

**Der spannungsgesteuerte Chloridkanal ClC-2
und seine Bedeutung in der Pathogenese
von idiopathischer generalisierter Epilepsie**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Maika Ursula Warnstedt

aus Essen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Christoph Fahlke
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Fritz Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Veröffentlichungen

wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Haug, K.* , Warnstedt, M.* , Alekov, A.K.* , Sander, T., Ramirez, A., Poser, B., Maljevic, S., Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J., Horvath, S., Hallmann, K., Dullinger, J.S., Rau, B., Haverkamp, F., Beyenburg, S., Schulz, H., Janz, D., Giese, B., Müller-Newen, G., Propping, P., Elger, C.E., Fahlke, Ch.* , Lerche, H.* , Heils, A.* (2003) Mutations in *CLCN2* encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat. Genet.* 33, 527-532.

* gleichberechtigt beteiligte Autoren

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Chlorid-Kanäle	1
1.2	Die Familie der ClC-Kanäle	2
1.2.1	Molekulare Architektur von ClC-Kanälen.....	4
1.2.1.1	ClC-Kanäle sind Dimere mit zwei Ionenporen	4
1.2.1.2	Topologie von ClC-Kanälen	4
1.2.2	Funktionelle Eigenschaften von ClC-Kanälen.....	6
1.2.2.1	Aktivierung, Inaktivierung und Rektifizierung	6
1.2.2.2	Die Ionenpore von ClC-Kanälen.....	7
1.2.2.3	Anionenselektivität.....	8
1.2.2.4	<i>Gating</i> in ClC-Kanälen.....	9
1.2.3	Physiologische Bedeutung von ClC-Kanälen und ihre Rolle bei genetischen Erkrankungen	10
1.2.3.1	ClC-1	10
1.2.3.2	ClC-2	11
1.2.3.3	ClC-Ka und ClC-Kb.....	12
1.2.3.4	ClC-3, ClC-4 und ClC-5.....	13
1.2.3.5	ClC-6 und ClC-7	13
1.3	Idiopathische generalisierte Epilepsie (IGE).....	14
1.3.1	Epilepsie-Klassifikationen und verschiedene IGE-Subtypen	14
1.3.2	Genetische Ursachen.....	15
1.3.2.1	Mutationen in ligandengesteuerten Ionenkanälen.....	16
1.3.2.2	Mutationen in spannungsgesteuerten Ionenkanälen.....	16
1.4	Ziel der Arbeit.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
2.2	Vektoren	19
2.3	Oligonukleotide	22
2.4	Prokaryotische Zellen	23
2.5	Eukaryotische Zellen	24
2.5.1	Medien und Lösungen.....	24
2.5.2	Zelllinien	25
2.5.3	Kultivierung der Zellen.....	25
2.5.4	Aufbewahrung der Zellen	25
2.5.5	Transfektion der Zellen.....	26
2.5.6	Fixierung der Zellen.....	26

2.6	Molekularbiologische Methoden	27
2.6.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	27
2.6.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	27
2.6.3	Isolierung von Plasmid-DNA	27
2.6.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.6.5	Restriktion von DNA	28
2.6.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarose-Gelelektrophorese	28
2.6.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	29
2.6.8	DNA-Ligation	29
2.6.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.6.10	DNA-Sequenzierung	30
2.7	Elektrophysiologische Messungen	31
2.7.1	Die <i>Patch-Clamp</i> Technik	31
2.7.2	Meßelektroden	35
2.7.3	Herstellung der Patchpipetten	35
2.7.4	Lösungen	36
2.7.5	Versuchsaufbau	37
2.7.6	Datenanalyse	38
2.8	Konfokale Mikroskopie	40
2.8.1	Bildaufnahme am konfokalen Mikroskop	40
2.8.2	Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	40
2.8.3	Versuchsablauf bei FRET-Messungen	42
2.8.4	Datenanalyse	43
3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von hCIC-2 und rCIC-2	45
3.1.1	Aktivierungseigenschaften von hCIC-2 WT und rCIC-2 WT	45
3.1.2	Deaktivierungseigenschaften von hCIC-2 WT und rCIC-2 WT	49
3.1.3	Strom-Spannungs-Kennlinien von hCIC-2 WT und rCIC-2 WT.....	52
3.1.4	Vergleich des rCIC-2 Wildtyps mit der Deletionsmutante rCIC-2 Δ 16-61	53
3.1.5	Block von rCIC-2 Δ 16-61 durch Iodid-Ionen	56
3.1.6	Einfluß der intrazellulären Cl ⁻ -Konzentration auf das Aktivierungsverhalten von hCIC-2 WT.....	60
3.2	Funktionelle Auswirkungen drei verschiedener CIC-2 Mutationen aus Familien mit idiopathischer generalisierter Epilepsie.....	62
3.2.1	Elektrophysiologische Untersuchung der M200fsX231 Mutation	62
3.2.2	Elektrophysiologische Untersuchung der del74-117 Mutation	63
3.2.3	Fluorometrische Untersuchungen der M200fsX231 und del74-117 Mutationen	65
3.2.4	FRET-Untersuchungen zur Interaktion der M200fsX231 und der del74-117 Mutationen mit dem hCIC-2 Wildtyp	66

3.2.5	Elektrophysiologische Untersuchung der G715E Mutation	71
4	DISKUSSION	75
4.1	Heterologe Expression von ClC-2	75
4.2	Biophysikalische Charakterisierung von ClC-2	77
4.2.1	Vergleich von hClC-2 und rClC-2	77
4.2.2	Die Bedeutung des N-Terminus für das Schaltverhalten von ClC-2	80
4.2.3	Eigenschaften des Iodid-Blocks von ClC-2	82
4.2.4	Verknüpfung der Aktivierung von ClC-2 mit dem transmembranen Chlorid-Gradienten	84
4.3	Mögliche physiologische Funktion von ClC-2 bei der neuronalen Cl ⁻ -Homöostase	85
4.4	Pathophysiologische Konsequenzen der IGE-verursachenden Mutationen von ClC-2	88
4.4.1	M200fsX231 und del74-117 führen zu einem Funktionsverlust	89
4.4.2	G715E verändert das Aktivierungsverhalten von ClC-2	91
4.4.3	CLCN2 als krankheitsverursachendes Gen in idiopathischer Epilepsie	93
4.5	Ausblick	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
7	LITERATURVERZEICHNIS	101

1 EINLEITUNG

Die Kontrolle des Ionenflusses über die Zellmembran ist für viele biologische Prozesse von entscheidender Bedeutung. Die Entstehung und Weiterleitung von elektrischen Signalen in sensorischen, Nerven- und Muskelzellen sowie die Aufrechterhaltung einer definierten ionalen Zusammensetzung der verschiedenen intrazellulären Kompartimente hängt dabei maßgeblich von der Funktion integraler Membranproteine ab, die eine passive Diffusion elektrisch geladener Teilchen entlang ihres elektrochemischen Gradienten erlauben: den Ionenkanälen. Ionenkanäle bilden wassergefüllte Poren in der Zellmembran und ermöglichen den elektrisch geladenen Ionen so eine Überwindung der hydrophoben Lipiddoppelschicht. Sie werden anhand der Art und Weise ihrer Aktivierung sowie ihrer Ionenselektivität in verschiedene Klassen gegliedert. Es gibt Kanäle, die nur für Kationen permeabel sind, und solche, die Anionen bevorzugen. Bei den Kationenkanälen unterscheidet man die hochselektiven K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle von denen, die relativ unselektiv Kationen leiten. Die meisten Anionenkanäle sind für mehrere Anionen permeabel. Obwohl in manchen Kanälen andere Ionen wie z.B. NO_3^- besser permeieren können als Cl^- , stellt Cl^- als das am häufigsten vorkommende Anion die Ionenspezies dar, die überwiegend von Anionenkanälen geleitet wird. Deshalb werden Anionenkanäle häufig als Chloridkanäle bezeichnet.

1.1 Chlorid-Kanäle

Es gibt viele verschiedene Arten von Chloridkanälen, die sich durch ihren Aktivierungsmechanismus, ihre biophysikalischen Eigenschaften, ihr Expressionsmuster und letztlich durch ihre physiologischen Funktionen voneinander unterscheiden. Cl^- -Kanäle können durch das Membranpotential (spannungsgesteuerte Kanäle), durch die Bindung von Signalmolekülen (liganden-aktivierte Kanäle), durch Volumenveränderungen der Zelle, durch verschiedene andere Ionen (wie z.B. Ca^{2+}), durch pH-Veränderungen, durch die Bindung und Hydrolyse von ATP oder durch Phosphorylierung aktiviert werden. Sie variieren in ihrer Einzelkanalleitfähigkeit, ihrer Anionenselektivität, ihrem Schaltverhalten und ihren Regulationsmechanismen. Sowohl in der Zellmembran als auch in den Membranen von intrazellulären Organellen erfüllen Chloridkanäle viele unterschiedliche Funktionen. Zum Beispiel sind sie zusammen mit verschiedenen Ionentransportern und Ionenpumpen an der Regulation des Zellvolumens und der ionalen Homöostase des Zytoplasmas beteiligt und sorgen für einen elektroneutralen Transport der elektrogenen H^+ -ATPase, die für die Azidifizierung bestimmter intrazellulärer Kompartimente verantwortlich ist. Im

Lungenepithel, in vielen Drüsenzellen und in der Henle'schen Schleife der Niere sind Chloridkanäle an der Sekretion und Reabsorption von Chloridionen beteiligt. Eine weitere wichtige Funktion ist die Regulierung der elektrischen Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellmembranen. Die Störung oder der Verlust der Funktionalität von Chloridkanälen kann zu vielen verschiedenen Krankheiten führen (Jentsch et al., 2002).

Aufgrund ihrer molekularen Struktur werden Chloridkanäle in verschiedene Gruppen aufgegliedert. Bis jetzt sind drei Gen-Familien von Cl⁻-Kanälen etabliert: die Familie der ClC-Kanäle, der CFTR-Kanal (*cystic fibrosis conductance regulator*), der als einziger Cl⁻-Kanal zur Superfamilie der ABC-Transporter gehört und durch seine Rolle bei der Cystischen Fibrose bekannt ist (Sheppard & Welsh, 1999), und als größte Familie die GABA- und Glycin-Rezeptoren, welche liganden-aktivierte Cl⁻-Kanäle darstellen (Betz et al., 1999; Bormann, 2000; Chebib & Johnston, 1999). Desweiteren gibt es Cl⁻-Kanäle, die durch eine Zunahme des Zellvolumens aktiviert werden, deren molekulare Identität jedoch noch nicht geklärt ist, Ca²⁺-aktivierte Chloridkanäle, die als Bestrophine bezeichnet werden (Zhiqiang et al., 2003), und die CLIC-Familie von intrazellulären Cl⁻-Kanälen mit nur einer putativen Transmembrandomäne (Cromer et al., 2002).

1.2 Die Familie der ClC-Kanäle

Die Klonierung des spannungsgesteuerten Cl⁻-Kanals ClC-0 aus dem elektrischen Organ des marinen Zitterrochens *Torpedo marmorata* (Jentsch et al., 1990) führte zur Entdeckung der ClC-Kanalfamilie. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche weitere ClC-Kanäle in vielen verschiedenen Spezies und Geweben identifiziert (Steinmeyer et al., 1991a; Thiemann et al., 1992; Uchida et al., 1993; Kawasaki et al., 1994; Borsani et al., 1995; van Slegtenhorst et al., 1994; Fisher et al., 1994; Steinmeyer et al., 1995; Brandt & Jentsch, 1995). ClC-Kanäle sind in nahezu allen Organismen vorhanden, von Wirbeltieren über Wirbellose bis hin zu Pflanzen und Prokaryoten. In Säugetieren wurden neun verschiedene ClC-Gene identifiziert, die sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie und einiger funktioneller Eigenschaften in drei Subfamilien gliedern (Abb. 1.1). Die erste Untergruppe umfaßt mit den Isoformen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka und ClC-Kb ausschließlich Kanäle, die in der Zellmembran lokalisiert sind, während die zwei anderen Subfamilien Kanäle beinhalten, die hauptsächlich in intrazellulären Membranen vorkommen.

Einige ClC-Kanäle (z.B. ClC-0, ClC-1 und ClC-2) zeigen große Ströme, wenn sie allein exprimiert werden, ClC-K Kanäle hingegen benötigen für eine volle Funktionalität die β -Untereinheit Barttin (Estévez et al., 2001). Allen ClC-Kanälen gemeinsam ist ihre spannungsabhängige Aktivierung. In dieser Hinsicht und bezüglich ihrer Proteinstruktur unterscheiden sich ClC-Kanäle jedoch entscheidend von „konventionellen“ Ionenkanälen: im Gegensatz zu anderen Kanalproteinen werden die Poren von ClC-Kanälen nicht von mehreren, ringförmig angeordneten, sondern von einzelnen Untereinheiten geformt.

CIC-Kanäle besitzen außerdem keinen internen Spannungssensor wie das S4-Segment der spannungsgesteuerten Kationenkanäle (Stühmer et al., 1989; Bezanilla, 2000; Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b): die Spannungsabhängigkeit des Schaltverhaltens in CIC-Kanälen kommt nicht durch eine Bewegung von Ladungen innerhalb des Proteins, sondern durch die Bewegung des permeierenden Anions durch das transmembrane elektrische Feld zustande (Chen & Miller, 1996).

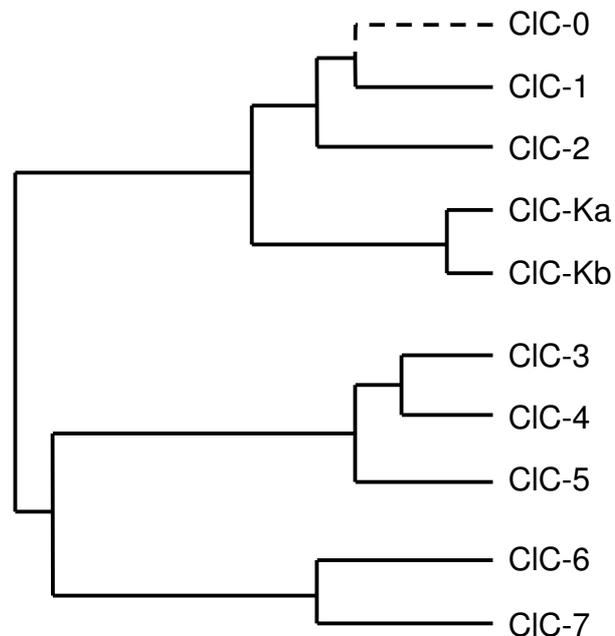


Abbildung 1.1: Stammbaum der CIC-Kanalfamilie in Säugern. Basierend auf ihrer Sequenzhomologie können die neun Säugetier-CIC-Kanäle in drei Subfamilien eingeteilt werden. Der CIC-0 Kanal aus dem elektrischen Organ des Zitterrochen *Torpedo* ist aufgrund seiner engen Verwandtschaft mit CIC-1 ebenfalls dargestellt.

