteine GFP und β -Galaktosidase. Das auffällige netzartige Muster, das bei mehr als 20% der mit hCIC-1 WT transfizierten COS-7- und HEK293-Zellen auftrat (aber nicht bei Transfektion mit CIC-2 bis -7; W. Günther, S. Brandt, A. Lüchow, pers. Mitteilungen), könnte auch durch eine Verankerung dieses Kanals am Zytoskelett hervorgerufen werden. Diese ist bei einer Reihe anderer Membranproteine bereits nachgewiesen, wie z. B. bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen (Maltsev und Undrovinas, 1997; Srinivasan *et al.*, 1988; Srinivasan *et al.*, 1992; Undrovinas *et al.*, 1995), epithelialen Natriumkanälen (Berdiev *et al.*, 1996; Cantiello, 1995) und NMDA-Rezeptoren (Wyszynski *et al.*, 1997). Der Anionenaustauscher der Erythrozyten ist in dieser Hinsicht besonders gut untersucht. Hier besitzt das Zytoskelett nicht nur die Aufgabe, dieses Protein in der Plasmamembran zu verankern, sondern ist auch für dessen Ausschleusung aus dem ER und die Oligomerisierung notwendig (Casey und Reithmeier, 1991; Gomez und Morgans, 1993; Jons und Drenckhahn, 1992). Ob solche Mechanismen auch für CLC-Kanäle eine Rolle spielen, ist noch zu zeigen.

Menschen eine Häufung dominanter Mutationen auf zytoplasmatischer Seite in den Domänen D5 und D6 zu ergeben, entsprechend dem Exon 8 auf genomischer Ebene. Dies tritt vor allem dann deutlich zutage, wenn die mit mildereren klinischen Symptomen einhergehenden Austausche Q552R (Lehmann-Horn *et al.*, 1995) und I556N (Plassart-Schiess *et al.*, 1997) unberücksichtigt bleiben. Die in dieser Arbeit zum ersten Mal elektrophysiologisch charakterisierten Mutationen befinden sich überwiegend in diesem Bereich. Je ein zusätzlicher Aminosäureaustausch befindet sich in D12 und in der Schleife zwischen D3 und D4.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte der Aminosäureaustausche auf die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit ($p_O(V)$) und deren Auswirkungen bei Koinjektionen entsprechen teilweise dem bereits beschriebenen Muster. So ist z. B. G285E eine typische „loss-of-function“-Mutation mit rezessivem Erbgang, die bei Koinjektion mit WT in Oozyten zwar zu kleineren WT-Stromstärken führt, aber keinen Effekt auf $p_O(V)$ oder die Kinetik hat. Die drei Mutanten V236A, F307S und A313T sind dagegen dominant und bewirken bei Koexpression mit WT eine „intermediäre“ Verschiebung der Spannungsabhängigkeit, wobei allerdings im Falle von F307S der Potentialwert bei halbmaximaler Offenwahrscheinlichkeit $V(p_O=0,5)$ nicht signifikant niedriger ist als bei der Mutante.

Ein bislang noch nicht beschriebenes Verhalten zeigt die Mutante V236L. Injiziert man deren cRNA allein, so ist $p_O(V)$ deutlich positiv verschoben ($V(p_O=0,5) = +9,0$ mV). Bei Koinjektion mit unmutiertem hClC-1 resultieren aber WT-Ströme mit normaler Spannungscharakteristik. In diesem Fall scheint die Verschiebung rezessiv gegenüber der WT-Eigenschaft zu sein. Daß dies je nach „Partner“ variieren kann, zeigt die Koexpression mit der Mutante M485V, die eine entgegengesetzte Spannungsabhängigkeit ($V(p_O=0,5) \leq -150$ mV) besitzt (Wollnik *et al.*, 1997). Nun ist der resultierende Wert näher an der Mutante V236L ($V(p_O=0,5) = -10$ mV) und auch positiver als beim WT ($V(p_O=0,5) = -20$ mV). Für den betroffenen Patienten, der zusammengesetzt heterozygot für diese beiden Mutanten ist (s. 3.11), führt wahrscheinlich das Zusammentreffen der reduzierten Einzelkanalleitfähigkeit von M485V in Verbindung mit der Spannungsverschiebung um rund +30 mV zur Myotonie.

Eine Unsicherheit bei der quantitativen Beurteilung der Daten ergibt sich daraus, daß man zum einen die Stöchiometrie des hClC-1-Oligomers noch nicht zweifelsfrei kennt, zum anderen auch nicht nachprüfen kann, ob die Bildung von heteromeren Kanälen bei Koinjektion der theoretischen Binomialverteilung entspricht, oder sich vielleicht bestimmte Kombinationen bevorzugt bilden. Darüberhinaus gelten die gemachten Aussagen auch nur für das Oozyten-Expressionssystem und eine direkte Übertragbarkeit auf die Situation im menschlichen Skelettmuskel ist nicht *a priori* gegeben.

Die klinische Variabilität von Krankheiten, die durch defekte Ionenkanäle hervorgerufen werden, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen spielt die Mutation und ihre jeweilige Auswirkung auf die Kanaleigenschaften eine Rolle. Aber auch Patienten mit dem gleichen Aminosäureaustausch zeigen zum Teil unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome. Man spricht dann oft vom modifizierenden Einfluß des genetischen Hintergrundes. Bei der hyperkalämischen periodischen Paralyse (HyperPP), bei welcher Defekte im spannungsabhängigen Natriumkanal auslösend sind, konnte gezeigt werden, daß sich die Mengen an gebildeter mRNA zwischen Mutante und Wildtyp unterscheiden und deren Verhältnis patientenabhängig variiert (Zhou *et al.*, 1994).

Im Fall der hClC-1-Mutante I556N scheint die „Dominanz“ der Spannungsverschiebung bei Koexpression mit WT nur schwach ausgeprägt zu sein. Dies korrespondiert mit dem beschriebenen milden klinischen Phänotyp bei heterozygoten Patienten (Plassart-Schiess *et al.*, 1997). Aber in Koinjektionen von I556V mit V236L ist der resultierende Wert für $V(p_O=0,5)$ signifikant größer als die Werte beider einzelner Mutanten. Dies ist der erste bei hClC-1 beschriebene Fall, bei dem es nicht zu einem intermediären, sondern zu einem partiell additiven Effekt beim Zusammentreffen zweier Mutanten kommt.

Die klinische Klassifikation der CLC-Kanal-Myotonien in den rezessiven Becker- und den dominanten Thomsentyp wird aufgrund des Erbgangs vorgenommen. Tatsächlich findet man aber

eine gewisse Bandbreite in der Symptomatik. Dies führte unter anderem zur Bezeichnung *Myotonia levior* für eine milde Myotonieform (DeJong, 1966), die sich z.B. im Falle des Austausches Q552R (Iaizzo *et al.*, 1991) ebenfalls als CLC-Kanaldefekt erwies (Lehmann-Horn *et al.*, 1995). Verschiedene Autoren sprechen von „geringer klinischer Expressivität“ einer dominanten Myotonie (DeJong, 1966), bzw. von einer rezessiven Myotonie mit milden Symptomen in heterozygoten Trägern (Becker, 1979).

Auch die in kanadischen Familien gefundene Mutation G230E (George *et al.*, 1993) ruft eine Myotonie mit abgeschwächter Symptomatik hervor. In *Xenopus*-Oozyten ergab Einzelinjektion keine Ströme, Koinjektion mit Wildtyp eine Reduktion der Amplitude und veränderte Kinetik (Steinmeyer *et al.*, 1994). In menschlichen HEK293-Zellen scheint auch das G230E-Homomer Ströme zu leiten, wobei Ionenselektivität, Spannungsabhängigkeit und Rektifizierung verändert sein sollen (Fahlke *et al.*, 1997).

Ein Modell von hCIC-1 mit mehr als zwei Untereinheiten erklärt die geringere „Dominanz“ von G230E damit, daß ein einzelnes mutiertes Monomer zunächst zu veränderten Strömen führt, zwei und mehr aber in völligem Funktionsverlust des Kanals resultieren (Steinmeyer *et al.*, 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Mutanten mit veränderter Potentialabhängigkeit weisen ebenfalls eine variable Ausprägung des „dominanten Effekts“ auf. Dabei reicht das Spektrum von völlig „normalen“ Strömen bei Koexpression von V236L mit WT, über intermediäre Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit (V286A + WT) bis hin zur partiellen Summation der Einzeleffekte bei V236L + I556N. Die ursprünglichen, strikten Grenzen zwischen rezessiven und dominanten CLC-Myotonieformen scheinen - sowohl aus elektrophysiologischer wie genetischer Sicht - mehr und mehr zu verschwimmen.