Hinsichtlich ihrer Expressionsmuster unterscheiden sich die einzelnen Mitglieder der CIC-Familie voneinander. Einige CIC-Kanäle, wie z.B. CIC-2, CIC-6 oder CIC-7, sind ubiquitär vorhanden (Thiemann et al., 1992, Brandt & Jentsch, 1995), während die beiden CIC-K Isoformen, CIC-3, CIC-4 und CIC-5 nur in bestimmten Geweben nachweisbar sind (Kawasaki et al., 1994; van Slegtenhorst et al., 1994; Fisher et al., 1994; Pannabecker et al., 2000; Estévez et al., 2001). Die Expression von CIC-1 ist fast ausschließlich auf die Skelettmuskulatur begrenzt (Steinmeyer et al., 1991a),

Die physiologische Bedeutung von CIC-Kanälen wird durch verschiedene Erbkrankheiten deutlich, die auf Defekte in CIC-Genen zurückzuführen sind. Mutationen im CIC-1 Kanal des Skelettmuskels beispielsweise können die Muskelkrankheit Myotonia congenita sowohl in ihrer rezessiven Form („Becker’s disease“) als auch in ihrer dominanten Form („Thomsen’s disease“) verursachen (Koch et al., 1992; George et al., 1993; Heine et al., 1994; Zhang et al., 1996), während Mutationen in CIC-5 für die Nierenkrankheit „Dent’s disease“ verantwortlich sind (Lloyd et al., 1996). Mutationen im CIC-2 Gen wurden kürzlich mit verschiedenen

Formen der idiopathischen generalisierten Epilepsie in Verbindung gebracht (Haug et al., 2003).

In Prokaryoten sind ClC-Kanäle mutmaßlich für die Gewährleistung des elektroneutralen Transports von Aminosäuren verantwortlich, der den Bakterien das Überleben im extrem sauren Milieu des Magens ermöglicht (Iyer et al., 2002).

1.2.1 Molekulare Architektur von ClC-Kanälen

1.2.1.1 ClC-Kanäle sind Dimere mit zwei Ionenporen

Alle bisher untersuchten ClC-Kanäle bilden funktionelle Dimere (Middleton et al., 1994; Middleton et al., 1996; Fahlke et al., 1997a; Maduke et al., 1999). Es gibt zwar Ergebnisse, die auf eine tetramere Struktur von ClC-Kanälen hindeuten (Ramjeesingh et al., 2000), allerdings sprechen sowohl zweidimensionale (Mindell et al., 2001) als auch dreidimensionale (Dutzler et al., 2002) Kristallstrukturen von prokaryotischen ClC-Kanälen dafür, daß Dimere die funktionelle Einheit des Proteins darstellen. Aufgrund der großen Homologie zwischen den einzelnen Mitgliedern der ClC-Familie ist anzunehmen, daß dies für alle ClC-Kanäle gilt. Anders als bei anderen Ionenkanälen bildet jede der beiden ClC-Untereinheiten eine eigenständige Pore, so daß der funktionale ClC-Kanal zwei identische Poren besitzt (Miller, 1982; Hanke & Miller, 1983; Miller & White, 1984; Dutzler et al., 2002). Jede dieser Poren kann unabhängig von der anderen öffnen und schließen, und ein zusätzlicher Mechanismus schließt und öffnet beide Poren gemeinsam. Dieses gemeinsame *gate* schaltet dabei sehr viel langsamer als die individuellen *gates* und wird deswegen als *slow gate* bezeichnet im Gegensatz zum *fast gate* der beiden Protoporen.

1.2.1.2 Topologie von ClC-Kanälen

Grundlegende strukturelle Eigenschaften von ClC-Kanälen konnten mit Hilfe der dreidimensionalen Kristallstruktur von zwei bakteriellen ClC-Kanälen (StClC von *S. typhimurium* und EcClC von *E. coli*) eindeutig charakterisiert werden (Dutzler et al., 2002). Ein Kanal besteht demnach aus zwei identischen Untereinheiten, die entlang einer zweifachen Symmetrieachse senkrecht zur Ebene der Zellmembran aneinander liegen. Jede Untereinheit bildet dabei eine eigene separate Pore.

Eine ClC-Untereinheit enthält 18 α -Helices, die mit A-R bezeichnet werden (Abb. 1.2). Die C-terminale Hälfte (Helices J-Q) stellt eine strukturelle Wiederholung der N-terminalen Hälfte (Helices B-I) dar. Innerhalb der Membran sind die beiden Hälften gegenläufig orientiert entlang einer zweifachen Symmetrieachse. Viele der transmembranen Helices durchspannen die Membran nur teilweise. Sie sind unterschiedlich lang und stark gekippt (Abb. 1.3 A). Durch diese Anordnung werden hoch konservierte Aminosäuren aus vier separaten Regionen des Proteins zusammengebracht: die positiv geladenen amino-terminalen Enden der α -Helices D, F und N sind auf einen gemeinsamen Punkt gerichtet (Abb. 1.3 B)

und bilden so eine elektrostatisch vorteilhafte Umgebung für die Bindung von Anionen. In den ersten Bildern der Kristallstruktur (Dutzler et al., 2002) konnte durch Darstellungen der Elektronendichte an diesem Punkt ein Cl^- - bzw. ein Br^- -Ion nachgewiesen werden (Abb. 1.3 B), was darauf hinweist, daß diese Region den Selektivitätsfilter der Pore darstellt. Das Ion wird durch partielle positive Ladungen von Helix-Dipolen und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Abb. 1.3 C) und kann auf diese Weise schnell durch die Pore gelangen.

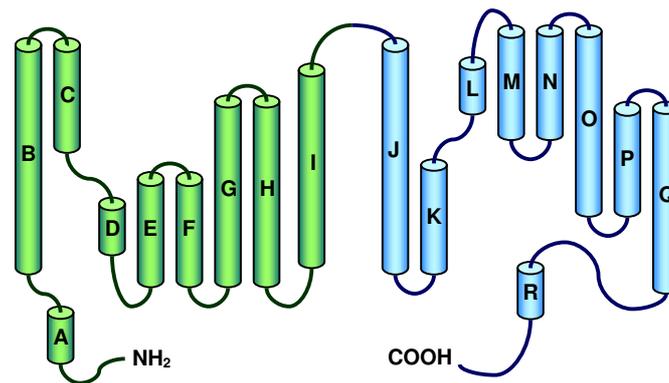


Abbildung 1.2: Membrantopologie einer ClC-Untereinheit von *S. typhimurium* (modifiziert nach Dutzler et al., 2002). Die α -Helices A-R sind als Zylinder und die beiden Hälften der Untereinheit in grün und blau dargestellt.

Die Pore aus Sicht der Kontaktregion zwischen den beiden Untereinheiten ist in Abbildung 1.3 B dargestellt. Die N-Termini der Helices D, F und N sind auf einen etwa 12 Å langen Tunnel gerichtet. Wassergefüllte Vorhöfe reichen von der extrazellulären und der intrazellulären Seite bis zu diesem Tunnel. Sie enthalten positiv geladene Aminosäuren (z.B. R147 und R451). Diese Ladungsverteilung bildet ein elektrostatisches Feld, welches ein Cl^- -Ion wahrscheinlich in Richtung der Pore leitet.

Experimente, die eine höhere Auflösung erzielten (Dutzler et al., 2003), zeigten innerhalb des Selektivitätsfilters zwei Cl^- -Ionen, die an zwei unabhängigen Bindungsstellen lokalisiert waren: eine zentrale Bindestelle, die bereits in der ersten Kristallstruktur identifiziert worden war (Abb. 1.3 B), und eine weiter zytoplasmatisch liegende, wo der wassergefüllte Vorhof von der intrazellulären Seite bis zum Selektivitätsfilter reicht (Abb. 1.3 C). Am anderen Ende des Filters ragt die negativ geladene Glutamat-Seitenkette von E148 in die Pore (Abb. 1.3 B und C). Ihre Carboxylgruppe verbindet die Enden der α -Helices F und N durch Wasserstoffbrückenbindungen und versperrt so die Pore. Diese Aminosäure könnte deshalb das *fast gate* der beiden Protoporen von ClC-Kanälen darstellen (siehe Abschnitt 1.2.2.4).

Inwiefern diese strukturellen Eigenschaften auch auf ClC-Kanäle höherer Organismen übertragbar sind, bleibt ungeklärt, solange keine Kristallstrukturen von diesen Isoformen erhältlich sind oder bakterielle ClC-Kanäle elektrophysiologisch mit denen von Säugern verglichen werden können. Die Homologie zwischen prokaryotischen ClC-Isoformen und

CIC-0 beträgt nur ca. 20 %. Dennoch sprechen eine Reihe von Experimenten dafür, daß die Verteilung der Helices und die Struktur der Ionenpore in diesen beiden Kanälen vergleichbar und damit auch auf alle eukaryotischen Isoformen übertragbar sind (Lin & Chen, 2003; Miller, 2003).

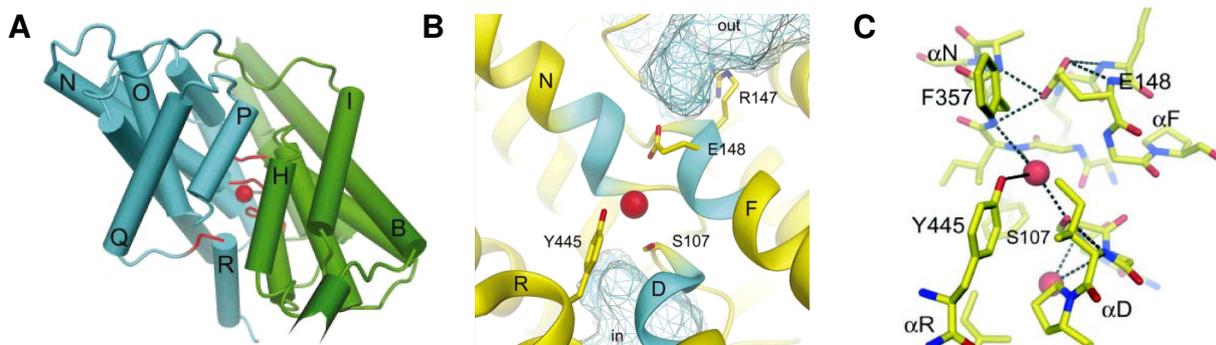


Abbildung 1.3: Selektivitätsfilter von CIC-Kanälen. **A:** Untereinheit von StCIC mit der mutmaßlichen Lage der α -Helices in der Membran zueinander. Die Helices sind als Zylinder dargestellt und die beiden Hälften der Untereinheit in grün und blau. Das permeierende Cl^- -Ion wird durch einen roten Ball symbolisiert. Regionen zwischen den Helices, die ebenfalls an der Bildung des Selektivitätsfilters beteiligt sind, sind rot gezeichnet. **B:** Die Ionenbindestelle aus Sicht der Kontaktregion der beiden Untereinheiten. Die α -Helices sind hier als Bänder dargestellt, die Seitenketten einzelner relevanter Aminosäuren sind stabförmig eingezeichnet. Die positiv geladenen N-Termini der Helices D, F und N sind blau gefärbt. Die wassergefüllten Vorhöfe, die von der extra- und der intrazellulären Seite bis zu dem Selektivitätsfilter reichen, sind als blaue Netze gezeichnet, das Cl^- -Ion als roter Ball. **C:** Gleiche Ansicht der Ionen-Bindestellen wie in B. Nur ausgewählte Aminosäuren und ihre Seitenketten in der Nähe der gebundenen Cl^- -Ionen sind stabförmig dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen werden durch gestrichelte Linien und die Chlorid-Ionen durch rote Bälle symbolisiert. (Abbildungen A und B entnommen aus Dutzler et al., 2002, Abbildung C aus Dutzler et al., 2003)

Die Isoformen höherer Organismen besitzen lange zytoplasmatische N- und C-Termini. (Bei CIC-1 macht der C-Terminus ca. 40 % der gesamten Polypeptidkette aus.) Mutationen im C-terminalen Bereich des Proteins haben einen ausgeprägten Effekt auf das Schaltverhalten von CIC-Kanälen (Beck et al., 1996; Maduke et al., 1998; Hebeisen et al., 2004). Der C-Terminus bzw. die α -Helix R, deren C-terminales Ende auch bei den prokaryotischen CIC-Kanälen in das Zytoplasma ragt, könnte also eine mögliche regulatorische Verbindung zwischen der Funktion des Kanals und intrazellulär ablaufenden Prozessen darstellen.

1.2.2 Funktionelle Eigenschaften von CIC-Kanälen

1.2.2.1 Aktivierung, Inaktivierung und Rektifizierung

Alle CIC-Kanäle, die bisher heterolog exprimiert und elektrophysiologisch untersucht wurden, besitzen ein spannungsabhängiges Schaltverhalten. Die Richtung der Spannungsabhängigkeit ist jedoch für die einzelnen Isoformen unterschiedlich. So werden z.B. CIC-1 und CIC-4 durch Depolarisation aktiviert und deaktivieren bei Hyperpolarisation,

während CIC-2 durch hyperpolarisierende Spannungen aktiviert wird und bei positiven Potentialen weitgehend geschlossen bleibt. Im Fall von CIC-0 zeigen das *fast gate* der Protopore und das beiden Poren gemeinsame *slow gate* entgegengesetzte Spannungsabhängigkeiten: das *fast gate* wird durch Depolarisation aktiviert und deaktiviert bei Hyperpolarisation, während sich das *slow gate* durch Hyperpolarisierung öffnet und bei positiven Spannungen deaktiviert. Bei CIC-2 ist eine Deaktivierung auch nach minutenlanger Hyperpolarisation nicht zu beobachten.

Die Aktivierungseigenschaften vieler CIC-Kanäle werden stark durch pH-Wert und Cl⁻-Konzentration moduliert (Pusch et al., 1995; Fahlke et al., 1996; Rychkov et al., 1996; Clark et al., 1998; Pusch et al., 1999; Haug et al., 2003), was sich in den meisten Fällen in einer Verschiebung der Aktivierungskurve entlang der Spannungsachse zeigt.

Eine spannungsabhängige Inaktivierung des Stromes konnte nur bei CIC-0 beobachtet werden. Bei Einzelkanalmessungen von CIC-0 gibt es bei relativ depolarisierenden Potentialen längere Zeiträume, in denen kein Strom fließt, was als inaktivierter Zustand gedeutet und dem *slow gate* zugeschrieben wurde (Miller & White, 1984).

Die Strom-Spannungskennlinien des offenen Kanals unterscheiden sich innerhalb der CIC-Kanalfamilie: CIC-0 und CIC-2 zeigen eine lineare Strom-Spannungsbeziehung, CIC-1 ist einwärts gleichrichtend, während CIC-3, CIC-4, CIC-5 und CIC-Ka auswärts rektifizieren (Fahlke, 2001). Ob diese makroskopische Rektifizierung auf spannungsabhängiges Schaltverhalten oder auf die Einzelkanalleitfähigkeit zurückzuführen ist, ist nicht für alle Isoformen geklärt. Für CIC-4 konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß der Kanal über den gesamten Spannungsbereich geöffnet bleibt und sich die Einzelkanalleitfähigkeit in Abhängigkeit vom Membranpotential ändert (Hebeisen et al., 2003).

1.2.2.2 Die Ionenpore von CIC-Kanälen

Funktionelle Eigenschaften wie die Einzelkanalleitfähigkeit, Anionenselektivität, das Schaltverhalten oder die Rektifizierung eines Kanals werden durch die Ionenpore bestimmt. Bezüglich dieser Charakteristika herrscht innerhalb der CIC-Familie eine große Variabilität.

Verschiedene frühere Untersuchungen an CIC-0 (Pusch et al., 1995) und CIC-1 (Fahlke et al., 1997c; Fahlke et al., 1997d; Rychkov et al., 1998) deuteten darauf hin, daß die Ionenpore dieser beiden Isoformen zwei verschiedene Bindungsstellen besitzt, eine externe und eine interne, die gleichzeitig Anionen binden können und sich dabei gegenseitig beeinflussen (Fahlke, 2000). Die Bindungsstellen besitzen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Affinität und Anionenselektivität (Fahlke, 2001). Für CIC-4 konnte ebenfalls die Existenz von mindestens zwei Bindungsstellen belegt werden. Auch ein Modell mit drei Bindestellen, einer zentralen mit hoher Affinität und zwei angrenzenden Bindestellen mit niedrigerer Affinität, ist in der Lage, die experimentellen Ergebnisse zu erklären (Hebeisen et al., 2003). Für bakterielle CIC-Kanäle konnten kürzlich mittels Aufnahmen von der

Kristallstruktur drei separate Bindestellen innerhalb der Pore nachgewiesen werden (Dutzler et al., 2003), die simultan von Cl⁻-Ionen besetzt werden können.

1.2.2.3 Anionenselektivität

Die Anionenselektivität bietet eine Möglichkeit, funktionelle Eigenschaften der Ionenpore genauer zu untersuchen. Viele ClC-Kanäle zeigen eine Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ Permeabilitäts-Sequenz (Fahlke, 2001). In ClC-4 und ClC-5 wird diese Abfolge durch den pH-Wert beeinflusst (Friedrich et al., 1999; Kawasaki et al., 1999), was den Schluß nahelegt, daß die Anionenselektivität dieser Kanäle durch eine titrierbare Seitenkette kontrolliert wird.

Anhand der Permeabilität verschieden großer Anionen kann der Porendurchmesser annähernd bestimmt werden. Für ClC-1 wurde er auf ca. 5 Å geschätzt (Fahlke et al., 1997c; Rychkov et al., 1998). Die Pore von ClC-4 scheint hingegen einen größeren Durchmesser zu besitzen (Hebeisen et al., 2003).

Die Permeabilität verschiedener Anionen hängt jedoch nicht nur von der Größe der Anionen selbst ab, sondern auch von ihrer Dehydratisierungsenergie. Erst eine partielle oder vollständige Dehydratisierung, die den Durchmesser des Ionen-Wasser-Komplexes verringert, ermöglicht die Permeation durch die Ionenpore. Die Energie, die für den Dehydratisierungsschritt notwendig ist, ist bei großen Anionen geringer als bei kleineren Anionen und wird aus der Bindung der Ionen an Aminosäuren in der Ionenpore gewonnen. Diese Wechselwirkungen kommen zum Teil durch elektrostatische Kräfte zustande. Die Kombination aus der Stärke des elektrostatischen Feldes und der Dehydratisierungsenergie bestimmt die Affinität der Bindungsstelle für das jeweilige Anion (Hille, 1992).

Ein Modell über die Selektivität von ClC-Kanälen für verschiedene Anionen besagt, daß alle Bindungsstellen von ClC-Kanälen gleichermaßen große, polyatomische Anionen gegenüber kleineren bevorzugen und folglich ein relativ schwaches elektrostatisches Feld besitzen. Die verschiedenen Permeabilitätssequenzen der einzelnen Isoformen kommen durch Unterschiede in der Bindung des Anions an bzw. der Loslösung von der Bindestelle zustande (Fahlke, 2000; Fahlke, 2001). In Kanälen mit einer Cl⁻ > I⁻ oder NO₃⁻ Selektivität, wie z.B. ClC-0, ClC-1 oder ClC-2, ist die Dissoziation der Anionen von der Bindestelle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Anionen, die mit höherer Affinität binden, besitzen eine geringere Permeabilität, da sie länger an der Bindestelle verweilen und somit eine geringere Mobilität innerhalb der Pore besitzen. Affinität und Permeabilität der Anionen verhalten sich in diesen Isoformen also umgekehrt zueinander. In ClC-Kanälen mit einer I⁻ > Cl⁻ Selektivität hingegen, wie z.B. ClC-4, ist die Assoziation der Anionen an die Bindestelle der entscheidende Schritt. Größere, polyatomische Anionen haben eine höhere Permeabilität, und die Permeabilitäts-Sequenz entspricht der Affinität der Bindungsstellen (Hebeisen et al., 2003). Die Isoform-spezifischen Poreneigenschaften von ClC-Kanälen sind demnach auf Unterschiede in der absoluten Interaktions-Energie zwischen Anionen und Bindestelle zurückzuführen, nicht auf unterschiedliche Selektivitäten der Bindestellen.

1.2.2.4 *Gating* in ClC-Kanälen

Der Prozeß des Öffnens und Schließens in Ionenkanälen, der einen Stromfluß von permeablen Ionen ermöglicht, wird als *gating* bezeichnet. Eine fundamentale Voraussetzung für die Spannungsabhängigkeit des *gating*-Prozesses ist die Tatsache, daß die Konformationsänderungen, die beim Öffnen bzw. Schließen des Kanals stattfinden, mit einer Bewegung von elektrischer Ladung über der Zellmembran einhergehen. In vielen spannungsgesteuerten Kationenkanälen ist dies mit der spannungsabhängigen Konformationsänderung eines positiv geladenen Bereichs des Proteins verbunden. Der *gating*-Prozeß und die Permeation von Ionen sind dabei weitgehend voneinander unabhängig. ClC-Kanäle besitzen dagegen keinen intrinsischen Spannungssensor: die Ladung, die hier beim *gating* verschoben wird, wird von dem permeierenden Cl⁻-Ion selbst getragen. Für ClC-0 konnte nachgewiesen werden, daß die Bindung von externem Cl⁻ an eine Bindungsstelle am äußeren Ende der Pore die Voraussetzung für ein Öffnen des Kanals ist (Pusch et al., 1995). Diese Bindung wird durch die extrazelluläre Cl⁻-Konzentration bestimmt. Sie ist jedoch spannungsunabhängig. Die eigentliche Spannungsabhängigkeit wird durch die Bewegung von Ladung vermittelt, die durch den Übergang zwischen verschiedenen Konformationszuständen und der damit verbundenen Einwärtsbewegung des gebundenen Cl⁻-Ions in der Pore zustande kommt. Das gebundene Cl⁻-Ion ist folglich der Ladungsträger, und der Übergang zwischen den verschiedenen Konformationszuständen nach der Bindung von Cl⁻, also die Öffnungsrate, stellt den spannungsabhängigen Prozeß im Schaltvorgang von ClC-0 dar (Chen & Miller, 1996).

Der eigentliche Öffnungsmechanismus, durch den das *gating* in diesen Kanälen vermittelt wird, konnte vor kurzem für den bakteriellen ClC-Kanal von *E. coli* etwas genauer geklärt werden (Dutzler et al., 2003). Die Aufklärung der Kristallstruktur enthüllte eine negativ geladene Glutamat-Seitenkette, die in die Pore hineinragt und einem permeierenden Anion den Weg versperrt (Dutzler et al., 2002). Aus diesem Grund wurde ihr eine mögliche Funktion beim *gating* von ClC-Kanälen zugeschrieben, die bereits durch frühere Untersuchungen an ClC-1 angedeutet wurde (Fahlke et al., 1997b). Nach einer Elimination dieser Seitenkette wurde in der Kristallstruktur des bakteriellen Kanals an dieser Stelle ein drittes Cl⁻-Ion gefunden (Dutzler et al., 2003). Dies könnte der Konformation des Wildtyps im leitenden Zustand entsprechen. Aufgrund dieser Ergebnisse entwickelten Dutzler et al. (2003) ein Modell für die verschiedenen Konformationszustände des Kanals: ist der Kanal geschlossen, sind die interne und die zentrale Bindestelle von Cl⁻-Ionen besetzt, während an die externe Bindestelle die Carboxylgruppe der Glutamatseitenkette gebunden hat. Bei der Öffnung des Kanals schwingt die Seitenkette aus dem Weg, und die externe Bindestelle wird von einem dritten Cl⁻-Ion besetzt. Während die Verknüpfung des *gating*-Prozesses mit der Cl⁻-Konzentration (Pusch et al., 1995; Chen & Miller, 1996) und die Unabhängigkeit der beiden Protoporen (Miller, 1982) in diesem Modell gewährleistet sind, läßt sich jedoch der Effekt von extrazellulärem Chlorid nur schwer damit in Übereinstimmung bringen (Chen,

2003). Andere Versuche deuten an, daß mit dem Öffnungsprozeß von CIC-Kanälen eine grundlegende Konformationsänderung einhergeht, die auch die Bewegung der Glutamat-Seitenkette mit einschließen könnte (Accardi & Pusch, 2003).

Eine andere Form von *gating* wurde für CIC-2 nachgewiesen. Diese CIC-Isoform ist osmosensitiv: hypotone extrazelluläre Lösung verursacht sowohl bei heterolog in *Xenopus*-Oozyten (Gründer et al., 1992) und in Insektenzellen (Xiong et al., 1999) exprimierten als auch bei nativen CIC-2 Kanälen (Carew & Thorn, 1996; Mohammad-Panah et al., 2001) eine schnellere Aktivierung sowie eine vergrößerte Cl⁻-Leitfähigkeit. Die Deletion einer N-terminalen Domäne oder die Substitution mit entsprechenden Regionen aus CIC-1 oder CIC-0 führten zu einem Verlust dieser Osmosensitivität und einem konstitutiv offenen Phänotyp (Gründer et al., 1992). Wurde die deletierte Domäne hingegen in den C-Terminus des Proteins eingefügt, wurde die Osmosensitivität wieder hergestellt. Mutationen in einer vermutlich zytoplasmatischen Region zwischen den Transmembrandomänen des Proteins hatten den gleichen Effekt (Jordt & Jentsch, 1997). Aufgrund dessen schlugen die Autoren ein Modell analog zu dem *ball-and-chain* Modell für die Inaktivierung von *Shaker* K⁺-Kanälen (Zagotta et al., 1990) vor, in dem die N-terminale Domäne mit einem Rezeptor innerhalb des Proteins interagiert und wie ein Ball die Pore verschließt. Niedrige Osmolarität reduziert dem Modell zufolge die Affinität des Rezeptors für den Ball, dessen Dissoziation zur Öffnung des Kanals führen würde. Ergebnisse verschiedener anderer Messungen (Pusch et al., 1999; Varela et al., 2002) lassen dieses Modell allerdings fraglich erscheinen. Der N-Terminus scheint jedoch eine Rolle beim Schaltverhalten von CIC-2 zu spielen.

1.2.3 Physiologische Bedeutung von CIC-Kanälen und ihre Rolle bei genetischen Erkrankungen

Die Bedeutung vieler CIC-Kanäle wird oft schon durch ihr spezifisches Expressionsmuster impliziert, wie z.B. im Fall von CIC-1. Für viele Isoformen konnte die genaue Funktion dennoch erst durch die Verbindung des jeweiligen Gens mit einer Erbkrankheit geklärt werden. Die darauffolgende Klonierung des entsprechenden Kanals und seine elektrophysiologische Untersuchung in einem heterologen Expressionssystem ließ in Kombination mit der geänderten Funktionsweise der Mutation in vielen Fällen Rückschlüsse auf die Rolle des Wildtyp-Kanals zu. Die Existenz verschiedener Tiermodelle mit mutierten oder ausgeschalteten CIC-Kanälen trug ebenfalls zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung dieser Proteine bei (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott, 1999).

1.2.3.1 CIC-1

CIC-1 wird fast ausschließlich in der Skelettmuskulatur exprimiert und vermittelt dort 70-80 % der Ruheleitfähigkeit der Muskelmembran (Steinmeyer et al., 1991a). Dadurch können Skelettmuskelzellen ein ungewöhnlich niedriges Ruhepotential von ca. -90 mV

aufrechterhalten. Bei erhöhter extrazellulärer K^+ -Konzentration nach wiederholter elektrischer Aktivität verhindert die hohe Cl^- -Leitfähigkeit außerdem eine Ausbreitung der Depolarisation über die T-Tubuli-Membran hinaus (Adrian & Bryant, 1974) und sorgt so für eine elektrische Stabilisierung der Muskelmembran.

Mutationen in *ClC-1* führen zu congenitaler Myotonie, einer Muskelkrankheit, die sich durch vorübergehende Muskelsteifheit bei plötzlichen Bewegungen nach einer kurzen Ruhephase äußert (Rüdel & Lehmann-Horn, 1985). Sowohl die dominante (Thomsen's disease) als auch die rezessive (Becker's disease) Form der Myotonie konnten auf Mutationen von *ClC-1* zurückgeführt werden (Koch et al., 1992; George et al., 1993; Heine et al., 1994). In den letzten Jahren wurden über 50 Myotonie-Mutationen in *ClC-1* identifiziert (Wu et al., 2002), die entweder zu einem völligen Funktionsverlust von *ClC-1* führen oder das Schaltverhalten des Kanals drastisch ändern (Fahlke et al., 1995; Kubisch et al., 1998; Warnstedt et al., 2002). In allen Fällen ist die Membranleitfähigkeit für Cl^- stark reduziert, was sich pathologisch in einer Übererregbarkeit des Muskels äußert.

1.2.3.2 *ClC-2*

ClC-2 besitzt ein ubiquitäres Expressionsmuster (Thiemann et al., 1992). Eine Regulation seiner Expression konnte für Aldosteron (Ornellas et al., 2002), Östrogen (Nascimento et al., 2003) und Thyroxin (Ornellas et al., 2003) nachgewiesen werden. Durch Phosphorylierung (Fritsch & Edelman, 1996; Tewari et al., 2000; Furukawa et al., 2002) und verschiedene Wachstumsfaktoren (Bali et al., 2001) konnte eine Modulation des *ClC-2* Stromes erzielt werden, was dafür spricht, daß *ClC-2* Kanäle Ziele interner Signalkaskaden sind. Bezüglich der Modulation durch Phosphorylierung gibt es allerdings widersprüchliche Berichte (Furukawa et al., 1998).

Mehrere physiologische Funktionen wurden für *ClC-2* vorgeschlagen. Der Kanal scheint osmosensitiv zu sein (Gründer et al., 1992; Carew & Thorn, 1996; Fritsch & Edelman, 1997; Xiong et al., 1999; Mohammad-Panah et al., 2001), obwohl Ergebnisse existieren, die im Widerspruch dazu stehen (Bond et al., 1998; Nehrke et al., 2002). In verschiedenen Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von *ClC-2* und der Volumenregulation der Zelle nachgewiesen werden (Furukawa et al., 1998; Xiong et al., 1999). Speicheldrüsenzellen einer *ClC-2* *knock-out* Maus zeigten hingegen eine normale Volumenregulation (Nehrke et al., 2002). Eine Beteiligung von *ClC-2* an der Regulation des Zellvolumens - möglicherweise nur in bestimmten Geweben - bleibt also vorerst ungeklärt. In Neuronen resultiert die heterologe Expression von *ClC-2* in einer Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration und einer Verminderung der exzitatorischen GABA-Antwort (Staley et al., 1996). Der Kanal könnte demnach eine entscheidende Rolle bei der Gewährleistung einer inhibitorischen GABA-Antwort spielen (siehe Diskussion). Eine gestörte *ClC-2* Funktion in Patienten mit epileptischen Anfällen legt eine solche Funktion dieses Kanals nahe (Haug et al., 2003). Auch in Herzmuskelzellen könnte *ClC-2* an der

Kontrolle der Erregbarkeit beteiligt sein (Duan et al., 2000). Der Kanal wird außerdem in Drüsenzellen der Glandula parotis (Park et al., 1998; Arreola et al., 2002) und des Pankreas (Carew & Thorn, 1996) und in Epithelzellen des gastrointestinalen Traktes exprimiert (Cid et al., 2000; Gyömörey et al., 2000, Mohammad-Panah et al., 2001), weshalb ihm eine Rolle beim transepithelialen Transport im Zusammenhang mit der Chloridsekretion zugeschrieben wird. Seine Expression in apikalen Membranen der Lunge (Murray et al., 1996) und die dortige Kolokalisation mit dem CFTR-Kanal machen CIC-2 als alternatives Ziel einer pharmakologischen Behandlung von Patienten mit Cystischer Fibrose interessant (Schwiebert et al., 1998; Kirk, 2000).