Auch bei anderen Ionenkanälen gibt es dominante Mutationen, die sich auf das spannungsabhängige Öffnen auswirken. Aminosäureaustausche im HERG K⁺-Kanal sind eine der Ursachen für das „Long QT“-Syndrom (LQT), bei dem die Repolarisierung des Herzmuskels gestört ist und das zu Arrhythmien und Kammerflimmern mit tödlichem Ausgang führen kann (Curran *et al.*, 1995). Die Mutation G628S in der Porenregion führt dort bei Koinjektion mit Wildtyp zu nichtleitenden Kanälen. A561V im Transmembransegment S5 ist zwar als Homooligomer nicht funktionell, heteromere Kanäle leiten Ströme, jedoch mit um rund -10mV verschobener Spannungscharakteristik gemessen an $V_{(p_0=0,5)}$. Die Mutante N470D (S2-Segment) hat bei Einzelinjektion in *Xenopus*-Oozyten eine gegenüber WT um -20mV verschobene halbmaximale Aktivierung, jedoch bei Koexpression mit WT ist kein Unterschied zu WT-Homomeren bezüglich $V_{(p_0=0,5)}$ zu erkennen; die Stromamplitude war allerdings geringer (Sanguinetti *et al.*, 1996). Dies ähnelt stark der Situation bei der beschriebenen hCIC-1-Mutante V236L.

Der partiell additive Effekt bei Koexpression von V236L und I556N erinnert an vergleichbare Befunde beim *C. elegans*-Gen *egl-36*, welches für einen Kaliumkanal vom *shaw*-Typ (K_V3) kodiert (Johnstone *et al.*, 1997). Dessen Mutante E142K im Aminoterminus verschiebt $V_{(p_0=0,5)}$ um etwa -35mV und P439S im Transmembransegment S6 um rund -50mV gegenüber dem Wildtyp. Bei Koinjektion beider Mutanten in Oozyten resultiert eine noch stärkere Verschiebung um -68mV.

Die Erklärung für das additive Verhalten der Mutationen fällt bei den Kaliumkanälen leicht, da sie aus vier Untereinheiten bestehen, die gemeinsam eine Pore bilden. Erst wenn alle beteiligten Monomere in die „Offen-Konformation“ übergegangen sind, leitet der Kanal.

Beim Chloridkanal CIC-0 ist jedoch gezeigt worden, daß je ein Protein des Dimers eine eigene Pore bildet (Ludewig *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 1996). Für hCIC-1 werden sowohl Dimere (Fahlke *et al.*, 1997) als auch Tetramere diskutiert (Steinmeyer *et al.*, 1994). Auch das erste Modell könnte allerdings mit dem additiven Effekt im Einklang stehen. In Dimeren mit separaten Poren gibt es offenbar Regulationsmechanismen, die auf beide Untereinheiten gleichzeitig wirken. Die langsame Schaltkomponente („slow gate“) von CIC-0 ist ein Beispiel dafür (Ludewig *et al.*, 1997).

Weitere Experimente zur Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Kanaluntereinheiten sind notwendig, um z. B. die beobachteten Effekte auf die Spannungsabhängigkeit oder das gemeinsame Schalten von Protoporen erklären zu können. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene experimentelle Absicherung der CLC-Kanaltopologie wird die Planung zukünftiger Versuche erleichtern. Obwohl die praktischen Studien exemplarisch an hClC-1 durchgeführt wurden, spricht die Homologie innerhalb der CLC-Familie - insbesondere in den Transmembranregionen - sowie die Übereinstimmung des Modells mit zahlreichen Einzelbefunden von anderen CLC-Kanälen für dessen allgemeine Gültigkeit.

4.3 Ausblick

Auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die dreidimensionale Struktur der ClC-Kanäle noch nicht völlig geklärt. Insbesondere die Region um die hydrophobe Domäne D4 und der „Block“ D9 bis D12 erfordern eine weitere Verfeinerung des gegenwärtigen Modells.

Zur Klärung der Frage, ob D4 komplett extrazellulär liegt, oder partiell in die Membran eintaucht, könnten die Cystein-Austauschmutanten verwendet werden, die für diese Region bereits vorhanden sind. Außer in D4 existieren nach der aktuellen Topologie in hClC-1 keine Cysteine in extrazellulären Schleifen, so daß eine chemische Modifikation, z. B. mit einem Biotin-MTS-Reagenz im Westernblot mit Streptavidin oder anti-Biotin-Antikörpern nachweisbar sein sollte.

Die Topologie der D9/D10-Region kann durch eine Fortsetzung des „Cysteinscannings“ ebenfalls genauer untersucht werden, da offenbar auch dieser Proteinabschnitt an der Ionenpermeation beteiligt ist. Unter Verwendung der „Patch-Clamp“-Technik ist die Applikation der MTS-Reagenzien auch von der intrazellulären Membranseite möglich („inside out patch“-Konfiguration). Falls die Polypeptidkette in den Domänen D9/D10 einen S-förmigen Verlauf durch die Lipiddoppelschicht besitzt, könnten unter Umständen die Umkehrpunkte aufgrund der MTS-Zugänglichkeit identifiziert werden.

Die weitergehende Eingrenzung der Porenregion wird die Fortsetzung der Experimente mit chimären Kanälen zwischen hClC-1 einerseits und hClC-5 bzw. hClC-3 andererseits beinhalten. Mit dem bisherigen, D3 und D4 umfassenden Transplantat war zwar die porenintrinsic Gleichrichtung, nicht aber die erhöhte Iodid/Nitrat-Leitfähigkeit von hClC-5 übertragen worden. Es ist zu überprüfen, ob dies durch Einbeziehen von D5 oder der zusätzlichen Region D9-D12 in die Chimäre gelingt.

Der Carboxyterminus von hClC-1 im Konstrukt ΔN_{721} zeichnete sich durch eine auffällige Membranaffinität aus. Durch weitere Verkürzung des Polypeptids sollte es möglich sein, die dafür verantwortliche Aminosäuresequenz zu identifizieren und den Effekt gegebenenfalls durch geeignete Punktmutanten zu unterbinden.

Die bislang nur für hClC-1 gezeigte spezifische Interaktion zwischen den beiden CBS-Domänen muß zunächst mittels weiterer, biochemischer Experimente abgesichert werden. Dafür ist sowohl die Methode des Ligandenblots („Westernblot-Overlay“) als auch ein affinitätschromatographischer Ansatz geplant. Voraussetzung für beide ist die Herstellung und Isolierung größerer Proteinmengen durch heterologe Expression der CBS-Domänen in Bakterien. Weiterhin stellt sich die Frage, ob diese Wechselwirkung auch bei anderen CLC-Kanälen auftritt. Heteromere mit neuen Eigenschaften bilden sich aus ClC-1 und ClC-2 (Lorenz *et al.* 1996), nicht aber aus ClC-1 und ClC-5. Die Spezifität der Interaktion könnte in den CBS-Domänen verankert sein.

Außer Wechselwirkungen zwischen CLC-Proteinen sind auch solche zu anderen Zellbestandteilen denkbar. Die Aktivierung von ClC-2 durch Zellschwellung ist möglicherweise auf Interaktionen mit Cytoskelettbestandteilen zurückzuführen, und die Identifizierung zusätzlicher akzessorischer Untereinheiten, wie sie bei anderen Kanalfamilien vorkommen, könnte für die bisher nicht

gelungene funktionelle Expression von CLC-6/7 und CLC-Ka/b wichtig sein. Daher ist geplant, cDNA-Bibliotheken mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System unter Verwendung von CBS-Domänen als Köder zu durchmustern.

Die detaillierte Untersuchung der Interaktionen zwischen CLC-Kanalmonomeren ist ein weiteres wichtiges Projekt, das letztendlich zur Erklärung der gegenseitigen Beeinflussung von Schaltkinetik und Spannungsabhängigkeit führen wird. Neben der Eingrenzung möglicher „Kontaktflächen“ zwischen Monomeren wäre es auch aufschlußreich, herauszufinden, in welchem Stadium der Biosynthese eine Assoziation von Untereinheiten stattfindet und ob dieses einen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung und den Transport von CLC-Kanälen hat.