Keine der hypothetisierten Funktionen von CIC-2 wurde jedoch durch entsprechende Defekte in einer CIC-2 *knock-out* Maus bestätigt (Bösl et al., 2001; Nehrke et al., 2002). Stattdessen erwiesen sich männliche *Clcn2*^{-/-} Mäuse als unfruchtbar, was auf eine Fehlentwicklung verschiedener hormonbildender Hodenzellen sowie der Spermatozyten zurückzuführen war. Eine Degeneration der Photorezeptoren in der Retina resultierte außerdem in Blindheit. Beide Effekte wurden mit Auswirkungen auf Interaktionen zwischen den degenerierten Zellen und entsprechenden Stützzellen in Verbindung gebracht, bei denen CIC-2 folglich eine Beteiligung (möglicherweise über die pH-Regulation) zugeschrieben wurde. Diese Möglichkeit wurde auch schon durch frühere Studien angedeutet (Gyömörey et al., 2000). In dem Nematoden *C. elegans* scheint CIC-2 eine ähnliche Funktion zu übernehmen (Rutledge et al., 2001; Strange, 2002). Welche genaue Rolle CIC-2 bei interzellulären Signalwegen spielt, bleibt jedoch noch ungeklärt.

1.2.3.3 CIC-Ka und CIC-Kb

Die Expression von CIC-Ka und CIC-Kb - die entsprechenden Isoformen in der Ratte werden als CIC-K1 bzw. CIC-K2 bezeichnet - ist vornehmlich auf die Niere beschränkt (Uchida et al., 1993; Pannabecker et al., 2000). CIC-Ka und CIC-Kb Kanäle sind dort an der Resorption von Cl⁻-Ionen beteiligt. Die physiologische Relevanz von CIC-Kb wurde deutlich, als gezeigt werden konnte, daß das entsprechende Gen bei der Nierenkrankheit Bartter-Syndrom Typ III mutiert ist (Simon et al., 1997). Die Ausschaltung von CIC-K1 führte in transgenen Mäusen zu renalem Diabetes insipidus (Matsumara et al., 1999). Eine ähnliche Rolle von CIC-Ka beim Menschen liegt nahe, konnte aber bisher noch nicht bewiesen werden. Beim Bartter-Syndrom Typ IV (BSND) ist die mit den CIC-K Isoformen assoziierte β -Untereinheit Barttin mutiert (Birkenhäger et al., 2001). Die Taubheit, die mit dieser Krankheit einhergeht, ist dabei höchstwahrscheinlich auf einen Defekt bei der Endolymph-Produktion in der Stria vascularis zurückzuführen, an der unter anderem auch CIC-Ka und CIC-Kb beteiligt sind (Estévez et al., 2001).

1.2.3.4 CIC-3, CIC-4 und CIC-5

Die Expression von CIC-3 konnte in vielen verschiedenen Geweben (Lunge, Herz, Milz, Leber, Niere und Nebenniere) und besonders im Hippocampus und im Cerebellum nachgewiesen werden (Kawasaki et al., 1994). Eine Beteiligung dieses Kanals an der Volumenregulation von Zellen wurde vorgeschlagen (Duan et al., 1997; Wang et al., 2003), obwohl Ergebnisse mit Zellen einer CIC-3 *knock-out* Maus dagegen sprechen (Stobrawa et al., 2001). Andere Daten weisen darauf hin, daß CIC-3 hauptsächlich in den intrazellulären Membranen z.B. von synaptischen Vesikeln lokalisiert ist (Shimada et al., 2000) und dort an der intravesikulären Azidifizierung beteiligt ist (Stobrawa et al., 2001).

CIC-4 wird hauptsächlich im Gehirn und in der Skelettmuskulatur exprimiert, ist aber auch im Herzen, in der Leber und in der Niere nachweisbar (van Slegtenhorst et al., 1994). Seine physiologische Bedeutung ist ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt. Genau wie CIC-3 und CIC-5 ist auch CIC-4 vornehmlich in endosomalen Membranen lokalisiert. In Absorptionsepithelien in der Niere ist er zusammen mit CIC-5 wahrscheinlich an der pH-Regulation von Zellkompartimenten und am intrazellulären Transport von Rezeptoren beteiligt (Mohammad-Panah et al., 2003). Mäuse mit ausgeschaltetem CIC-4 Gen zeigten jedoch keinen auffälligen Phänotyp (Rugarli et al., 1995).

CIC-5 wird am stärksten in der Niere exprimiert und wurde als möglicher Kandidat für das Gen kloniert, das in der Nierenkrankheit „Dent’s disease“ mutiert ist (Fisher et al., 1994). Mehrere Punktmutationen in CIC-5 wurden in Patienten mit dieser Krankheit gefunden und konnten in heterologen Expressionssystemen mit einer Veränderung der Kanalfunktion in Verbindung gebracht werden (Lloyd et al., 1996). Die Ausschaltung des CIC-5 Gens in Mäusen führte zu ähnlichen Syndromen (Piwon et al., 2000).

1.2.3.5 CIC-6 und CIC-7

CIC-6 und CIC-7 werden nahezu ubiquitär exprimiert und sind wahrscheinlich hauptsächlich in intrazellulären Membranen lokalisiert, weswegen ihre heterologe Expression in *Xenopus*-Oozyten zu keinen meßbaren Strömen führte (Brandt & Jentsch, 1995). Über die Funktion von CIC-6 ist deswegen wenig bekannt. Mutationen des CIC-7 Gens führen in Menschen und Mäusen zu Osteopetrose, einer Knochenkrankheit, die sich durch ein Fehlen des Knochenmarkraums äußert und durch unzureichende Knochenresorption der Osteoklasten verursacht wird (Kornak et al., 2001; Waguespack, 2003).

1.3 Idiopathische generalisierte Epilepsie (IGE)

1.3.1 Epilepsie-Klassifikationen und verschiedene IGE-Subtypen

Als Epilepsie bezeichnet man ein Krankheitsbild mit wiederkehrenden Anfällen, die sich sowohl auf die Motorik als auch auf das Bewußtsein auswirken können. Die Ursache dafür scheinen paroxysmale, synchronisierte elektrische Entladungen im Gehirn zu sein, die durch ein Ungleichgewicht von inhibitorischer und exzitatorischer Aktivität der Neuronen hervorgerufen werden. Ungefähr 3 % der gesamten Weltbevölkerung sind von Epilepsie betroffen. Die verschiedenen Arten von Epilepsie werden unterteilt in partielle und generalisierte Anfälle. Partielle Anfälle betreffen bei ihrem Ausbruch zunächst nur einen Focus im Gehirn und können sich sekundär zu generalisierten Anfällen ausweiten. Bei generalisierten Anfällen sind von Beginn an beide Hirnhälften betroffen (Westbrook, 2000). Diese Einteilung kann weiter aufgegliedert werden in idiopathische oder primäre Epilepsien, die einen genetischen Ursprung haben, und symptomatische oder sekundäre Epilepsien, die auf Läsionen des Gehirns z.B. durch einen Tumor oder perinatalen Sauerstoffmangel zurückzuführen sind (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989), bei denen aber auch genetische Faktoren eine Rolle spielen können (Scheffer & Berkovic, 2000). Daneben gibt es noch weitere „kryptogene“ Formen, deren Ursache nicht eindeutig feststellbar ist.

Idiopathische Formen machen etwa 40 % aller Epilepsien aus (Gardiner, 1999). Sie werden definiert über einen altersbedingten Ausbruch, klinische und elektroencephalographische Charakteristika und eine vermutlich genetische Ursache. Die häufigste Form ist Idiopathische Generalisierte Epilepsie (IGE). Einige IGE-Subtypen - entsprechend der Klassifizierung der Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) - und ihr jeweils häufigster Phänotyp sind in Tabelle 1.1 aufgelistet.

Viele Epilepsie-Syndrome umfassen verschiedene Anfallstypen und beginnen in einem charakteristischen Alter. Das Auftreten von Anfällen im Erwachsenenalter ist in vielen IGE-Formen mit dem Schlaf-Wach-Rhythmus verknüpft. Alkohol, Drogen oder Stress können zusätzliche aktivierende Faktoren darstellen (Andermann & Berkovic, 2001).

Alle IGE-Subtypen können im Elektroencephalogramm durch das plötzliche Auftreten von Spitzen und Wellen („*spike-wave-activity*“) in allen cerebralen Arealen identifiziert werden, die genauso plötzlich wieder verschwinden. Dieses charakteristische Muster spiegelt die synchronisierte neuronale Übererregbarkeit wider, die epileptischen Anfällen zugrunde liegt. Sie ist auf eine komplexe thalamocorticale Verschaltung zurückzuführen, in der Pyramidenzellen aus dem Cortex über exzitatorische Synapsen reziprok mit thalamischen Schaltneuronen und inhibitorischen GABAergen Neuronen im Nucleus reticularis thalami verbunden sind (Westbrook, 2000). Die GABA-vermittelte Inhibition stellt ein wichtiges Gegengewicht der neuronalen Erregbarkeit dar und besitzt somit eine bedeutende

Funktion sowohl beim Mechanismus als auch bei der pharmakologischen Behandlung von Epilepsie (Treiman, 2001).

Tabelle 1.1: Subtypen idiopathischer generalisierter Epilepsie

Bezeichnung	Phänotyp
CAE (Absence Epilepsie in der Kindheit oder Pyknolepsie)	Anfälle mit kurzem Bewußtseinsverlust (10 - 20 s); Manifestation im Alter von 6 - 7 Jahren
JAE (Absence Epilepsie in der Jugend)	Anfälle mit kurzem Bewußtseinsverlust (10 - 20 s), generalisierte tonisch-klonische oder myoklonische Anfälle gehen oft voraus; Manifestation in der Pubertät
JME (Juvenile myoklonische Epilepsie oder Impulsive Petit mal)	Myoklonische Anfälle mit bilateralen Zuckungen hauptsächlich der Arme, die normalerweise am Morgen auftreten; Manifestation in der Pubertät
EGMA (Epilepsie mit Grand mal-Anfällen beim Aufwachen)	Generalisierte tonisch-klonische Anfälle, die typischerweise beim Aufwachen auftreten, oft provoziert durch Schlafentzug; Manifestation meist im Alter von 10 - 20 Jahren
BFNC (Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe)	Generalisierte klonische Anfälle, die normalerweise am 2. oder 3. Lebenstag auftreten und nach ca. einer Woche seltener werden oder völlig verschwinden
GEFS ⁺ (Generalisierte Epilepsie mit fiebrigen Anfällen plus)	Heterogene Epilepsie-Phänotypen, die generalisierte Anfälle bei akuten fiebrigen Erkrankungen beinhalten; Manifestation im Alter zwischen 3 Monaten und 6 Jahren (GEFS), die auch darüber hinaus anhalten können (GEFS ⁺)

1.3.2 Genetische Ursachen

Die häufigeren Formen von IGE wie CAE, JAE oder JME (siehe Tabelle 1.1) haben einen komplexen Vererbungsgang, in dem mehrere Gene interagieren und so ein Epilepsie-Syndrom hervorrufen. Obwohl einige Gene in großen Familien mit Epilepsie gefunden wurden, die für den Haupteffekt verantwortlich sind, können sie die phänotypische Heterogenität in diesen Familien nicht erklären (Scheffer & Berkovic, 2003). Viele der mit Epilepsie assoziierten Gene codieren spannungsabhängige oder ligandengesteuerte Ionenkanäle. Der beste Beweis dafür, daß einzelne Gene für neuronale Krankheiten verantwortlich sind, ist der Nachweis einer geänderten Kanalfunktion. Die genauen Konsequenzen daraus können jedoch nur vermutet werden, da in den komplexen neuronalen Verschaltungen andere Faktoren modulierende oder substituierende Einflüsse haben können, die bei *in vitro* Studien nicht nachvollziehbar sind (Kullmann, 2002). Einige weniger häufige idiopathische Epilepsien werden jedoch autosomal dominant vererbt und konnten als monogen identifiziert werden.

1.3.2.1 Mutationen in ligandengesteuerten Ionenkanälen

Als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS ist GABA ein naheliegendes Ziel bei der Entstehung von Epilepsie. In zwei verschiedenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors konnten tatsächlich Mutationen gefunden werden, die mit verschiedenen IGE-Formen in Verbindung gebracht werden. *GABRG2*, welches die γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors codiert, ist in mehreren Familien mit GEFS⁺ und CAE mutiert (Kananura et al., 2002). *In vitro*-Studien konnten eine Reduktion des GABA-vermittelten Cl⁻-Stromes und eine verminderte Sensitivität des GABA_A-Rezeptors für Benzodiazepine auf Mutationen in dieser Untereinheit zurückführen (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001). In einer Familie mit JME wurde außerdem eine Mutation in *GABRA1* identifiziert, dem Gen für die α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors. Hier konnten in *Xenopus*-Oozyten ebenfalls verringerte GABA-aktivierte Ströme nachgewiesen werden (Cossette et al., 2002).

Auch in nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren, die als Kationenkanäle in präsynaptischen Endigungen sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Funktionen haben, wurden verschiedene Epilepsie-verursachende Mutationen gefunden. In Familien mit ADFLE (autosomal dominante nächtliche Frontallappen Epilepsie, die als partielle idiopathische Epilepsie klassifiziert wurde) wurden Mutationen in *CHRNA4* und *CHRN2* identifiziert, welche die α_4 - bzw. die β_2 -Untereinheit von neuronalen Acetylcholin-Rezeptoren codieren. Die Mutationen führten in heterologen Expressionssystemen zu einer verlängerten Öffnung des Kanals (Scheffer & Berkovic, 2003).

1.3.2.2 Mutationen in spannungsgesteuerten Ionenkanälen

In Genen für drei verschiedene Untereinheiten von spannungsgesteuerten Natriumkanälen wurden Mutationen gefunden, die mit idiopathischer Epilepsie in Verbindung gebracht werden. Dabei handelt es sich um *SCN1A* und *SCN2A*, zwei Gene, die die α -Untereinheiten der Natriumkanäle Nav1.1 und Nav1.2 codieren, sowie um *SCN1B*, das Gen der β -Untereinheit von Nav1.1. In heterologen Expressionssystemen führten alle Mutationen zu einem länger andauernden, einwärtsgerichteten Na⁺-Strom, was in Übererregbarkeit resultieren kann. Klinisch äußerte sich dies in allen Fällen in GEFS⁺. Mutationen in der α -Untereinheit von Nav1.2 wurden außerdem in Familien mit einer Form von BFNC entdeckt (Scheffer & Berkovic, 2003).

Diese autosomal-dominante Epilepsie-Form konnte auch mit verschiedenen Mutationen in zwei K⁺-Kanälen in Verbindung gebracht werden. Die Gene *KCNQ2* und *KCNQ3* codieren die α -Untereinheiten von zwei Mitgliedern der KQT-Subfamilie von Kaliumkanälen, die im Gehirn exprimiert werden. Dort vermitteln sie den M-Strom, der an der Regulation der unter-schweligen neuronalen Erregbarkeit beteiligt ist (Wang et al., 1998). Alle mit BFNC assoziierten Mutationen von *KCNQ2* und *KCNQ3* führen zu einem Verlust der Kanalfunktion und somit einem reduzierten K⁺-Strom, was in gesteigerter neuronaler Erregbarkeit resultiert.