5 Literaturverzeichnis

- Adachi, S., Uchida, S., Ito, H., Hata, M., Hiroe, M., Marumo, F. und 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.
- Adams, G. A. und Rose, J. K. (1985). Structural requirements of a membrane-spanning domain for protein anchoring and cell surface transport. *Cell* 41, 1007-1015.
- Adelman, J. P. (1995). Proteins that interact with the pore-forming subunits of voltage-gated ion channels. *Current Opinion In Neurobiology* 5, 286-295.
- Aidley, D. J. und Stanfield, P. R. (1996). *Ion Channels: molecules in action*. Cambridge University Press.
- Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M. und Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine- substitution mutants. *Science* 258, 307-310.
- al-Awqati, Q. (1995). Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP [comment]. *Science* 269, 805-806.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1991). *Molecular biology of the cell*. New York, London: Garland Publishing, Inc..
- Alvarez-Leefmans, F. L. (1990). Methods for measuring chloride transport across nerve, muscle and glial cells. In: *Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glial cells.*, F. L. Alvarez-Leefmans and J. M. Russel, eds. New York: Plenum Press, 3-66.
- Anand, R., Bason, L., Saedi, M. S., Gerzanich, V., Peng, X. und Lindstrom, J. (1993). Reporter epitopes: a novel approach to examine transmembrane topology of integral membrane proteins applied to the alpha 1 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 32, 9975-9984.
- Andersson, H., Bakker, E. und von Heijne, G. (1992). Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 1491-1495.
- Audigier, Y., Friedlander, M. und Blobel, G. (1987). Multiple topogenic sequences in bovine opsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5783-5787.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. D., Smith, J. A. und Struhl, K. (1993). . In: *Current protocols in molecular biology*. New York: J. Wiley & Sons, 13.0.1-13.13.9.

- Baenziger, J. E. und Methot, N. (1995). Fourier transform infrared and hydrogen/deuterium exchange reveal an exchange-resistant core of alpha-helical peptide hydrogens in the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 29129-29137.
- Barchi, R. L. (1975). Myotonia. An evaluation of the chloride hypothesis. *Arch Neurol* 32, 175-180.
- Barnard, E. A., Darlison, M. G. und Seeburg, P. (1987). Molecular biology of the GABA_A receptor: the receptor/channel subfamily. *Trends Neurosci.* 10, 502-509.
- Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* 22, 12-13.
- Beck, C. L., Fahlke, C. und George, A. L., Jr. (1996). Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11248-11252.
- Becker, P. E. (1979). Heterozygote manifestation in recessive generalized myotonia. *Hum. Genet.* 46, 325-329.
- Beja, O. und Bibi, E. (1995). Multidrug resistance protein (Mdr)-alkaline phosphatase hybrids in *Escherichia coli* suggest a major revision in the topology of the C-terminal half of Mdr. *J. Biol. Chem.* 270, 12351-12354.
- Bell, A. W., Buckel, S. D., Groarke, J. M., Hope, J. N., Kingsley, D. H. und Hermodson, M. A. (1986). The nucleotide sequences of the rbsD, rbsA, and rbsC genes of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 261, 7652-7658.
- Beltzer, J. P., Fiedler, K., Fuhrer, C., Geffen, I., Handschin, C., Wessels, H. P. und Spiess, M. (1991). Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 266, 973-978.
- Bennett, J. A. und Dingledine, R. (1995). Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14, 373-384.
- Berdiev, B. K., Prat, A. G., Cantiello, H. F., Ausiello, D. A., Fuller, C. M., Jovov, B., Benos, D. J. und Ismailov, II (1996). Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *J. Biol. Chem.* 271, 17704-17710.
- Besancon, M., Shin, J. M., Mercier, F., Munson, K., Miller, M., Hersey, S. und Sachs, G. (1993). Membrane topology and omeprazole labeling of the gastric H⁺,K⁺-adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 32, 2345-2355.
- Betz, H. (1992). Structure and function of inhibitory glycine receptors. *Q. Rev. Biophys.* 25, 381-394.
- Bibi, E. und Beja, O. (1991). Membrane topology of multidrug resistance protein expressed in *Escherichia coli*. N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 269, 19910-19915.

- Bibi, E. und Kaback, H. R. (1990). In vivo expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4325-4329.
- Bibi, E., Verner, G., Chang, C. Y. und Kaback, H. R. (1991). Organization and stability of a polytopic membrane protein: deletion analysis of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7271-7275.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blanton, M. P. und Cohen, J. B. (1994). Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* 33, 2859-2872.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1496-500.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67, 835-851.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975). Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* 67, 852-862.
- Blobel, G., Walter, P., Chang, C. N., Goldman, B. M., Erickson, A. H. und Lingappa, V. R. (1979). Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 33, 9-36.
- Bogusz, S. und Basath, D. D. (1992). Is a β -barrel model of the K^+ channel energetically feasible? *Biophys. J.* 62, 19.
- Bogusz, S., Boxer, A. und Basath, D. D. (1992). An SS1-SS2 β -barrel structure for the voltage-activated potassium channel. *Prot. Engin.* 5, 285.
- Borel, A. C. und Simon, S. M. (1996). Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. *Cell* 85, 379-389.
- Borel, A. C. und Simon, S. M. (1996). Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments of P- glycoprotein sequentially translocate to span the ER membrane. *Biochemistry* 35, 10587-10594.
- Borsani, G., Rugarli, E. I., Tagliatela, M., Wong, C. und Ballabio, A. (1995). Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics* 27, 131-141.
- Boyd, D. (1994). Folding and assembly of integral membrane proteins. In: *Membrane protein structure*, S. H. White, ed. New York, Oxford: Oxford University Press.

- Boyd, D. und Beckwith, J. (1990). The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell* 62, 1031-1033.
- Boyd, D., Traxler, B., Jander, G., Prinz, W. und Beckwith, J. (1993). Gene fusion approaches to membrane protein topology. *Soc Gen. Physiol Ser* 48, 23-37.
- Brandt, S. und 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. und Conte-Camerino, D. (1991). Chloride channel regulation in the skeletal muscle of normal and myotonic goats. *Pflügers Arch.* 417, 605-610.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-blue - a high efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Cafiso, D. S. (1994). Experimental determination of the topography of membrane proteins. In: *Membrane protein structure*, S. H. White, ed. New York, Oxford: Oxford University Press.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463-467.
- Canfield, V. A. und Levenson, R. (1993). Transmembrane organization of the Na,K-ATPase determined by epitope addition. *Biochemistry* 32, 13782-13786.
- Cantiello, H. F. (1997). Nucleotide transport through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biosci. Rep.* 17, 147-171.
- Cantiello, H. F. (1995). Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na⁺ channel regulation. *Kidney Int.* 48, 970-984.
- Casey, J. R. und Reithmeier, R. A. (1991). Analysis of the oligomeric state of Band 3, the anion transport protein of the human erythrocyte membrane, by size exclusion high performance liquid chromatography. Oligomeric stability and origin of heterogeneity. *J. Biol. Chem.* 266, 15726-15737.
- Chang, X. B., Hou, Y. X., Jensen, T. J. und Riordan, J. R. (1994). Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J. Biol. Chem.* 269, 18572-18575.
- Chavez, R. A. und Hall, Z. W. (1992). Expression of fusion proteins of the nicotinic acetylcholine receptor from mammalian muscle identifies the membrane-spanning regions in the alpha and delta subunits. *J. Cell Biol* 116, 385-393.
- Chavez, R. A. und Hall, Z. W. (1991). The transmembrane topology of the amino terminus of the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 15532-15538.

- Chen, H. und Kendall, D. A. (1995). Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J. Biol. Chem.* 270, 14115-14122.
- Chen, W., Helenius, J., Braakman, I. und Helenius, A. (1995). Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6229-6233.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L. und Ben-Ari, Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 14, 515-519.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. und Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Clark, J. A. (1997). Analysis of the transmembrane topology and membrane assembly of the GAT-1 gamma-aminobutyric acid transporter. *J. Biol. Chem.* 272, 14695-14704.
- Cole, K. S. (1979). Mostly Membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 1-24.
- Colman, A. (1984). Transcription and Translation. In: *Transcription and Translation*, B. D. Hames and S. Y. Higgins, eds.; Oxford: IRL.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. und Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795-803.
- Davis, N. G. und Model, P. (1985). An artificial anchor domain: hydrophobicity suffices to stop transfer. *Cell* 41, 607-614.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. und Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* 318, 618-624.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. und Michel, H. (1984). X-ray structure of a membrane -protein complex: electron-density map at 3Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.* 180, 385-398.
- DeJong, J. G. Y. (1966). . In: *Progressive Muskeldystrophie - Myotonie - Myasthenie.*, E. Kuhn, ed.; Heidelberg: Springer, 255-259.
- Denzer, A. J., Nabholz, C. E. und Spiess, M. (1995). Transmembrane orientation of signal-anchor proteins is affected by the folding state but not the size of the N-terminal domain. *Embo J.* 14, 6311-6317.
- Devidas, S. und Guggino, W. B. (1997). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and ATP. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 547-552.