BFNC stellt damit eine der seltenen monogenen Epilepsien dar (Jentsch, 2000). Die α -Untereinheit eines anderen K^+ -Kanals (*KCNA1*) ist in episodischer Ataxie mutiert, einer autosomal-dominanten Störung, die durch periodisch auftretende Phasen mit beeinträchtigtem Gleichgewicht und Myokymie charakterisiert ist. In Familien mit episodischer Ataxie tritt Epilepsie überdurchschnittlich häufig auf, was auf einen sekundären Effekt der *KCNA1*-Mutationen hindeutet (Scheffer & Berkovic, 2003). Die zahlreichen Mutationen verursachen alle eine Veränderung der Stromamplitude und -kinetik, was zu einer Verminderung des K^+ -Stromes während der Depolarisation führt. Mehrere der mutierten Untereinheiten besitzen einen dominant-negativen Effekt (Kullmann, 2002).

Die Bedeutung von Ca^{2+} -Kanal-Genen wurde durch verschiedene *knock-out* Mäuse aufgezeigt, die Absence-Epilepsien und episodische Ataxie aufwiesen. Diese Kombination tritt in Menschen selten auf und könnte möglicherweise mit Mutationen des *CACNA1A*-Gens, welches die α_{1A} -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals *Ca_v2.1* codiert, oder des *CACNB4*-Gens für die β_4 -Untereinheit zusammenhängen (Kullmann, 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen etablieren CIC-2 als ersten Chloridkanal, der in Epilepsie-Patienten mutiert ist. In drei nicht miteinander verwandten IGE-Familien wurden drei verschiedene heterozygote Mutationen von *CLCN2* gefunden, die zusammen mit den IGE-Charakteristika weitervererbt wurden (Haug et al., 2003). In den hier durchgeführten Experimenten konnte ein Einfluß aller drei Mutanten auf die Kanalfunktion nachgewiesen werden, der eine mögliche Erklärung für das Auftreten eines epileptischen Phänotyps darstellt.

1.4 Ziel der Arbeit

Der CIC-2 Kanal ist ein Mitglied der CIC-Familie von Chloridkanälen. Seit seiner Klonierung im Jahre 1992 wurden CIC-2 Kanäle verschiedener Spezies identifiziert und einige ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften beschrieben. Der humane CIC-2 Kanal (hCIC-2) war jedoch elektrophysiologisch noch nicht ausführlich untersucht worden (lediglich die für viele CIC-Kanäle typische $Cl^- > I^-$ Selektivität und die für CIC-2 charakteristische Aktivierung durch niedrigen extrazellulären pH-Wert und hypotones Medium waren für die menschliche Isoform bereits nachgewiesen worden (Schwiebert et al., 1998; Tewari et al., 2000, Mohammad-Panah et al., 2001)). Im Rahmen dieser Arbeit sollte hCIC-2 deswegen in einem heterologen Expressionssystem funktional charakterisiert und seine Eigenschaften mit den bereits beschriebenen anderer CIC-2 Isoformen verglichen werden. Ein direkter Vergleich mit dem CIC-2 Kanal der Ratte sollte klären, inwieweit verschiedene Charakteristika zwischen den unterschiedlichen Isoformen übertragbar sind.

Für den zytoplasmatischen N-Terminus von CIC-2 war eine mögliche Funktion als Inaktivierungsdomäne vorgeschlagen worden (Gründer et al., 1992). Diese Hypothese sollte mit Hilfe einer Deletionsmutante unter den hier verwendeten Meßbedingungen getestet und

so die Bedeutung des N-Terminus für das Schaltverhalten von CIC-2 genauer untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war eine detaillierte Analyse des Blocks von CIC-2 Kanälen durch Iodid-Ionen. Anhand der charakterisierten Eigenschaften des Iodidblocks sollte das Modell zur Inaktivierung von CIC-2 erneut auf seine Plausibilität hin überprüft werden.

Für andere CIC-Kanäle wurde bereits eine enge Verknüpfung des Schaltverhaltens sowohl mit der internen als auch der externen Chloridkonzentration nachgewiesen. Während die Auswirkungen einer Erhöhung der extrazellulären Chloridkonzentration auf CIC-2 bereits untersucht wurden (Pusch et al., 1999), war über den Einfluß der intrazellulären Chloridkonzentration auf die Wildtyp-Isoform von CIC-2 noch nichts bekannt. Der intrazelluläre Chloridgehalt ist für die GABAerge Inhibition in Neuronen des Hippocampus von entscheidender Bedeutung. CIC-2 wird in diesen Zellen besonders stark exprimiert, und verschiedene Untersuchungen deuteten bereits eine wichtige Rolle von CIC-2 Strömen für die Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären Chloridkonzentration und somit für die Gewährleistung einer inhibitorischen GABA-Antwort an. Aus diesem Grund sollten die Auswirkungen einer Veränderung der intrazellulären Chloridkonzentration auf das Schaltverhalten von CIC-2 untersucht und anhand dessen die hypothetisierte Funktion von CIC-2 für die neuronale Chlorid-Homöostase im Gehirn überprüft werden.

Des Weiteren sollten drei kürzlich entdeckte Mutationen von CIC-2 in Patienten mit idiopathischer generalisierter Epilepsie (IGE) untersucht werden. Basierend auf den elektrophysiologischen Eigenschaften der mutierten Kanäle in einem heterologen Expressionssystem sollte eine mögliche Erklärung für das Auftreten von epileptischen Anfällen im Zusammenhang mit einer geänderten Funktionsweise von CIC-2 gefunden werden, was zu neuen Einsichten in die Pathophysiologie von IGE führen könnte.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien entsprachen der Güteklasse „*pro analysi*“ und wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Seelze) bezogen.

2.2 Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

- a) pCI neo eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen (Promega, Mannheim)
- b) pBK/RSV dualer Expressionsvektor zur Expression sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)
- c) pcDNA 3.1 eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen (Invitrogen, Karlsruhe)
- d) pRc/CMV eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen (Invitrogen, Karlsruhe)
- e) pE eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen (Clontech, Palo Alto, USA)

In den verschiedenen Vektoren waren folgende Konstrukte inseriert:

a) in pCI neo

rClC-2 WT	Untereinheit des ClC-2 Kanals der Ratte (das Plasmid wurde freundlicherweise von J.E. Melvin zur Verfügung gestellt)
rClC-2 Δ 16-61	mutierte Ratten-ClC-2 Kanal-Untereinheit, in der die Aminosäuren 16-61 deletiert sind

b) in pBK/RSV

hClC-2	Untereinheit des humanen ClC-2 Kanals (das Plasmid wurde freundlicherweise von G.R. Cutting zur Verfügung gestellt)
--------	---

c) in pcDNA 3.1

hCIC-2 NotI	Untereinheit des humanen CIC-2 Kanals; dieses Konstrukt wurde aus dem pBK/RSV hCIC-2 hergestellt, indem an hCIC-2 N-terminal eine NotI-Schnittstelle angehängt wurde und das Insert dann in den pcDNA 3.1 Vektor umkloniert wurde
hCIC-2 M200fsX231	mutierte humane CIC-2 Kanal-Untereinheit; die Untereinheit besitzt ein sekundäres Stop-Codon durch eine Leseraster-Verschiebung in Folge einer Insertion (597insG), das codierte Protein ist nach der 230. Aminosäure abgeschnitten
hCIC-2 DT	humane CIC-2 Untereinheit, an die C-terminal ein 20 Aminosäuren langer Linker angehängt wurde, um Dimer-Konstrukte herzustellen (Fahlke et al., 1997a)
hCIC-2 Dimer WT/WT	Dimer aus zwei humanen CIC-2 Untereinheiten, die durch einen 20 AS-langen Linker verbunden sind
EAAT2	humaner Glutamattransporter

d) in pRc/CMV

hCIC-2 XbaI	humane CIC-2 Untereinheit; dieses Konstrukt wurde aus dem pcDNA 3.1 hCIC-2 NotI hergestellt, indem an hCIC-2 C-terminal eine XbaI-Schnittstelle angehängt wurde und das Insert dann in den pRc/CMV Vektor umkloniert wurde
hCIC-2 FCYENE XbaI	humane CIC-2 Untereinheit, an die C-terminal ein eR-Export-Signal (Ma et al., 2001) angehängt wurde
hCIC-2 G715E	mutierte humane CIC-2 Untereinheit; das Glycin an Position 715 ist aufgrund einer Punktmutation (G2144A) durch ein Glutamat ersetzt
hCIC-2 G715E FCYENE	mutierte humane CIC-2 Untereinheit; das Protein besitzt außer der substituierten Aminosäure ein C-terminales eR-Export-Signal
hCIC-2 M200fsX231 FCYENE	mutierte humane CIC-2 Untereinheit; das Protein ist nach der 230. Aminosäure abgeschnitten und besitzt außerdem ein eR-Export-Signal am C-Terminus
Dimer hCIC-2 WT / hCIC-2 M200fsX231 FCYENE	Dimer aus zwei humanen CIC-2 Untereinheiten; die erste hCIC-2 Untereinheit ist dabei der Wildtyp, die zweite die nach der 230. Aminosäure abgeschnittene Mutante

hCIC-2 del74-117 FCYENE	mutierte humane CIC-2 Untereinheit mit einem eR-Export-Signal am C-Terminus; in dem Protein sind die Aminosäuren 74-117 deletiert
Dimer hCIC-2 WT / hCIC-2 del74-117	Dimer aus zwei humanen CIC-2 Untereinheiten; die erste ist dabei der hCIC-2 Wildtyp, die zweite die oben beschriebene del74-117 Mutante
Dimer hCIC-2 del74-117 / hCIC-2 WT	Dimer aus zwei humanen CIC-2 Untereinheiten; die erste ist dabei die oben beschriebene del74-117 Mutante, die zweite der hCIC-2 Wildtyp
hCIC-2 Y17H R210H	humane CIC-2 Untereinheit, in der zwei Punktmutationen (C49T, A629G) rückgängig gemacht wurden, die den Austausch zweier Aminosäuren zur Folge hatten, was in einem Fall ein Retentionssignal erzeugte
YFP hCIC-2 Y17H R210H	humane CIC-2 Untereinheit, an die N-terminal ein YFP angehängt wurde; das YFP wurde aus dem pEYFP N1 Plasmid herausgeschnitten
YFP hCIC-2 M200fsX231 FCYENE	mutierte humane CIC-2 Untereinheit mit einem N-terminal angehängten YFP, einem C-terminal angehängten eR-Export-Signal und der oben beschriebenen M200fsX231-Mutation
YFP hCIC-2 del74-117 FCYENE	mutierte humane CIC-2 Untereinheit mit einem N-terminal angehängten YFP, einem C-terminal angehängten eR-Export-Signal und der oben beschriebenen del74-117-Deletion
YFP Dimer hCIC-2 WT / hCIC-2 M200fsX231 FCYENE	Dimer aus einer humanen CIC-2 Wildtyp-Untereinheit und der nach der 230. Aminosäure abgeschnittenen Mutante, an das N-terminal ein YFP angehängt wurde
YFP Dimer hCIC-2 WT / hCIC-2 del74-117 FCYENE	Dimer aus einer humanen CIC-2 Wildtyp-Untereinheit und der del74-117 Mutante, an das N-terminal ein YFP angehängt wurde
CFP hCIC-2 Y17H R210H	humane CIC-2 Kanaluntereinheit, an die N-terminal ein CFP angehängt wurde; das CFP wurde aus dem pECFP N1 Plasmid herausgeschnitten
CFP EAAT2	humaner Glutamattransporter, an den N-terminal ein CFP angehängt wurde

e) in pE

CFP N1	optimierte Variante des CFP (<i>cyan fluorescent protein</i>)
YFP N1	optimierte Variante des YFP (<i>yellow fluorescent protein</i>)
CFP-YFP	Fusionskonstrukt aus CFP und YFP, die über einen 20 AS-Linker aneinandergelängt sind (Schmid et al., 2001); das Plasmid wurde freundlicherweise von H.H. Sitte zur Verfügung gestellt

2.3 Oligonukleotide

Die in der PCR als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die Sequenzen der eingesetzten Primer werden in der folgenden Zusammenstellung aufgelistet:

Konstrukt	Primer
rCIC-2 Δ 16-61	sense 5'-TAT GTT CAT TAT GAA TTC ATG GCG GCC GCA ACG GCC GCG GCG GCG ACG GTG GCG GGG GAA CGG GCT ACC CCA GAG CTC CTA GAA TAT GGA CAG-3'
	antisense 5'-TCA ATG CTG AAT AGG ACC CCT CCG ATT GGT GCG-3'
hCIC-2 NotI	sense 5'-ATG CAT GCA TGC GGC CGC CAT GGC GGC TGC GGC GGC GGA-3'
	antisense 5'-GCA TCG GGC GCA ACG GCT CC-3'
hCIC-2 XbaI	sense 5'-GGG AGT GGA CCA TGC TTA TGT CAC CAG TAT-3'
	antisense 5'-GCC ACC CAC GTC TAG ATC ATT GGC ATT TGT CGT CGC TGT CGG AAG G-3'
hCIC-2 FCYENE XbaI	sense 5'-GGG AGT GGA CCA TGC TTA TGT CAC CAG TAT-3'
	antisense 5'-AAT AGG GCC CTC TAG ATT AGA ACT CGT TCT CAT AAC AGA ATT GGC ATT TGT CGT CGC TGT CGG AAG GGC T-3'
hCIC-2 M200fsX231	sense 5'-CAG TAC CTG GCC TGG GTC ACC TAC CCT GTT GTC CTC ATC ACT TTC TCA GC-3'
	antisense 5'-TAT GCA CAA AAG GGC CCT CTT TGC CAA GCG GCA TCC CCG CTG CCT AGG GCG CAG GT-3'
hCIC-2 M200fsX231 FCYENE	sense 5'-CAG TAC CTG GCC TGG GTC ACC TAC CCT GTT GTC CTC ATC ACT TTC TCA GC-3'
	antisense 5'-AAT AGC GGT ACC TTA GAA CTC GTT CTC ATA ACA GAA TAG ATA CCC CCA AAG AGG GAG AGG AAC TTG CTG AGA AGG GCA GCA CAC AT-3'

hCIC-2 del74-117 FCYENE	sense	5'-CGG ATC CAC TAG TAA CGG CCG-3'
	antisense	5'-TCA AGC CCC GGG ACA TCC ACT GCT GGG CGC GGC ATC GGG CGC AAC G-3'
hCIC-2 G715E	sense	5'-CCT CGG AGA GAG TCC CAC AGA GAG CGC AGA GTC GGC AGG C-3'
	antisense	5'-CGG GGG AGG GGC AAA CAA CAG ATG GCT GGC AAC TAG AAG GCA C-3'
hCIC-2 G715E FCYENE	sense	5'-CCT CGG AGA GAG TCC CAC AGA GAG CGC AGA GTC GGC AGG C-3'
	antisense	5'-AAT AGG GCC CTC TAG ATT AGA ACT CGT TCT CAT AAC AGA ATT GGC ATT TGT CGT CGC TGT CGG AAG GGC T-3'
hCIC-2 DT	sense	5'-ACT GCT GGG AGT GGA CCA TGC T-3'
	antisense	5'-ATG TAG CAT GCA GGT ACC CTA AGC GGC CGC AAT TGC ATA GTC AGG TAC GTC ATA AGG ATA TAG TCC AGG ATG TAG CGG TGA TTG GCA TTT GTC GTC GCT GTC G-3'
hCIC-2 R210H	sense	5'-GCC GCT TGG CAA AGA GGG CCC TTT TGT GCA TAT CGC AAG CAT GTG TGC TG-3'
	antisense	5'-CGC ATC ACC TGG ACA ATC TTC CGG TTC AGG TAG ACA AAG AGG GCT CCA CC-3'
hCIC-2 Y17H	sense	5'-AGG AAG GGA TGG AGC CAC GGG CGC TGC AAC ACG AGC-3'
	antisense	5'-TGC TGG TGT TCA AGC CCC GGG ACA TCC ACT GCT GAG CTT GCA GAC AGG-3'

2.4 Prokaryotische Zellen

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA und für die Klonierung wurden *E. coli* Bakterien vom Stamm DH5 α verwendet. Rekombinante Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium angezüchtet, dem 100 μ g/ml Ampicillin zugegeben wurde. Stammkulturen zur längerfristigen Aufbewahrung wurden mit 25 % Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

Die Herstellung von LB-Nährböden erfolgte durch Zugabe von 1,5 % Bacto-Agar (Life Technologies, Karlsruhe).