- Dierks, T., Volkmer, J., Schlenstedt, G., Jung, C., Sandholzer, U., Zachmann, K., Schlotterhose, P., Neifer, K., Schmidt, B. und Zimmermann, R. (1996). A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Embo J.* 15, 6931-6942.
- Ehrmann, M., Boyd, D. und Beckwith, J. (1990). Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7574-7578.
- Elkeles, A., Devos, K. M., Graur, D., Zizi, M. und Breiman, A. (1995). Multiple cDNAs of wheat voltage-dependent anion channels (VDAC): isolation, differential expression, mapping and evolution. *Plant Mol. Biol.* 29, 109-124.
- Engelman, D. M. und Steitz, T. A. (1981). The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* 23, 411-422.
- Engelman, D. M., Steitz, T. A. und Goldman, A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15, 321-353.
- Fahlke, C., Beck, C. L. und George, A. L., Jr. (1997). A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2729-2734.
- Fahlke, C., Knittel, T., Gurnett, C. A., Campbell, K. P. und George, A. L. (1997). Subunit stoichiometry of human muscle chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 109, 93-104.
- Fahlke, C., Ruedel, R., Mitrovic, N., Zhou, M. und George, A. L., Jr. (1995). An aspartic acid residue important for voltage-dependent gating of human muscle chloride channels. *Neuron* 15, 463-472.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fisher, S. E., van Bakel, I., Lloyd, S. E., Pearce, S. H., Thakker, R. V. und Craig, I. W. (1995). Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Genomics* 29, 598-606.
- Friedlander, M. und Blobel, G. (1985). Bovine opsin has more than one signal sequence. *Nature* 318, 338-343.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S. und Lazarow, P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93, 97-102.
- Fujita, N., Mori, H., Yura, T. und Ishihama, A. (1994). Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 2.4-4.1 min (110,917-193,643 bp) region. *Nucl. Acids Res.* 22, 1637-1639.

- Gafvelin, G., Sakaguchi, M., Andersson, H. und von Heijne, G. (1997). Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 6119-6127.
- Gafvelin, G. und von Heijne, G. (1994). Topological "frustration" in multispinning E. coli inner membrane proteins. *Cell* *77*, 401-412.
- Gavel, Y. und von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X- Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* *3*, 433-442.
- Geller, D., Taglicht, D., Edgar, R., Tam, A., Pines, O., Michaelis, S. und Bibi, E. (1996). Comparative topology studies in *Saccharomyces cerevisiae* and in *Escherichia coli*. The N-terminal half of the yeast ABC protein Ste6. *J. Biol. Chem.* *271*, 13746-13753.
- George, A. L., Crackower, M. A., Abdalla, J. A., Hudson, A. J. und Ebers, G. C. (1993). Molecular basis of Thompson's disease (autosomal dominant myotonia congenita). *Nature Genetics* *3*, 305-309.
- Gill, D. R., Hyde, S. C., Higgins, C. F., Valverde, M. A., Mintenig, G. M. und Sepulveda, F. V. (1992). Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell* *71*, 23-32.
- Gomez, S. und Morgans, C. (1993). Interaction between band 3 and ankyrin begins in early compartments of the secretory pathway and is essential for band 3 processing. *J. Biol. Chem.* *268*, 19593-19597.
- Gorne-Tschelnokow, U., Strecker, A., Kaduk, C., Naumann, D. und Hucho, F. (1994). The transmembrane domains of the nicotinic acetylcholine receptor contain alpha-helical and beta structures. *Embo J.* *13*, 338-341.
- Greene, J. R., Brown, N. H., DiDomenico, B. J., Kaplan, J. und Eide, D. J. (1993). The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron- limited growth. *Mol. Gen. Genet.* *241*, 542-53.
- Groves, J. D. und Tanner, M. J. (1995). Co-expressed complementary fragments of the human red cell anion exchanger (band 3, AE1) generate stilbene disulfonate-sensitive anion transport. *J. Biol. Chem.* *270*, 9097-9105.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* *360*, 759-762.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J. (1993). The p21Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* *75*, 805-816.

- Hartmann, E., Rapoport, T. A. und Lodish, H. F. (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5786-5790.
- Hechenberger, M., Schwappach, B., Fischer, W. N., Frommer, W. B., Jentsch, T. J. und Steinmeyer, K. (1996). A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a ClC gene disruption. *J. Biol. Chem.* 271, 33632-33638.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E. und Downing, K. H. (1990). Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 257, 28.
- Henderson, R. und Unwin, P. N. T. (1975). Three dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257, 28.
- Henn, D. K., Baumann, A. und Kaupp, U. B. (1995). Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7425-7429.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review Of Cell Biology* 113, 67-137.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review Of Cell Biology* 113, 67-113.
- Higgins, C. F., Haag, P. D., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G. und Ames, G. F. (1982). Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* 298, 723-727.
- High, S. und Dobberstein, B. (1992). Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 581-586.
- High, S. und Dobberstein, B. (1992). Membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum: signals, machinery and mechanisms. In: *Membrane biogenesis and protein targeting*, W. Neupert and R. Lill, eds.: Elsevier Science Publishers B.V., 105-118.
- High, S., Flint, N. und Dobberstein, B. (1991). Requirements for the membrane insertion of signal-anchor type proteins. *J. Cell Biol.* 113, 25-34.
- Higuchi, R. (1990). Recombinant PCR. In: *PCR Protocols*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sinnsky and T. J. White, eds. San Diego: Harcourt Brace Jovanovich, 177-183.
- Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V. und Hebert, S. C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362, 31-38.
- Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116, 449-472.

- Hollmann, M., Maron, C. und Heinemann, S. (1994). N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13, 1331-1343.
- Howell, K. E. und Palade, G. E. (1982). Hepatic Golgi fractions resolved into membrane and content subfractions. *J. Cell Biol.* 92, 822-832.
- Hresko, R. C., Kruse, M., Strube, M. und Mueckler, M. (1994). Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 20482-20488.
- Hucho, F., Goerne-Tschelnokow, U. und Strecker, A. (1994). Beta-structure in the membrane-spanning part of the nicotinic acetylcholine receptor (or how helical are transmembrane helices?). *Trends Biochem. Sci.* 19, 383-387.
- Iaizzo, P. A., Franke, C., Hatt, H., Spittelmeister, W., Ricker, K., Rudel, R. und Lehmann-Horn, F. (1991). Altered sodium channel behaviour causes myotonia in dominantly inherited myotonia congenita. *Neuromusc. Disord.* 1, 47-53.
- Imperiali, B. und Rickert, K. W. (1995). Conformational implications of asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 97-101.
- Ismailov, II, Awayda, M. S., Jovov, B., Berdiev, B. K., Fuller, C. M., Dedman, J. R., Kaetzel, M. und Benos, D. J. (1996). Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 271, 4725-4732.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S. und Catterall, W. A. (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* 12, 1183-1194.
- Jentsch, T. J. (1996). Chloride channels: a molecular perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 303-310.
- Jentsch, T. J., Steinmeyer, K. und Schwarz, G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes (see comments). *Nature* 348, 510-514.
- Johnstone, D. B., Wei, A., Butler, A., Salkoff, L. und Thomas, J. H. (1997). Behavioral defects in *C. elegans* egl-36 mutants result from potassium channels shifted in voltage-dependence of activation. *Neuron* 19, 151-164.
- Jons, T. und Drenckhahn, D. (1992). Identification of the binding interface involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion exchanger. *Embo J.* 11, 2863-2867.
- Jordt, S. E. und Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the CLC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16, 1582-1592.
- Kamb, A., Iverson, L. E. und Tanouye, M. A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50, 405-413.

- Karle, I. L. (1994). Diffraction studies of model and natural helical peptides. In: Membrane protein structure, S. H. White, ed. New York, Oxford: Oxford University Press, 355-381.
- Kawasaki, M., Suzuki, M., Uchida, S., Sasaki, S. und Marumo, F. (1995). Stable and functional expression of the CIC-3 chloride channel in somatic cell lines. *Neuron* 14, 1285-91.
- Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Marumo, F. und 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.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K. und Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.
- Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A. und Jentsch, T. J. (1994). Two highly homologous members of the CIC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6943-6947.
- Klocke, R., Steinmeyer, K., Jentsch, T. J. und Jockusch, H. (1994). Role of innervation, excitability, and myogenic factors in the expression of the muscular chloride channel CIC-1. A study on normal and myotonic muscle. *J. Biol. Chem.* 269, 27635-27639.
- Kobilka, B. K., Kobilka, T. S., Daniel, K., Regan, J. W., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1988). Chimeric alpha 2-,beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science* 240, 1310-1316.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 12, 7057-7070.
- Kühlbrandt, W. und Wang, D. N. (1991). Three dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron cristallography. *Nature* 350, 130.
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N. und Fujiyoshi, Y. (1994). Atomoc model of light-harvesting complex by electron cristallography. *Nature* 367, 614.
- Kuroiwa, T., Sakaguchi, M., Mihara, K. und Omura, T. (1991). Systematic analysis of stop-transfer sequence for microsomal membrane. *J. Biol. Chem.* 266, 9251-9255.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B. und Rapoport, T. A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *Embo J.* 14, 217-223.
- Kutay, U., Hartmann, E. und Rappoport, T. A. (1993). A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol.* 3, 72-75.
- Kwiecinski, H., Lehmann-Horn, F. und Rudel, R. (1988). Drug-induced myotonia in human intercostal muscle. *Muscle Nerve* 11, 576-581.