LB-Flüssigmedium

NaCl	20 mM
Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA)	1 %
Bacto-Hefeextrakt (Difco)	0,5 %

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0-7,5 eingestellt.

2.5 Eukaryotische Zellen

2.5.1 Medien und Lösungen

Alle für die Zellkultur verwendeten Medien und Substanzen wurden, sofern im Text nicht anders erwähnt, bei der Firma Gibco, Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Sämtliche Kulturmedien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung mit einem 0,22 µm Sterilfilter (Millipore, Bedford, MA, USA) filtriert.

Medium für HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen wurden in MEM Medium kultiviert, dem 10 % hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml) und 2 mM L-Glutamin zugesetzt wurde. Für stabil transfizierte HEK293-Zellen wurde dem Medium außerdem noch 0,09 % Geneticin (G-418 Sulfat) hinzugefügt.

Medium für tsA201-Zellen

Die tsA201-Zellen wurden in DMEM Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml) und 2 mM L-Glutamin kultiviert.

HEBS

NaCl	274 mM
HEPES	40 mM
Dextrose	12 mM
Na ₂ HPO ₄	1,4 mM
KCl	10 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,05 eingestellt.

PBS⁺⁺ (1x)

NaCl	200 mM
KCl	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

2.5.2 Zelllinien

Alle in dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle wurden heterolog exprimiert. Dafür wurden sowohl stabil als auch transient transfizierte Zellen verwendet. Die stabil transfizierten Zelllinien bestanden aus HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), für die transiente Transfektion wurden tsA201-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich ebenfalls um HEK293-Zellen, die das große T-Antigen des SV40-Virus in ihr Genom inkorporiert haben und sich deshalb durch eine höhere Transfektionseffizienz auszeichnen.

Zur Erzeugung einer stabilen hCIC-2 Zelllinie wurden die Zellen zunächst nach der in Abschnitt 2.5.5 aufgeführten Methode transfiziert. Zur Selektion der Zellen, die das transfizierte Plasmid dauerhaft in ihr Genom eingebaut hatten, wurde 24 Stunden nach der Transfektion das normale Kulturmedium durch Geneticin-haltiges ersetzt. (Ein Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum war auf dem transfizierten Plasmid enthalten.) Nach ca. 3 Wochen, in denen regelmäßig das Medium erneuert wurde, wurden die überlebenden Zellen mit Hilfe von Klonierungsringen (150 µl, Sigma) kloniert und die Expression des transfizierten Kanals elektrophysiologisch überprüft.

2.5.3 Kultivierung der Zellen

Alle Zellen wurden in Zellkulturschalen (Falcon, Heidelberg) in einem Begasungsbrutschrank (Typ Heracell, Heraeus, Hanau) in wassergesättigter Luft bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Wenn der Zellrasen zu etwa 90 % konfluent war, wurden sie auf neue Kulturschalen umgesetzt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA vom Boden gelöst und mit Hilfe einer Pipette vereinzelt. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:20 in neue Kulturschalen mit frischem Medium gegeben.

Für die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop wurden die Zellen auf mit Poly-D-Lysin (0,1 µg/ml) beschichteten Deckgläschen (Superior, Marienfeld, Lauda-Königshofen) kultiviert.

2.5.4 Aufbewahrung der Zellen

Von allen Zelllinien wurden 1 ml Aliquots in Cryoröhrchen (Nalgene, Rochester, USA) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst, abzentrifugiert (3 Minuten bei ca. 300 g) und in 3 ml Gefrierlösung 1 (60 % MEM, 40 % FBS) resuspendiert. 0,5 ml Aliquots davon wurden mit jeweils 0,5 ml Gefrierlösung 2 (40 % MEM, 40 % FBS, 20 % Dimethylsulfoxid, Sigma) vermischt und in Cryoröhrchen bei -80 °C in einem Cryo-

Einfriergerät (Nunc, Rochester, USA) eingefroren. Nach 24 Stunden wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Nach dem Auftauen unter heißem Wasser wurden die Zellen mehrfach in frischem Medium abzentrifugiert, um das restliche Dimethylsulfoxid zu entfernen. Die Zellsuspension wurde dann in eine Kulturschale gefüllt und im Brutschrank inkubiert.

2.5.5 Transfektion der Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in lebende eukaryotische Zellen. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die Calcium-Phosphat-Methode verwendet (Graham und van der Eb, 1973). Das Calciumphosphat bildet dabei zusammen mit der DNA ein Präzipitat, welches ausfällt und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen wird, wodurch auch die DNA in die Zellen gelangt (Sambrook et al., 1989).

Für einen Transfektionsansatz wurde die gewünschte Menge des Kanal-Plasmids mit 10 μ l Lachssperma vermischt. Für die transienten Transfektionen wurden außerdem noch 2 μ g eines Plasmids kotransfiziert, das das CD8-Antigen codiert. Etwa 5 Minuten vor den elektrophysiologischen Experimenten wurden sogenannte Dynabeads mit einem Durchmesser von 4,5 μ m (Dynal, Oslo, Norwegen) auf die Zellen gegeben, die mit dem entsprechenden Antikörper beschichtet waren und an den Zellen hafteten, die das CD8-Antigen exprimierten. Diese Methode (Jurman et al., 1994) ermöglicht die Unterscheidung transfizierter von nicht transfizierten Zellen.

Zu dem DNA-Gemisch wurden 500 μ l 250 mM CaCl_2 hinzugefügt. Die CaCl_2 -DNA-Mischung wurde dann tropfenweise in 500 μ l HEBS-Lösung gegeben. Der Transfektionsansatz wurde 20-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er auf eine Kulturschale mit Zellen gegeben wurde, in der unmittelbar vorher das Medium gewechselt worden war. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt.

Die elektrophysiologischen Messungen wurden 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Von jedem untersuchten Konstrukt wurden zwei verschiedene Klone verwendet, um etwaige Klonierungsartefakte auszuschließen.

2.5.6 Fixierung der Zellen

Für die FRET-Mikroskopie war es erforderlich, die Zellen zu fixieren. Die transfizierten und auf beschichteten Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zweimal mit PBS^{++} gewaschen und dann 20 Minuten in 3 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie erneut mit PBS^{++} gewaschen und für 5 Minuten in 50 mM NH_4Cl in PBS^{++} inkubiert. Alle Inkubationen fanden bei Dunkelheit statt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe zu vermeiden. Die Deckgläschen wurden dann mit der bewachsenen Seite nach unten mit einem Tropfen Moviol (Calbiochem, San Diego, USA) auf einem Objektträger fixiert.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

2,5 ml einer Übernachtskultur wurden in 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ in einem Schüttler bei 37 °C und 220 U/m so lange inkubiert, bis die Zellsuspension eine optische Dichte von A₆₀₀ ≈ 0,4-0,6 erreicht hatte. Die Zellen wurden dann mit 4.500 g für 5 min bei 4 °C sedimentiert, in 50 ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert und für weitere 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie erneut abzentrifugiert (4.500 g, 5 min, 4 °C) und in 5 ml eiskalter TFB2-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 15-60 min auf Eis inkubiert und schließlich in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>TFB1-Lösung</u>		<u>TFB2-Lösung</u>	
K-Acetat	30 mM	MOPS (pH 6,5)	10 mM
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	75 mM
MnCl ₂	50 mM	RbCl	10 mM
RbCl	100 mM	Glyzerin	15 % (w/v)
Glyzerin	15 % (w/v)		
pH 5,8 (Essigsäure)		pH 6,5 (KOH)	

Beide Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (0,22 µm, Millipore).

2.6.2 Transformation kompetenter *E. coli*

Pro Transformation wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 6 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl Plasmid-DNA vermischt und 20 min auf Eis gehalten. Nachdem die Zellen für 2 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt wurden, wurden 300 µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen für einen Zeitraum von 20 min bis 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50-250 µl eines Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten nach dem Trocknen bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur schnellen Charakterisierung von rekombinanter DNA wurde Plasmid-DNA im kleinen Maßstab präpariert. Dazu wurden die transformierten Bakterien über Nacht in 4-5 ml LB-Medium vermehrt und anschließend abzentrifugiert. Der Aufschluß der Bakterien und die Isolation der Plasmid-DNA erfolgten mit Hilfe des „Qiagen Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden)

nach Herstellerangaben. Die isolierte DNA wurde in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder für Sequenzierungen in sterilem Wasser aufgenommen.

Um größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA zu isolieren, wurden die Zellen einer 250 ml Übernachtkultur mit Hilfe des „Qiagen Maxiprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die isolierte DNA wurde in TE resuspendiert.

2.6.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm in einem UV-Spektrometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg). Eine Absorption $A_{260} = 1$ entspricht dabei einer Konzentration von 50 μg doppelsträngiger DNA / ml. Um den Reinheitsgrad der DNA zu bestimmen, wurde der Quotient A_{260}/A_{280} errechnet, der optimalerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte (Sambrook et al., 1989).

2.6.5 Restriktion von DNA

Zur Analyse von Plasmid-DNA anhand von Restriktionsfragmenten wurden 1-2 μg DNA und zu präparativen Zwecken 10 μg DNA für 2-4 Stunden mit Endonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) verdaut. Dabei wurden die vom Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym mitgelieferten Puffer verwendet und die empfohlenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

2.6.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarose-Gelelektrophorese

Zur Ermittlung der Größe von DNA-Fragmenten wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die Reaktionsansätze mit 6-fach konzentriertem DNA-Probenpuffer vermischt und auf ein Agarose-Gel (1-3 % Agarose, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland, in 1x TAE-Puffer) geladen. Der Agarose sowie dem Laufpuffer wurden 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt, um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Größenstandard dienten je nach Größe der DNA-Fragmente verschiedene DNA-Marker (für kleinere Fragmente GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, bzw. für größere Fragmente Lambda DNA / EcoRI + HindIII Marker, 3, MBI Fermentas).

<u>6x DNA-Probenpuffer (MBI Fermentas)</u>		<u>1x TAE Laufpuffer</u>	
Bromphenolblau	0,09 %	Tris-Base	30 mM
Xylencyanolblau	0,09 %	Essigsäure	0,1 %
Glyzerin	60 %	EDTA (pH 8,0)	1 mM
EDTA	60 mM		

2.6.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die DNA-Fragmente unter einer UV-Bank (Gel-doc 1000, Bio-Rad, Mailand, Italien) sichtbar gemacht und die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Die Elution der DNA aus der Gelmatrix erfolgte für DNA-Fragmente unter 500 bp Länge mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben oder bei größeren DNA-Fragmenten durch eine Glasmilch-Extraktion.

Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in einer Natriumiodid-Lösung des dreifachen Volumens (1 g Gel entsprach dabei 1 ml) für 5 min auf 65 °C erhitzt, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Zu der abgekühlten NaI-Gel-Mischung wurden 10 µl resuspendierte Glasmilch (50 % Sigma Silica S-5631) hinzugefügt und das Ganze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA an die Glasmilch zu binden. Anschließend wurde die Glasmilch in einer Tischzentrifuge (5415C, Eppendorf, Hamburg) sedimentiert (8 s bei 13.000 U/min) und in 600 µl NEET-Waschlösung (-20 °C) resuspendiert. Die Glasmilch wurde erneut abzentrifugiert und in 400 µl NEET-Waschlösung resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde sie in 30 µl TE aufgenommen und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die DNA aus der Glasmilch zu lösen. Zur Entfernung der Glasmilch-Reste wurde die Lösung anschließend zweimal für 10 s bei 13.000 U/m zentrifugiert.

<u>Natriumiodid-Lösung</u>		<u>NEET-Waschlösung</u>	
NaI	600 mM	NaCl	100 mM
Na ₂ SO ₃	12 mM	EDTA	1 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM	Ethanol	50 %
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM		

2.6.8 DNA-Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Dazu wurden die Fragmente je nach ihrer Größe in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 mit dem Vektor gemischt (die Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses der einzelnen Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Konzentrationsgels, auf dem die Intensität der Banden mit der Größe der Fragmente und dem eingesetzten Volumen ins Verhältnis gesetzt wurde). In einem 20 µl Ansatz wurde die DNA mit 1 µl (entspricht 400 U) T4-Ligase und 10 x Ligase-Puffer mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 18 °C über Nacht inkubiert. 6 µl des Ligationsproduktes wurden innerhalb von 48 h für die Transformation von Bakterien verwendet.

2.6.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente und zur Einführung aller in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mutationen verwendet. Als DNA-Matrize wurden ca. 40 ng cDNA verwendet. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide, um die zu mutierenden Bereiche der cDNA mit Hilfe der Taq-Polymerase (5 U/ μ l, Roche Diagnostics, Mannheim) oder der HiFi-Polymerase (3,5 U/ μ l, Roche Diagnostics) zu amplifizieren.

Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

DNA-Matrize	40 ng
Oligonukleotid-Primer	25 pmol
dNTPs (Takara Biomedicals, Shiga, Japan)	2,5 nmol
Taq- o. HiFi-Polymerase	1 μ l
10 x Puffer	5 μ l
steriles Wasser	ad 50 μ l

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Thermocycler („TGradient“ Biometra, Göttingen) in den folgenden Schritten:

initiale Denaturierung	94 °C	8 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primer-Bindung	45-65 °C	1-2 min	
Extension	72 °C	2 min	
abschließende Extension	72 °C	10 min	

Die Temperatur für die Primer-Bindung wurde individuell in Abhängigkeit des gewählten Oligonukleotids für jede PCR variiert.

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden 5 μ l eines Ansatzes mit DNA-Probenpuffer versetzt, in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem DNA-Größenstandard verglichen. Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit Hilfe des „Qiagen PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.6.10 DNA-Sequenzierung

Alle mit der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend durch eine Sequenzierung kontrolliert. Dies wurde mit Hilfe des „BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (ABI Prism, Applied Biosystems, Warrington, UK) durchgeführt.

Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

Terminator-Prämix	4 μ l
DNA-Matrize	1,5 μ l
Oligonukleotid-Primer	10 pmol
steriles Wasser	ad 20 μ l

Die DNA-Matrize wurde durch 25 Reaktionszyklen in einem Thermocycler („TGradient“ Biometra) unter Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide amplifiziert. Dies geschah in den folgenden Schritten:

Denaturierung	96 °C	20 s	} 25 Zyklen
Primer-Bindung	45-52 °C	20 s	
Extension	60 °C	240 s	

Nach der Amplifikation wurde die DNA mit 10 μ l 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 250 μ l 100 % Ethanol für 20 min bei -20 °C gefällt und bei 15.000 U/m und 4 °C abzentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Analyse erfolgte im Institut für Biochemie mit Hilfe des ABI 310A Sequenzierers (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) nach Herstellerangaben.