- Kyte, J. und 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.
- Landolt-Marticorena, C. und Reithmeier, R. A. (1994). Asparagine-linked oligosaccharides are localized to single extracytosolic segments in multi-span membrane glycoproteins. *Biochem J.* 302, 253-260.
- Langosch, D., Thomas, L. und Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7394-7398.
- Lehmann-Horn, F., Mailander, V., Heine, R. und George, A. L. (1995). Myotonia levior is a chloride channel disorder. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1397-1402.
- Leon, D. A., Herberg, F. W., Banky, P., and Taylor, S. S. (1997). A stable alpha-helical domain at the N terminus of the RIalpha subunits of cAMP-dependent protein kinase is a novel Dimerization/Docking motif. *J. Biol. Chem.* 272, 28431-28437.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. und Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo J.* 15, 1004-1011.
- Lin, J. und Addison, R. (1995). A novel integration signal that is composed of two transmembrane segments is required to integrate the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase into microsomes. *J. Biol. Chem.* 270, 6935-6941.
- Lin, J. und Addison, R. (1994). Topology of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. Localization of a transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* 269, 3887-3890.
- Lingappa, V. R. (1991). Control of protein topology at the endoplasmic reticulum. *Cell Biophysics* 19, 1-15.
- Lipp, J., Flint, N., Haeuptle, M. T. und Dobberstein, B. (1989). Structural requirements for membrane assembly of proteins spanning the membrane several times. *J. Cell Biol.* 109, 2013-2022.
- 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. und Thakker, R. V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379, 445-449.
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H. S., Günther, W., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Jentsch, T. J. und Thakker, R. V. (1997). Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5). *J. Clin. Invest.* 99, 967-974.

- Loo, T. W. und Clarke, D. M. (1995). Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270, 843-848.
- Lorenz, C., Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Koch, M. C. und Jentsch, T. J. (1994). Genomic organization of the human muscle chloride channel CIC-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum. Mol. Genet.* 3, 941-946.
- Lorenz, C., Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1996). Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13362-13366.
- Lü, Q. und Miller, C. (1995). Silver as a probe for pore forming residues in a potassium channel. *Science* 268, 304-307.
- Ludewig, U., Jentsch, T. J. und Pusch, M. (1997). Inward rectification in CIC-0 chloride channels caused by mutations in several protein regions. *J. Gen. Physiol* 110, 165-171.
- Ludewig, U., Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1997). Independent gating of single pores in CLC-0 chloride channels. *Biophys. J.* 73, 789-797.
- Ludewig, U., Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. *Nature* 383, 340-343.
- Lukacs, G. L., Chang, X. B., Bear, C., Kartner, N., Mohamed, A., Riordan, J. R. und Grinstein, S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J. Biol. Chem.* 268, 21592-2158.
- Maduke, M. und Miller, C. (1997). A quest for a soluble domain of an ion channel. *Biophys. J.* 72 Part 2, A5.
- Maggio, R., Vogel, Z. und Wess, J. (1993). Reconstitution of functional muscarinic receptors by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *FEBS Lett.* 319, 195-200.
- Maltsev, V. A. und Undrovinas, A. I. (1997). Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel. *Am. J. Physiol* 273, H1832-H1840.
- Manoil, C. (1991). Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and beta-galactosidase gene fusions. *Methods Cell Biol.* 34, 61-75.
- Martoglio, B., Hofmann, M. W., Brunner, J. und Dobberstein, B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81, 207-214.
- McGovern, K., Ehrmann, M. und Beckwith, J. (1991). Decoding signals for membrane protein assembly using alkaline phosphatase fusions. *Embo J.* 10, 2773-2782.

- Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Ricker, K., Jentsch, T. J. und Koch, M. C. (1995). Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 1325-1334.
- Middleton, R. E., Pheasant, D. J. und Miller, C. (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature* 383, 337-340.
- Middleton, R. E., Pheasant, D. J. und Miller, C. (1994). Purification, reconstitution und subunit composition of a voltage-gated chloride channel from Torpedo electroplax. *Biochemistry* 33, 13189-13198.
- Miller, C. (1982). Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 299, 401-411.
- Miller, C. und White, M. M. (1984). Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2772-2775.
- Miller, C. und White, M. M. (1980). A voltage-dependent chloride conductance channel from Torpedo electroplax membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 341, 534-551.
- Mize, N. K., Andrews, D. W. und Lingappa, V. R. (1986). A stop transfer sequence recognizes receptors for nascent chain translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 47, 711-719.
- Morales, M. M., Carroll, T. P., Morita, T., Schwiebert, E. M., Devuyst, O., Wilson, P. D., Lopes, A. G., Stanton, B. A., Dietz, H. C., Cutting, G. R. und Guggino, W. B. (1996). Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am. J. Physiol.* 270, F1038-F1048.
- Mothes, W., Heinrich, S. U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J. und Rapoport, T. A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, 523-533.
- Mueckler, M. und Lodish, H. F. (1986). The human glucose transporter can insert posttranslationally into microsomes. *Cell* 44, 629-637.
- Nilsson, I. und von Heijne, G. (1990). Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids. *Cell* 62, 1135-1141.
- Nilsson, I., Whitley, P. und von Heijne, G. (1994). The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase. *J. Cell Biol.* 126, 1127-1132.
- Nilsson, I. M. und von Heijne, G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 268, 5798-5801.

- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N. und *et al.* (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.
- Ortells, M. O. und Lunt, G. G. (1996). A mixed helix-beta-sheet model of the transmembrane region of the nicotinic acetylcholine receptor. *Protein Eng.* 9, 51-59.
- Palade, P. T. und Barchi, R. L. (1977). On the inhibition of muscle membrane chloride conductance by aromatic carboxylic acids. *J. Gen. Physiol* 69, 879-896.
- Pease, R. J., Harrison, G. B. und Scott, J. (1991). Cotranslocational insertion of apolipoprotein B into the inner leaflet of the endoplasmic reticulum. *Nature* 353, 448-450.
- Perara, E. und Lingappa, V. R. (1985). A former amino terminal signal sequence engineered to an internal location directs translocation of both flanking protein domains. *J. Cell Biol.* 101, 2292-2301.
- Persson, B. und Argos, P. (1994). Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 237, 182-192.
- Petersen, T. N., Kauppinen, S. und Larsen, S. (1997). The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. *Structure* 5, 533-544.
- Plassart-Schiess, E., Gervais, A., Eymard, B., Laguëny, A., Pouget, J., Warter, J. M., Fardeau, M., Jentsch, T. J., Fontaine, B. (1997). Novel muscle chloride channel (CLCN1) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. *Neurology*, (im Druck).
- Ponting, C. P. (1997). CBS domains in CIC chloride channels implicated in myotonia and nephrolithiasis (kidney stones). *J. Mol. Med* 75, 160-163.
- Popot, J. L., de Vitry, C. und Atteia, A. (1994). Folding and assembly of integral membrane proteins. In: *Membrane protein structure*, S. H. White, ed. New York, Oxford: Oxford University Press., 41-96.
- Popot, J. L. und Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29, 4031-4037.
- Popot, J. L., Engelman, D. M., Gurel, O. und Zaccari, G. (1989). Tertiary structure of bacteriorhodopsin: positions and orientations of helices A and B in the structural map determined by neutron diffraction. *J. Mol. Biol.* 210, 829.
- Popov, M., Tam, L. Y., Li, J. und Reithmeier, R. A. (1997). Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3. *J. Biol. Chem.* 272, 18325-18332.

- Prat, A. G., Reisin, I. L., Ausiello, D. A. und Cantiello, H. F. (1996). Cellular ATP release by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol* 270, C538-C545.
- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B. und Agre, P. (1994). Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope- scanning mutants by vectorial proteolysis. *J. Biol. Chem.* 269, 1668-1673.
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. und Jentsch, T. J. (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* 373, 527-531.
- Pusch, M., Steinmeyer, K., Koch, M. C. und Jentsch, T. J. (1995). Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CIC-1 chloride channel. *Neuron* 15, 1-20.
- Radzika, A. und Wolfenden, R. (1988). Comparind the polarities of the amino acids: side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol und neutral aqueous solution. *Biochemistry* 27, 1664-1670.
- Rajendra, S. und Schofield, P. R. (1995). Molecular mechanisms of inherited startle syndromes. *Trends Neurosci.* 18, 80-82.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B. und Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annual Review Of Biochemistry* 303.
- Reddy, M. M., Quinton, P. M., Haws, C., Wine, J. J., Grygorczyk, R., Tabcharani, J. A., Hanrahan, J. W., Gunderson, K. L. und Kopito, R. R. (1996). Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* 271, 1876-1879.
- Richter, K. (1979). *Allgemeine Elektrophysiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Riordan, J. R. (1993). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 609-630.
- 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.
- Rost, B., Fariselli, B. und Casadio, R. (1996). Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* 7, 1704-1718.
- Rost, B. und Sander, C. (1993). Secondary structure prediction of all-helical proteins in two states. *Protein Eng.* 6, 831-836.
- Rost, B., und Sander, C. (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* 19, 55-72.

- Rothman, R. E., Andrews, D. W., Calayag, M. C. und Lingappa, V. R. (1988). Construction of defined polytopic integral transmembrane proteins. The role of signal and stop transfer sequence permutations. *J. Biol. Chem.* *263*, 10470-10480.
- Sabatini, D. D., Kreibich, G., Morimoto, T. und Adesnik, M. (1982). Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* *92*, 1-22.
- Sahin-Toth, M., Frillingos, S., Bibi, E., Gonzalez, A. und Kaback, H. R. (1994). The role of transmembrane domain III in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Protein Science* *3*, 2302-2310.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory handbook*. 2. Ausgabe, Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *74*, 5463-5467.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Spector, P. S. und Keating, M. T. (1996). Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 2208-2212.
- Schulein, R., Rutz, C. und Rosenthal, W. (1997). Topology of eukaryotic multispanning transmembrane proteins: use of LacZ fusions for the localization of cytoplasmic domains in COS.M6 cells. *Protein Eng.* *10*, 707-713.
- Schiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R. und Guggino, W. B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* *81*, 1063-1073.
- Seal, A. J., Collingridge, G. L. und Henley, J. M. (1994). In vitro translation and membrane topology of rat recombinant mGluR1 alpha. *Neuropharmacology* *33*, 1065-1070.
- Sheppard, D. N., Ostedgaard, L. S., Rich, D. P. und Welsh, M. J. (1994). The amino-terminal portion of CFTR forms a regulated Cl⁻ channel. *Cell* *76*, 1091-1098.
- Siegel, V. (1995). A second signal recognition event required for translocation into the endoplasmic reticulum [comment]. *Cell* *82*, 167-170.
- 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. und Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genet.* *17*, 171-178.
- Simon, S. M. und Blobel, G. (1993). Mechanisms of translocation of proteins across membranes. *Subcell. Biochem.* *21*, 1-15.
- Simon, S. M. und Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* *65*, 371-380.

- Singh, P., Tang, B. L., Wong, S. H. und Hong, W. (1993). Transmembrane topology of the mammalian KDEL receptor. *Mol. Cell Biol.* *13*, 6435-6441.
- Sipos, L. und von Heijne, G. (1993). Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins. *Eur J. Biochem* *213*, 1333-1340.
- Skach, W. R., Calayag, M. C. und Lingappa, V. R. (1993). Evidence for an alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *J. Biol. Chem.* *268*, 6903-6908.
- Skach, W. R. und Lingappa, V. R. (1993). Amino-terminal assembly of human P-glycoprotein at the endoplasmic reticulum is directed by cooperative actions of two internal sequences. *J. Biol. Chem.* *268*, 23552-23561.
- Skach, W. R. und Lingappa, V. R. (1994). Transmembrane orientation and topogenesis of the third and fourth membrane-spanning regions of human P-glycoprotein (MDR1). *Cancer Research* *54*, 3202-3209.
- Skach, W. R., Shi, L. B., Calayag, M. C., Frigeri, A., Lingappa, V. R. und Verkman, A. S. (1994). Biogenesis and transmembrane topology of the CHIP28 water channel at the endoplasmic reticulum. *Journal Of Cell Biology* *125*, 803-815.
- Spiess, M. (1995). Heads or tails--what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett.* *369*, 76-79.
- Srinivasan, Y., Elmer, L., Davis, J., Bennett, V. und Angelides, K. (1988). Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature* *333*, 177-180.
- Srinivasan, Y., Lewallen, M. und Angelides, K. J. (1992). Mapping the binding site on ankyrin for the voltage-dependent sodium channel from brain. *J. Biol. Chem.* *267*, 7483-7489.
- Staley, K. J., Smith, R., Schaak, J., Wilcox, C. und Jentsch, T. J. (1996). Alteration of GABA A receptor function following gene transfer of the ClC-2 chloride channel. *Neuron* *17*, 543-551.
- Staley, K. J., Soldo, B. L. und Proctor, W. R. (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science* *269*, 977-981.
- Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Grunder, S. und Jentsch, T. J. (1991b). Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* *354*, 304-308.
- Steinmeyer, K., Lorenz, C., Pusch, M., Koch, M. C. und Jentsch, T. J. (1994). Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *Embo J.* *13*, 737-743.

- Steinmeyer, K., Ortlund, C. und Jentsch, T. J. (1991a). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354, 301-304.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandervalle, A. und Jentsch, T. J. (1995). Cloning and functional expression of rat ClC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J. Biol. Chem.* 270, 31172-31177.
- Stühmer, W., terlau, H. und Heinemann, S. H. (1992). *Xenopus* oocytes for two-electrode and patch-clamp recordings. In: Practical electrophysiological methods, H. Kettenmann and R. Grantyn, eds., Wiley-Liss, New York.
- Stutts, M. J., Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. A., Rossier, B. C. und Boucher, R. C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269, 847-850.
- Szczesna-Skorupa, E., Browne, N., Mead, D. und Kemper, B. (1988). Positive charges at the NH₂ terminus convert the membrane-anchor signal peptide of cytochrome P-450 to a secretory signal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 738-742.
- Szczesna-Skorupa, E. und Kemper, B. (1993). An N-terminal glycosylation signal on cytochrome P450 is restricted to the endoplasmic reticulum in a luminal orientation. *J. Biol. Chem.* 268, 1757-1762.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. und Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318.
- Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57-60.
- Traxler, B., Boyd, D. und 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. und Marumo, F. (1993). Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla (published erratum appears in *J. Biol. Chem.* 1994 Jul 22;269(29): 19192). *J. Biol. Chem.* 268, 3821-3824.
- Uchida, S., Sasaki, S., Nitta, K., Uchida, K., Horita, S., Nihei, H. und Marumo, F. (1995). Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J. Clin. Invest.* 95, 104-113.
- Undrovins, A. I., Shander, G. S. und Makielski, J. C. (1995). Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am. J. Physiol* 269, H203-H214.
- Unwin, N. (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229, 1101-1124.

- Urry, D. W. (1971). The gramicidin A channel: a proposed $\pi_{(L,D)}$ -helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *68*, 672-676.
- Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C. und Higgins, C. F. (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* *355*, 830-833.
- van Iwaarden, P. R., Pastore, J. C., Konings, W. N. und Kaback, H. R. (1991). Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues. *Biochemistry* *30*, 9595-9600.
- van Klompenburg, W., Nilsson, I., von Heijne, G. und de Kruijff, B. (1997). Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *Embo J.* *16*, 4261-4266.
- 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. und et al (1994). A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels. *Hum.Mol.Genet.* *3*, 547-552.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E. und Rapoport, T. A. (1996). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* *134*, 25-35.
- 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.
- von Heijne, G. (1994). Membrane proteins: from sequence to structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *23*, 167-192.
- von Heijne, G. und Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J. Biochem* *174*, 671-678.
- von Heijne, G. und Manoil, C. (1990). Membrane proteins: from sequence to structure. *Protein Eng.* *4*, 109-112.
- Wahlberg, J. M. und Spiess, M. (1997). Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain. *J. Cell Biol.* *137*, 555-562.
- Walter, P. und Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* *10*, 87-119.
- Walter, P. und Lingappa, V. R. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* *2*, 499-516.
- Warburg, O. (1967). Purity of nucleic acids. In: *Experiments in cell physiology*, L. Packer, ed. New York, London, 114.

- Weiss, W., Kreusch, A., Schiltz, E., Nestel, U., Welte, W., Weckesser, J. und Schulz, G. E. (1991). The structure of porin from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Lett.* 280, 379.
- Welsh, M. J., Denning, G. M., Ostedgaard, L. S. und Anderson, M. P. (1993). Dysfunction of CFTR bearing the delta F508 mutation. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 235-239.
- Wessels, H. P., Beltzer, J. P. und Spiess, M. (1991). Analysis of protein topology in the endoplasmic reticulum. *Methods Cell Biol.* 34, 287-302.
- Wessels, H. P. und Spiess, M. (1988). Insertion of a multispanning membrane protein occurs sequentially and requires only one signal sequence. *Cell* 55, 61-70.
- West, J. B. (1991). The physiological basis of medical practice, 12. Ausgabe Edition, Williams & Wilkins, Baltimore.
- White, M. M. und Miller, C. (1979). A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* 254, 10161-10166.
- White, S. H. (1994). Hydropathy plots and the prediction of membrane protein topology. In: *Membrane protein structure*, S. H. White, ed., Oxford University Press, New York, 97-124.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A. und Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434-440.
- Wiedmann, M., Wiedmann, B., Voigt, S., Wachter, E., Muller, H. G. und Rapoport, T. A. (1988). Post-translational transport of proteins into microsomal membranes of *Candida maltosa*. *Embo J.* 7, 1763-1768.
- Wiener, M. C. und White, S. H. (1992). Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophys. J.* 61, 437-47.
- Wilimzig, M. (1985). LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends Gen.* 6, 185.
- Wollnik, B., Kubisch, C., Steinmeyer, K. und Pusch, M. (1997). Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel CIC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. *Hum. Mol. Genet.* 6, 805-811.
- Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A. H., Craig, A. M. und Sheng, M. (1997). Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385, 439-442.
- Yau, K. W. (1994). Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3481-3483.
- Yoder, M. D. und Jurnak, F. (1995). Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *Faseb J.* 9, 335-342.