2.7 Elektrophysiologische Messungen

2.7.1 Die *Patch-Clamp* Technik

Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik durchgeführt. Diese Methode wurde zwischen 1973 und 1976 von Bert Sakmann und Erwin Neher (Neher und Sakmann, 1976) auf Grundlage der konventionellen *Voltage-Clamp* Technik entwickelt und ermöglicht es, unter konstanten Spannungsbedingungen sowohl Membranströme der gesamten Zellmembran als auch den Strom durch einzelne oder wenige Ionenkanäle zu messen.

Zur Erzeugung von konstanten Spannungsbedingungen werden die zu registrierenden Ströme, die durch die Zellmembran fließen, durch gleich große, entgegengerichtete Ströme kompensiert. Dazu wird ein Strom in die Zelle injiziert, der dem Unterschied zwischen Membranpotential und Sollwertpotential proportional ist.

Bei der herkömmlichen *Voltage-Clamp* Methode werden zu diesem Zweck zwei Mikroelektroden gleichzeitig in die Zelle eingestochen. Eine dieser Elektroden dient dazu, das Potential der Zelle gegenüber der sich im Bad befindlichen Referenzelektrode zu messen. Die Differenz zwischen dem Membranpotential und dem vorgegebenen Sollwertpotential wird von einem Rückkopplungsverstärker ermittelt. Dieser injiziert einen entsprechend großen Kompensationsstrom über die zweite intrazelluläre Elektrode und hält so das Sollpotential aufrecht.

Bei der *Patch-Clamp* Technik wird für den gleichen Zweck nur eine Mikroelektrode (die sogenannte Patchpipette) benötigt. Durch diesen geringeren Raumbedarf wird die Arbeit mit kleinen oder schwer zugänglichen Präparaten ermöglicht. Außerdem können aufgrund des hohen Abdichtwiderstandes zwischen Pipette und Zellmembran und des folglich sehr rauscharmen Zugangs zum Zellinneren besonders kleine Ionenströme registriert werden (Hamill et al. 1981).

Der Verzicht auf die zusätzliche Elektrode zur Potentialmessung wird durch die bei der *Patch-Clamp* Technik verwendete Meßschaltung ermöglicht. Dabei ist das zentrale Element der Operationsverstärker (OPV). Er ist als Strom-Spannungs-Wandler verschaltet und nahe bei der Pipette in der sogenannten *headstage* positioniert, von wo aus alle Meßdaten an einen nachgeschalteten Verstärker weitergeleitet werden (Abb. 2.1). Am (-)-Eingang des OPV liegt über die Patchpipette das Membranpotential U_m der Zelle an, am (+)-Eingang das Sollpotential U_{soll} , das vom Experimentator über den nachgeschalteten Verstärker vorgegeben wird. Der Ausgang des OPV ist über einen Rückkopplungswiderstand R_f mit dem (-)-Eingang verbunden. Über der Zellmembran auftretende Ströme I_m fließen über die Patchpipette zum OPV hin ab, da über den Verstärker der Stromkreis geschlossen wird. Aufgrund des sehr hohen Eingangswiderstandes des OPV (der idealerweise unendlich groß ist, real aber bei etwa $10^{12} \Omega$ liegt) fließt der Hauptteil des Stromes über den Rückkopplungswiderstand ab. Für die am Ausgang des OPV anliegende Spannung gilt demnach: $U_{\text{aus}} = U_{\text{soll}} + I_m \cdot R_f$.

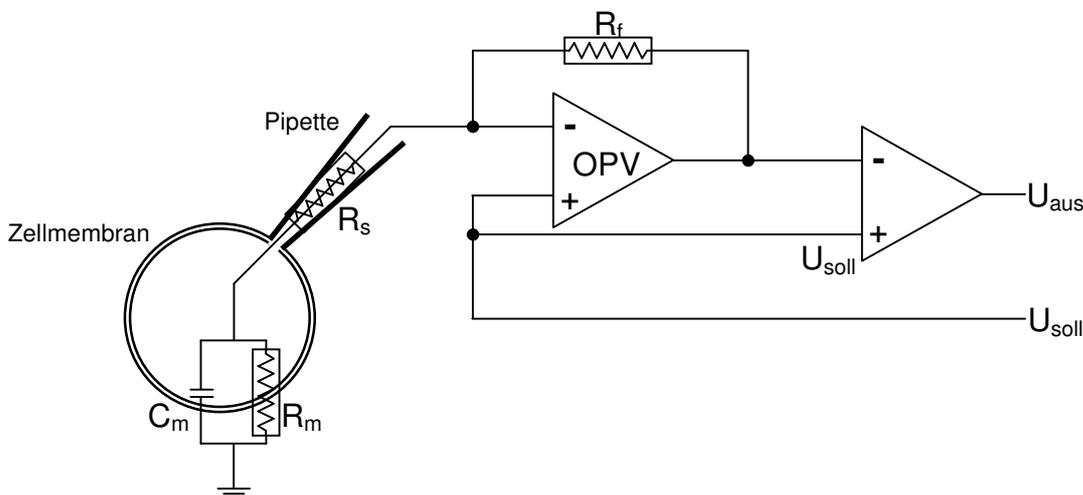


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Schaltbild eines *Patch-Clamp* Verstärkers bei einer *whole-cell* Ableitung (modifiziert nach Sigworth, 1995, und Numberger & Draguhn, 1996). OPV: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, R_s : Zugangswiderstand, R_m : Membranwiderstand, C_m : Membrankapazität, U_{soll} : Sollpotential, U_{aus} : Ausgangspotential.

Bei einer Differenz zwischen Membranpotential und Sollpotential entsteht am Ausgang des OPV eine Spannung, und es fließt über R_f ein Strom gemäß $I = U_f / R_f$ in die Pipette. Dieser Strom ändert das Membranpotential und fließt so lange, bis zwischen den beiden Eingängen des OPV keine Differenz mehr besteht. Die über R_f anliegende Spannung ist dem in die Pipette injizierten Strom proportional. Um den Anteil des Sollpotentials U_{soll} an der

Ausgangsspannung des OPV abzutrennen und ein dem Stromfluß direkt proportionales Spannungssignal zu erhalten, wird U_{soil} mit Hilfe eines zweiten, nachgeschalteten Differenzverstärkers abgezogen.

Damit erfüllt der OPV die beiden folgenden Aufgaben eines *Voltage-Clamp* Verstärkers: er stellt sicher, daß das Membranpotential bzw. das Potential der Pipette der Sollspannung U_{soil} entspricht, und er mißt den dafür notwendigen Kompensationsstrom I .

Der Ausgleich des Membranpotentials auf den Wert des Sollpotentials erfolgt im Gegensatz zum idealen System nur mit endlicher Geschwindigkeit. Die Umladungsgeschwindigkeiten von Zellmembran und Patchpipette stellen den dynamischen Faktor des Meßsystems dar, so daß das Membranpotential den vorgegebenen Sollwert meist nur mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung annimmt. Aus diesem Grund bieten die meisten Verstärker die Möglichkeit einer Kompensation der Zell- und Pipettenkapazität.

Für die Effizienz der Spannungsklemme ist allein die effektiv über der Membran anliegende Klemmspannung von Bedeutung, die zur Umladung der Membran führt. Da der Membranwiderstand mit dem Zugangswiderstand in Reihe geschaltet ist, fällt ein Teil der Klemmspannung bereits über dem Zugangswiderstand ab, so daß das Verhältnis der beiden Widerstände die Qualität der Spannungsklemme bestimmt. Der Zugangswiderstand hängt vom Pipettenwiderstand ab, weshalb möglichst niederohmige Pipetten verwendet werden sollten. Der Pipettenwiderstand der in dieser Arbeit verwendeten Pipetten lag zwischen 0,8 und 2,2 M Ω .

Die Spitze der Patchpipette (Durchmesser ca. 1 μm) wird auf die Zelle aufgesetzt, und durch Anlegen eines leichten Unterdrucks wird die Zellmembran an die Pipettenspitze angesaugt, so daß eine hochohmige Verbindung, ein sogenannter „*Giga-Seal*“, entsteht, der ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht. In dieser *cell-attached* Konfiguration können die in dem Membranstück unter der Pipettenspitze befindlichen Ionenkanäle untersucht werden, ohne daß das intrazelluläre Milieu oder das zelleigene Ruhemembranpotential beeinflusst werden. Ausgehend von der *cell-attached* Konfiguration ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für die weitere Vorgehensweise (Abb. 2.2):

1. Erhöht man den Unterdruck in der Patchpipette ruckartig, reißt das Membranstück unter der Pipettenöffnung auf, so daß ein direkter Zugang zum Zellinneren entsteht und Messungen der über die gesamte Zellmembran fließenden Ionenströme möglich werden. Ein Vorteil dieser *whole-cell* Konfiguration besteht in der Möglichkeit, durch die direkte Verbindung zum Zytoplasma die Ionenkonzentrationen und -zusammensetzungen im Zellinnern zu definieren und bestimmte Stoffe in die Zelle einzuwaschen. Allerdings können dadurch auch unbekannte endogene Substanzen ausgewaschen werden, was die Eigenschaften der zu messenden Ströme verfälschen könnte.

2. Wird die Patchpipette aus der *whole-cell* Konfiguration vorsichtig zurückgezogen, bildet sich zunächst ein Membranschlauch, der schließlich abreißt. Das abgerissene Ende des Schlauches kann sich spontan an der Patchpipette schließen. In dieser Konfiguration bleibt die

relative Orientierung der integralen Membranproteine bezüglich des Extrazellulärraumes erhalten, so daß man von einem „*outside-out* Patch“ spricht. Durch die gegenüber der *whole-cell* Konfiguration stark verkleinerte Membranfläche verringern sich die Membrankapazität und das Hintergrundrauschen, was Einzelkanalmessungen ermöglicht.

3. Wird die Patchpipette aus der *cell-attached* Konfiguration heraus abgezogen, wird das Membranstück unter der Pipettenöffnung aus der Zellmembran herausgerissen. (Ein sich dabei möglicherweise bildendes Vesikel kann durch kurzes Herausheben der Zelle aus dem Bad zum Platzen gebracht werden.) Im Gegensatz zur *outside-out* Konfiguration ist hier die Membrannenseite nach außen gekehrt, so daß man in diesem Fall von der *inside-out* Konfiguration spricht. Einzelne Ionenkanäle können so bei freiem Zugang zur zytoplasmatischen Oberfläche der Zellmembran untersucht werden.

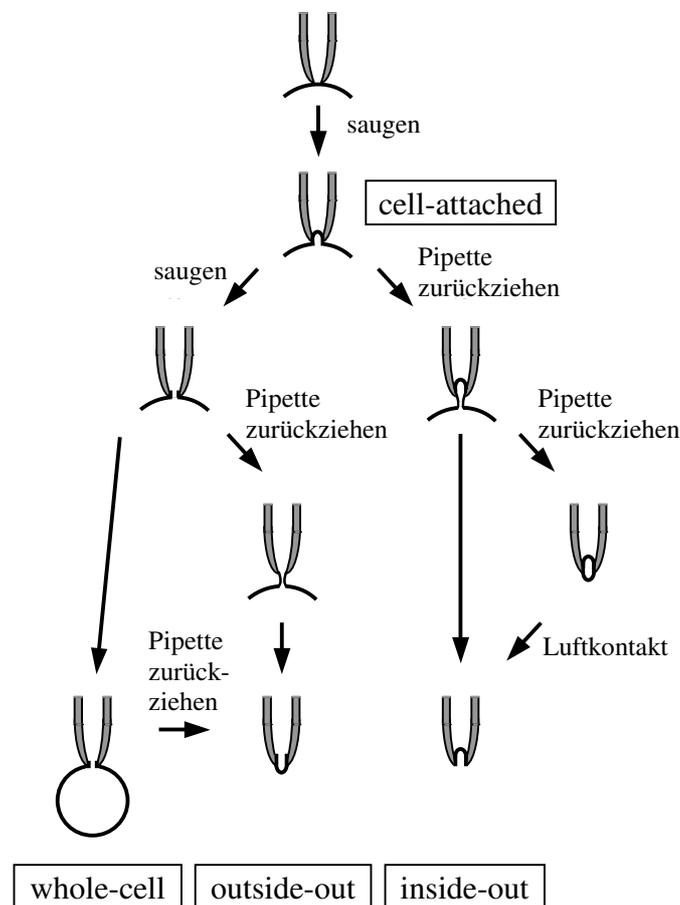


Abbildung 2.2: Verschiedene Meßkonfigurationen der *Patch-Clamp* Technik (modifiziert nach Hamill et al., 1981). Die Skizzen zeigen jeweils die Spitze der Patchpipette und einen Teil der Zellmembran. Aufsetzen der Pipette und Erzeugen eines leichten Unterdrucks führt zur *cell-attached* Konfiguration. Durch Zurückziehen der Pipette kann die *inside-out* Konfiguration erreicht werden. Die Erhöhung des Unterdruckes führt zum Durchreißen des Membranstücks unter der Pipettenöffnung und zur *whole-cell* bzw. zur *outside-out* Konfiguration.

Alle Messungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt.

2.7.2 Meßelektroden

Für die Elektroden wurden Silber/Silberchloridelektroden verwendet. Diese bestanden aus Silberdraht (WPI, Sarasota, USA), der regelmäßig chloriert wurde. Dazu wurde er mit Sandpapier abgeschleift und dann für ca. 5 Minuten in konzentrierte Chlorbleichlauge gelegt (DanKlorix, Colgate-Palmolive GmbH), bis die Oberfläche überall gleichmäßig dunkel war. Durch diese Prozedur bildet sich eine dünne Silberchloridschicht auf dem Draht, die innerhalb einer Chlorid-haltigen Lösung Ionenströme sowohl aus der Elektrode hinaus (Cl^- -Ionen gehen in Lösung) als auch in die Elektrode hinein (Cl^- -Ionen verbinden sich an der Elektrode mit elementarem Silber, und AgCl entsteht) zuläßt.

Die Elektroden wurden mindestens einmal täglich, spätestens aber bei Auftreten eines erhöhten Offset-Potentials zwischen den Elektroden oder einer zunehmend silberglänzenden Oberfläche des Drahtes neu chloriert.

Bei Versuchen, in denen die Chloridkonzentration der Meßlösungen verändert wurde, wurden außerdem Agarbrücken verwendet, um Übergangspotentiale (sogenannte „liquid junction potentials“) möglichst gering zu halten. Diese Differenzpotentiale entstehen an Grenzflächen von Lösungen verschiedener ionaler Zusammensetzung durch die unterschiedliche freie Beweglichkeit der Ionen und verfälschen das tatsächlich an der Zellmembran anliegende Potential, da sie sich zum Membranpotential addieren und so das Kommandopotential des Verstärkers fehlerhaft berechnet wird. Durch die Verwendung von Agarbrücken wird die Chloridkonzentration in unmittelbarer Umgebung der Elektrode konstant gehalten (Neher, 1992).

Zur Herstellung von Agarbrücken wurde Agarose für Gelelektrophorese (Life Technologies, Paisley, Schottland) in 3 M KCl-Lösung gelöst (3 % Agarose für extrazelluläre und 0,3 % Agarose für intrazelluläre Agarbrücken) und in einen Polyethylen-Schlauch gefüllt. In diese Agarbrücken wurde die Elektrode so weit hineingesteckt, daß sich zwischen Ende der Elektrode und dem Elektrolyt noch ca. 1 cm Agar befand.