- Yoder, M. D., Keen, N. T. und Jurnak, F. (1993). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* 260, 1503-1507.
- Yool, A. J. und Schwarz, T. L. (1991). Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* 349, 700.
- Young, E. F., Ralston, E., Blake, J., Ramachandran, J., Hall, Z. W. und Stroud, R. M. (1985). Topological mapping of acetylcholine receptor: evidence for a model with five transmembrane segments and a cytoplasmic COOH-terminal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 626-630.
- Zen, K. H., McKenna, E., Bibi, E., Hardy, D. und Kaback, H. R. (1994). Expression of lactose permease in contiguous fragments as a probe for membrane-spanning domains. *Biochemistry* 33, 8198-8206.
- Zhang, J. T. und Ling, V. (1991). Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by in vitro translation. *J. Biol. Chem.* 266, 18224-18232.
- Zhou, J., Spier, S. J., Beech, J. und Hoffman, E. P. (1994). Pathophysiology of sodium channelopathies: correlation of normal/mutant mRNA ratios with clinical phenotype in dominantly inherited periodic paralysis. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1599-1603.

6 Anhang: Sequenzen der verwendeten Primer⁷

10PRLr	gcggatcccttgtagatgatgtcatc
10T11a	atcatctacaagatccta
10T11r	gtcatcaaacaaaatacc
12PRLr	gcggatccgagcagggttcgcaactc
12T13a	gatcctgagagcctgggccagaccaccacagtcaag
12T13r	caactctccagccatgaagagcagggttcgcaactc
1-3a	gtatagcacaaatgaagctgagcagccatactactac
13PRLr	gcggatccccagacttggtgtgcc
1-3r	ctcaaaatagttttaatctcggggattccagagccaac
1-5a	tacaggaagaatgaagccgagcagccatactactac
1-5r	ctcaagatagttttatctcggggattccagagccaac
1-5shorta	ttgagcctgggcaaagagggccccttcgtccacatt
1PRLr	gcggatcccagaggaaggctgggct
1transa	gaaatgaagacaatacttcg
1transr	atataccccgcagaacac
2PRLr	gcggatccttccttcaggacaacccca
2T3a	gatcctgagagcctgggccgtggggttgtcctg
2T3r	caactctccagccatgaaaagtattgtcttcatttcgg
3PRLr	gcggatccgtggacgaaggggccct
3T*4a	ttcgtccacattgccagc
3T*4r	gtggacgaagggggccctct
3T4a	gatcctgagagcctgggcttcgtccacattgccagca
3T4r	caactctccagccatgaagtggacgaagggggccctc
3transa	gagattaaaactattttgag
3longtransa	gagggccccttcgtccacggaatgggtcaattcatg
3transr	agcttcatttgtgctatac
3longtransr	gctggcaatgtggacgaaaacgttgacccgggggtg
4PRLr	gcggatccatcagagtagtagtatgg
4T*5a	tactactctgatatcctg
4T*5r	gtatggctgctcatatac
4T5a	gatcctgagagcctgggctactactctgatatcctg
4T5r	caactctccacgcatgaagtatggctgctcatatac
4transa	gtatatgagcagccatacgggaatgggtcaattcatg
4transr	caggatatcagagtagtaaacgttgacccgggggtg
5-1a	gtggtctgcggggtatataagcgcagagaggtcttg
5-1r	cgaagtattgtcttcatttcagggattccagagccaca
5PRLr	gcggatcctctccagtagttccgaac
5T6a	gatcctgagagcctgggctttgctgttcggaactac
5T6r	caactctccagccatgaagttaggtggaggtgacctcg
5transa	gagataaaaactatcttgag
5transr	ggcttcattcttcctgta
5transSr	ctctttgccaggtcaa
6PRLr	gcggatcccttcaggcctcaaggggaa
6T7a	gatcctgagagcctgggcttcggaatggatttccc

⁷ Wegen möglicher Tippfehler bei den Primern sollte man diese vor erneuter Verwendung mit den entsprechenden Originalsequenzen abgleichen.

6T7r	caactctccagccatgaaattggttctgaacagag
7PRLr	gcggatccgctgagggccttgtgctt
7T8a	gatcctgagagcctgggccacaaggccctcagccag
7T8r	caactctccagccatgaactttcggacaccgagca
8PRLr	gcggatccgcccaggctctcaggatca
A211Ca	ggaatacctcacaatgaaatgctttgtggccaagggtgtc
A211Cr	tttcattgtgaggtattcc
A221Ca	aagggtgtcgccctgacttgtggcctgggcagtggcatc
A221Cr	agt cagggcgacaacctt
A239Ca	ggccccttcgtccacatttgcagcatctgtgctgctgtc
A239Cr	aatgtggacgaaggggcc
A243Ca	cacattgccagcatctggtgtgctgtcctcagcaaattc
A243Cr	acagatgctggcaatgtg
A244Ca	attgccagcatctgtgcttgtgtcctcagcaaattcatg
A244Cr	agcacagatgctggcaat
A492Ca	cctgtgtttgtgctaggatgtgcatttggaggctggta
A492Cr	tcctagcacaacacagg
A493Ca	gtgtttgtgctaggagcttgttttggaggctggtagga
A493Cr	agctcctagcacaacac
Acha	atggagctcaccgctgtc
D136Ga	tcagctggagcatgggctacgtcagtgccaa
D136Gr	ttggcactgacgtagcccatgctccagctga
D4 Δa	ttcgtccacattgccagcgagcagccatactactac
D4 Δr	gtagtagtatggctgctcgctggcaatgtggacgaa
ΔC390r	gcgaattcttatcagcgggtgcttagcaagaaa
ΔC451r	gcgaattcttatcagtgaatccacacagctga
ΔC520r	gcgaattcttatcataggatcttgtagatgat
ΔC668r	gcgaattcttatcactcaggacacaggtggcg
ΔC720r	gcgaattctcattagagatcttcgtcctcatc
ΔC900r	gcgaattcttatcaaggtgccccgggtactctt
deltaC	gcgaattcttatcagtcctcaacaaagatgg
ΔN109a	tcgggctgagagatggaggtgagaagaaaattaggg
ΔN109r	ctccatctctcagcccga
ΔN369a	tcgggctgagagatggagcatcgccaagtcagctcg
ΔN413a	tcgggctgagagatggagttcatggctggagagttg
ΔN509a	gcgataccatggagggtatthttgtttgatgaca
ΔN579a	gcgataccatggacagcatcatccaggtc
ΔN601a	gcgataccatggagtataccatcttcgcttgagg
ΔN721a	gcgataccatggagtctggcaagagcgagctt
ΔN801a	gcgatacatggagattgaggcctgggag
E232Ca	ggcatccccgtggggaaatgcggccccttcgtccacatt
E232Cr	tttccccacgggggatgcc
E258Ca	gtgttctgcgggggtatattgccagccatactactactct
E258Cr	atataccccgcagaacac
E548Ca	acagctgtgatttgcttctgcttaacgggtcagattgct
E548Cr	gaagcaaatacacagctgt
F235Ca	tggggaaagaggggccctgcgtccacattgccagcat
F235Cr	aggggccctctttcccca
F488Ca	ggaggcttcatgcctgtgtgtgtgctaggagctgcattt

KpnPRLa	gcggtaccagtgtgtttcttgaaatc
L219Ca	gtggccaaggttgcgcctgtactgcgggcctgggcagt
L219Cr	ggcgacaaccttggccac
L223Ca	gtcgcctgactgcgggctgcggcagtgccatccccgtg
L223Cr	gcccgcagtcagggcgac
L246Ca	agcatctgtgctgctgtctgcagcaaattcatgtctgtg
L246Cr	gacagcagcacagatgct
L490Ca	ttcatgcctgtgtttgtgtgtggagctgcatTTggaagg
L490Cr	cacaaacacaggcatgaa
L549Ca	gctgtgatttgccttCGaatgcacgggtcagattgctcac
L549Cr	ttcgaagcaaattcacagc
M485Ca	atacctgcggaggcttctgtcctgtgtttgtgctagga
M485Cr	gaagcctccgcagggtat
P228Ca	ggcctgggcagtgccatctgcgtggggaaagagggcccc
P228Cr	gaggccactgcccaggcc
P234Ca	cccgtggggaaagagggctgcttcgtccacattgccagc
P234Cr	gccctctttccccacggg
P260Ca	tgcggggtatatgagcagtgctactactactctgatatc
P260Cr	ctgctcatataccccgca
P361Ca	aagttcaaaagcatctgtgcctctttctgggtgg
P361Cr	ccaccagaaagaggcacagatgcttttgaactt
P486Ca	ccctgcggaggcttcatgtgtgtgtttgtgctaggagct
P486Cr	catgaagcctccgcaggg
pACTa	gatgttccagattacgcta
pACTr	gaaattgagatggtgcac
pASGal	caaagacagttgactgta
pASrev	ttataacttatttaataataaaa
PRLa	gcgaattcagtggtgtttcttgaaatcatcacc
PRLBama	gcggatcctatgcccaggggcaaagggttcatt
PRLr	gcgaattcttagcagttgttgttgttagatgatt
Q259Ca	ttctgcggggtatatgagtgcccatactactactctgat
Q259Cr	ctcatataccccgcagaa
rm2r	gtagttccttcagggtcaaa
rm10a	atggctctggtcagctgg
rm10r	ccagctgaccagagccat
rm20a	gggtgaacaaagctggtg
rm9r	acgaagtattgtcttcatttcg
rmbR	cagctggaaggagactg
S189Ca	ccccaggctgttggctgtggaatccccgaaatg
S189Cr	agccaacagcctgggg
S225Ca	ctgactgcgggcctgggctgtggcatccccgtggggaa
S225Cr	gcccaggcccgcagtcag
S240Ca	cccttcgtccacattgcctgcatctgtgctgctgtcct
S240Ca	cccttcgtccacattgcctgcatctgtgctgctgtcct
S240Cr	ggcaatgtggacgaaggg
S247Ca	atctgtgctgctgtcctctgcaaattcatgtctgtgttc
S247Cr	gaggacagcagcacagat
SP6X	atTTagggtgacactatagaat
SPD8a	gtaggggaccaccgtgacttcatggctggagagtt

SPr	gtcacggtggtcccctac
T196Ca	ggaatccccgaaatgaagtgcatacttcgtggggttgtc
T196Cr	cttcatttcggggattcc
T208Ca	gtcctgaaggaatacctctgcatgaaagcctttgtggcc
T208Cr	gaggtattccttcaggac
T220Ca	gccaaggttgctgcacctgtgtgcgggcccgtggcagtggc
T220Cr	cagggcgacaaccttggc
T550Ca	gtgatttgcttcgaattatgcggtcagattgctcacatc
T550Cr	taatctgaagcaaatcac
transa	ttcatggctggagagttg
transr	gcccaggctctcaggatca
transStop	gcgaattcttatcagttgacccgggggtgaat
V213Ca	ctcacaatgaaagccttttgcgccaaggttgctgcacctg
V213Cr	aaaggctttcattgtgag
V229Ca	ctgggcagtggcatcccctgcgggaaagagggccccttc
V229Cr	ggggatgccactgccag
V236Ca	gggaaagagggccccttctgccacattgccagcatctgt
V236Cr	gaaggggccctctttccc
V245Ca	gccagcatctgtgctgcttgccctcagcaaattcatgtct
V245Cr	agcagcacagatgctggc
V256Ca	atgtctgtgttctgcgggtgctatgagcagccatactac
V256Cr	cccgcagaacacagacat
V487Ca	tgcggaggcttcatgccttgttttgtgctaggagctgca
V487cr	Aggcatgaagcctccgca
V489Ca	ggcttcatgcctgtgttttgtctaggagctgcatttggga
V489Cr	aaacacaggcatgaagcc
Y257Ca	tctgtgttctgcggggtatgtgagcagccatactactac
Y257Cr	taccccgcagaacacaga

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Jentsch für die Überlassung des Themas, seine stete Bereitschaft zur Diskussion wissenschaftlicher Fragen, das Interesse am Fortgang der Arbeit und nicht zuletzt für die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Labors, das mir ermöglichte, alle meine experimentellen Vorhaben in die Tat umzusetzen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Burkhardt Tümmler für die Übernahme des Koreferates und der Rolle des „hannoveraner Doktorvaters“ danken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Jentsch danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die trotz vieler „dringender“ Projekte immer von Kollegialität und Kooperationsbereitschaft geprägt war. Einige Kollegen möchte ich zusätzlich namentlich erwähnen:

Herrn Dr. Sven Eric Jordt danke ich für die gute Zusammenarbeit als Labornachbar und seine Ratschläge bei meinen ersten Mutagenese- und Klonierungsversuchen.

Dr. Blanche Schwappach wies mich, neben Dipl.-Biologe Mirko Hechenberger, in die Grundlagen der Hefekultur ein, von ihr übernahm ich auch die Vektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid-System.

PD Dr. Michael Pusch war ein kompetenter Ansprechpartner in allen Fragen der Elektrophysiologie, ihm danke ich auch für die Überlassung der hCIC-1 Mutante G188A.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Klaus Steinmeyer und Dr. Willy Günther für ihre ständige Diskussionsbereitschaft bedanken, aus ihrer großen zellbiologischen Erfahrung habe ich viele Anregungen erhalten.

Frau Dr. Silke Brandt und Dipl.-Biochemikerin Anke Lüchow danke ich für die Einführung in die Immunfluoreszenz an Kulturzellen.

Bei Dr. Christian Kubisch möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei der Analyse von Myotoniemutationen und dem Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Den technischen Angestellten, vor allem Christine Neff, Barbara Merz, Patricia Hausmann und Corinna Büttgen, gilt mein Dank für praktische Hilfestellungen, insbesondere dem Präparieren der Oozyten.

Unserer Sekretärin, Frau Dagmar Bosholt, sei gedankt für ihre Mithilfe bei Bestell- und Verwaltungsarbeiten, sowie für die Bereitstellung eines unerschöpflichen Schokoladevorrats, der nicht unerheblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Schließlich gilt ein großer Dank meiner Frau, Dr. Monika Rose, die mich immer wieder aufgebaut hat, wenn es im Labor nicht so klappte wie erwartet, und Verständnis dafür aufbrachte, daß die Experimente einen großen Teil meiner Zeit und Aufmerksamkeit gebunden haben. Auch in fachlicher Hinsicht hat sie durch Diskussion und Korrekturlesen einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit.

8 Lebenslauf

Name: Schmidt-Rose, geb. Schmidt
Vorname: Thomas
Wohnort: Rellinger Weg 25, 22457 Hamburg
Geburtsdatum: 6. Juli 1964
Geburtsort: Lüneburg
Familienstand: verheiratet seit dem 4.11.1994

Schulausbildung

1970-1974 Grundschule Hermann-Löns, Lüneburg
1974-1983 Gymnasium Herderschule, Lüneburg,
Mai 1983 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/83-10/87 Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg
10/84 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
03/86 Zahnärztliche Vorprüfung
01/88-03/89 Wehrdienst; zuletzt als Sanitäter bei der Sanitätsgruppe Lüneburg
04/89-09/89 Gasthörer im Fach Biochemie an der Universität Hannover
10/89-02/95 Studium der Biochemie an der Universität Hannover
09/91 Diplom-Vorprüfung in Biochemie
08/92-01/95 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
06/94 Mündliche Diplom-Hauptprüfung
06/94-01/95 Diplomarbeit in der klinischen Forschergruppe Mukoviszidose im Zentrum Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover. Thema: „Differenzielle Genomanalyse mittels subtraktiver Hybridisierung bei klonalen Varianten von Pseudomonas aeruginosa“
01/95 Studienabschluß als Diplom-Biochemiker

Berufstätigkeit

03/1995-heute Wissenschaftlicher Angestellter am Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Arbeitsgruppe Prof. Jentsch. Arbeiten zur Dissertation mit dem Thema: „Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen bei Chloridkanälen der ClC-Familie am Beispiel des Skelettmuskelkanals hClC-1.“

Hamburg, 30. November 1997

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Ergebnisse wurde bisher nicht als Diplomarbeit oder Dissertation verwendet.

Teile der Arbeit sind bereits publiziert worden:

Schmidt-Rose, T. und Jentsch, T. J. (1997).
Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J. Biol. Chem.* 272, 20515-20521.

Schmidt-Rose, T. und Jentsch, T. J. (1997).
Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7633-7638.

Hamburg, 30. November 1997