2.7.3 Herstellung der Patchpipetten

Für die Patchpipetten wurden Glaskapillaren aus Borsilikat verwendet. Dieses Glas gehört aufgrund seines Schmelzpunktes (700 bis 850 °C) zu den mittelharten Gläsern und zeichnet sich durch seine guten elektrischen Eigenschaften (geringes Rauschen) aus (Hamill et al., 1981). Die hier verwendeten Glaskapillaren (GC120TF-10, CEI Harvard Apparatus, Edenbridge, Großbritannien) besaßen ein inneres Filament, waren 10 cm lang mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm und einem Innendurchmesser von 0,94 mm.

Die Glaskapillaren wurden mit einem horizontalen Elektroden-Ziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz, München) in zwei Arbeitsschritten hergestellt. Anschließend wurden die Spitzen der Pipetten poliert, um die Glaskanten zu entschärfen. Dies erfolgte mit Hilfe einer Microforge MF-830 (Narishige, Japan) mit einem Platin-Glühdraht (Aldrich, Steinheim).

Unter visueller Kontrolle wurde die Pipettenspitze für wenige Sekunden sehr nah an den Glühdraht gebracht, so daß die Glasränder rundgeschmolzen wurden.

Der Spitzendurchmesser der auf diese Weise erstellten Pipetten betrug ca. 1 μm , was einem Elektrodenwiderstand von 0,8 - 2,2 M Ω entsprach.

2.7.4 Lösungen

Als Standardlösungen wurden HEPES-gepufferte Salzlösungen mit folgender Zusammensetzung verwendet, deren pH-Wert jeweils mit NaOH auf 7,4 eingestellt wurde:

<u>Extrazelluläre Lösung</u>		<u>Intrazelluläre Lösung</u>	
NaCl	140 mM	NaCl	120 mM
KCl	4 mM	MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	2 mM	EGTA	5 mM
MgCl ₂	1 mM	HEPES	10 mM
HEPES	5 mM		

In Experimenten mit verringerter intrazellulärer Cl⁻-Konzentration wurde ein entsprechender Teil des Natriumchlorids durch Natriumglutamat ersetzt, um eine unveränderte Osmolarität der Lösungen zu gewährleisten. Die Zusammensetzung der jeweiligen Lösungen ergab sich wie folgt:

Intrazelluläre Lösung mit verringerten Cl⁻-Konzentrationen

NaCl	120 - X mM
NaGlu	X mM
MgCl ₂	2 mM
EGTA	5 mM
HEPES	10 mM

wobei X 90, 109 und 120 mM betrug. Die Gesamt-Cl⁻-Konzentration war in diesen Fällen also 34, 15 bzw. 4 mM.

In Experimenten, in denen der Iodidblock von ClC-2 Kanälen untersucht werden sollte, wurde ein Teil des extrazellulären Natriumchlorids durch Natriumiodid ersetzt:

Extrazelluläre Lösung mit I

NaCl	120 mM
NaI	20 mM
KCl	4 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM

2.7.5 Versuchsaufbau

Die Messungen erfolgten innerhalb eines Faraday-Käfigs, um den Meßplatz vor elektrischen Störungen zu schützen. Zur Vermeidung mechanischer Erschütterungen befand sich die gesamte Apparatur innerhalb des Käfigs auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Bilz Schwingungstechnik, Leonberg). Faraday-Käfig und Meßtisch standen in keinem mechanischen Kontakt zueinander.

Das inverse Mikroskop (Axiovert S100, Zeiss, Oberkochen) mit Durchlichtbeleuchtung, an dem alle Messungen durchgeführt wurden, befand sich direkt auf dem schwingungsgedämpften Tisch. Es war mit drei Objektiven (A-Plan 5x/0,12, LD A-Plan 20x/0,30 Ph1 und LD Achroplan 40x/0,60 korr. Ph2, Zeiss) und zwei Okularen (10x/20, Zeiss) ausgestattet, so daß sich Gesamtvergrößerungen von 50x, 200x bzw. 400x ergaben. Auf dem Objektstisch konnte ein Objektträger festgeklemmt werden, auf den die Petrischale mit den zu untersuchenden Zellen gestellt wurde.

Zum präzisen Heranführen der Patchpipette an die Zelle diente ein Mikromanipulator (LN SM1, Luigs & Neumann, Ratingen), der seitlich am Sockel des Mikroskops montiert war. Drei Schrittmotoren, die über eine außerhalb des Käfig befindliche Steuerungseinheit geregelt wurden, regulierten die Geschwindigkeit in allen drei Raumrichtungen. Dabei gab es für jede Richtung eine schnelle (6 mm/s) und eine langsame (0,24 mm/s) Stufe, sowie ein Handrad, mit dem die Bewegungen µm-genau gesteuert werden konnten.

An dem Mikromanipulator war der Vorverstärker (*headstage*) mit dem Pipettenhalter aus Polycarbonat befestigt, in den die Patchpipette eingespannt wurde. Der Pipettenhalter stellt die elektrische Verbindung der Meßelektrode zum Vorverstärker her und ermöglicht das Anlegen eines Unterdrucks in der Patchpipette. Dies geschah über einen seitlich angeschlossenen Plastikschlauch, dessen anderes Ende über einen Dreiwegehahn mit einer 20 ml Einwegspritze verbunden war.

Als nachgeschalteter Verstärker, der das von der *headstage* kommende Signal verstärkt und filtert und außerdem die Steuerung der angelegten Spannung kontrolliert, wurde ein EPC-8 (HEKA, Lambrecht) verwendet.

Die vom Verstärker ausgehenden analogen Signale wurden durch einen 16 bit AD-Wandler (Digidata 1320A, Axon Instruments, Foster City, USA) mit einer Frequenz von 250 kHz digitalisiert. Zur Aufnahme und Analyse der Daten sowie zur Steuerung des Verstärkers diente ein Computer (Intel x86, 551 MHz, 128 MB RAM) mit der Software pClamp (Version 8.2.0.222, Axon Instruments).

2.7.6 Datenanalyse

Vor Beginn jeder Messung wurde der Offset zwischen Bad- und Meßelektrode am Verstärker korrigiert sowie der Serienwiderstand und die Kapazität kompensiert.

Die Cl-Gleichgewichtspotentiale in Experimenten mit einer verringerten intrazellulären Chloridkonzentration, an die das jeweilige Haltepotential angepaßt wurde, wurden mit Hilfe der Software Clampfit (pClamp Vers. 8.2.0.222, Axon Instruments) ermittelt. Die gleiche Software wurde verwendet, um die *junction potentials* in diesen Versuchen zu berechnen (siehe Abschnitt 2.7.2). Die Daten aus diesen Messungen wurden bei der Auswertung um den entsprechenden Wert korrigiert.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Clampfit-Software, Excel (Vers. 7.0, Microsoft) und SigmaPlot (Vers. 7.0, Jandel Scientific, SPSS Inc., Erkrath). Alle Daten werden, soweit im Text nicht anders erwähnt, dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Der Standardfehler SEM wurde dabei wie folgt berechnet:

$$SEM = \frac{1}{n} \sqrt{\frac{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}{n-1}} \quad (1)$$

Die statistische Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des Students t-Test überprüft.

Für die Ermittlung von Aktivierungskurven wurden die Stromamplituden bei einer konstanten Spannung unmittelbar nach dem Spannungssprung (nachdem die kapazitiven Spitzen abgeklungen waren) in Abhängigkeit vom vorangegangenen Membranpotential dargestellt. Zur Beschreibung des Aktivierungsverhaltens eines Kanals wurde eine einfache (2) oder eine doppelte (3) Boltzmann-Funktion an die Daten angepaßt:

$$I(V) = \frac{A}{\left(1 + e^{\frac{(V-V_{1/2})}{k_v}}\right)} + C \quad (2)$$

$$I(V) = \frac{A_1}{\left(1 + e^{\frac{(V-V_{1/2_1})}{k_{v_1}}}\right)} + \frac{A_2}{\left(1 + e^{\frac{(V-V_{1/2_2})}{k_{v_2}}}\right)} + C \quad (3)$$

A ist dabei die maximale Amplitude, $V_{1/2}$ die Spannung der halbmaximalen Aktivierung, k_V die Steigung bei $V_{1/2}$ und C eine nicht-inaktivierende Komponente. Um die relative *steady state* Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals zu erhalten, wurde die Leckstromkomponente C subtrahiert und die Meßwerte sowie die an die Daten angepaßte Boltzmannfunktion auf die maximale Stromamplitude A normiert.

Um die Aktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten zu bestimmen, wurde an die Original-Stromspuren mittels des Chebychev-Algorithmus eine biexponentielle Funktion angenähert. Dazu wurde folgende Gleichung verwendet:

$$y = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} + d \quad (4)$$

Dadurch wird der Strom in drei verschiedene Komponenten aufgegliedert (Fahlke et al., 1996): eine schnell, eine langsam und eine nicht aktivierende bzw. deaktivierende Komponente. Die Spannungsabhängigkeiten der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 sowie der relativen Amplituden der drei Komponenten liefern eine quantitative Beschreibung des Öffnungsverhaltens des jeweiligen Kanals. Dabei ergeben sich die relativen Amplituden wie folgt:

$$A_1 = \frac{a_1}{a_1 + a_2 + d}, \quad A_2 = \frac{a_2}{a_1 + a_2 + d}, \quad C = \frac{d}{a_1 + a_2 + d} \quad (5)$$

Zur Untersuchung der Gleichrichtungs-Eigenschaften eines Kanals und zur Bestimmung des Umkehrpotentials wurden Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt. Dazu wurde die *steady state* Stromamplitude gegen das Haltepotential aufgetragen und das Umkehrpotential, das sich aus dem Schnittpunkt der Strom-Spannungs-Kennlinie mit der Abszisse ergibt, an den Graphen abgelesen.

Zur Charakterisierung des Iodidblocks von CIC-2 Kanälen wurde der Anteil nicht-geblockter Ströme berechnet. Dazu wurde der Strom mit extrazellulärem Iodid durch den Strom in iodidfreier extrazellulärer Lösung geteilt. An die so erhaltenen Daten wurde eine einfache Boltzmann-Funktion (2) angenähert. Mit Hilfe der hieraus ermittelten Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ und der Steigung k_V konnte der K_D -Wert bei 0 mV bestimmt werden. Der $K_D(0)$ -Wert stellt die Dissoziationskonstante von I bei 0 mV dar und beschreibt die Iodidkonzentration, bei der die Hälfte aller Kanäle geblockt sind, sich der Strom also auf die Hälfte reduziert. Aus dieser Definition und aus der Tatsache, daß sich der Anteil nicht-geblockter Kanäle in Abhängigkeit von der Membranspannung mit einer Boltzmann-Funktion beschreiben läßt, kann folgendes Gleichungssystem erstellt werden:

$$\frac{[I^-]}{[I^-] + K_D} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V - V_{1/2}}{k_V}}} \quad (6)$$

Da der K_D -Wert bei 0 mV berechnet wird, ist $V = 0$ mV, wodurch sich Gleichung (6) zu folgender Gleichung vereinfacht:

$$K_D(0) = [I^-] e^{\frac{-V_{1/2}}{k_V}} \quad (7)$$

2.8 Konfokale Mikroskopie

2.8.1 Bildaufnahme am konfokalen Mikroskop

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Typ LSM 510 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) durchgeführt, das mit einem Argon-Laser ausgestattet war. Der Argon-Laser wurde durch einen akusto-optischen Modulator moduliert. Die Auswahl der fluoreszierenden Zellen erfolgte im okularvisuellen Arbeitsmodus mittels einer Quecksilberdampfampe im Wellenlängenbereich 450 bis 490 nm (Filtersatz „FITC“). Das CFP (*cyan fluorescent protein*) wurde dann im konfokalen Arbeitsmodus durch einen dichroitischen Spiegel mit einem Argon-Laser in der Wellenlänge 458 nm angeregt, das YFP (*yellow fluorescent protein*) mit 514 nm. Die Laserleistung betrug dabei mindestens 30 %. Zur Detektion des Emissionslichts kam im Fall des CFP ein Bandpaßfilter Typ BP 480/20 (Bandbreite 470-490 nm) zum Einsatz, für YFP wurde mit einem Langpaßfilter vom Typ LP 530 (Durchlaß >530 nm) gearbeitet. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 512×512 Bildpunkten und einer Farbtiefe von 12 bit aufgenommen, die Aufnahmegeschwindigkeit lag zwischen 7 und 10.

Für die Aufnahme von lebenden Zellen wurde eine Perfusionskammer verwendet, in die die Deckgläschen eingespannt werden konnten und die mit 37 °C temperiertem Kulturmedium gefüllt wurde.

2.8.2 Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermöglicht den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in fixierten oder lebenden Zellen. FRET tritt auf zwischen einem Fluoreszenz-Donor und einem Fluoreszenz-Akzeptor, die sich in unmittelbarer Nähe (1-10 nm) zueinander befinden. Eine Voraussetzung dabei ist die Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors. Unter diesen Bedingungen wird Energie strahlungslos vom Donor auf den Akzeptor übertragen. Die Effizienz E dieses Transfers hängt dabei von der Distanz r zwischen den beiden Fluorophoren ab und wird durch die folgende Formel beschrieben:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (8)$$

wobei die Förster-Distanz R_0 den Abstand darstellt, an dem 50 % des Energietransfers stattfinden. R_0 liegt typischerweise zwischen 20 und 60 Å (Selvin, 2000). Aufgrund des durch die Formel beschriebenen Zusammenhangs tritt FRET nur dann maßgeblich auf, wenn $r < 2R_0$ (Abb. 2.3).

Die Quantifizierung von FRET kann über verschiedene meßbare Phänomene erfolgen. Diese umfassen eine Zunahme der Akzeptor-Emission, eine Abnahme der Lebensdauer der Donor-Fluoreszenz und das Quenchen der Donor-Fluoreszenz (Kenworthy, 2001). Eine praktikable Methode, um das Quenchen der Donor-Fluoreszenz zu messen, ist das Ausbleichen des Akzeptors (Bastiaens und Squire, 1999). Dabei wird ein erstes Bild vom Donor aufgenommen, dann der Akzeptor gebleicht und anschließend ein zweites Bild vom Donor erstellt (Abb. 2.3). Die FRET-Effizienz wird durch die Zunahme der Donor-Emission nach Ausbleichen des Akzeptors beschrieben.

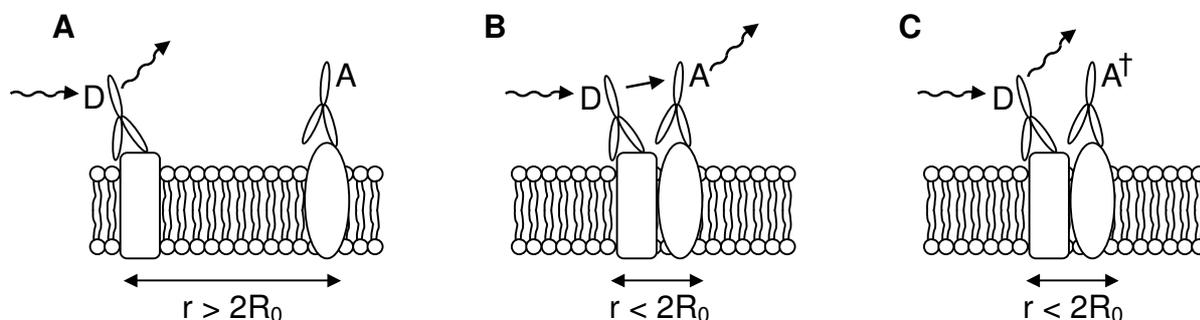


Abbildung 2.3: Prinzip der Quantifizierung von FRET durch Ausbleichen des Akzeptors (nach Kenworthy, 2001). Dargestellt sind zwei membranständige Proteine, an die zwei Fluorophoren gehängt wurden, die ein FRET-Paar bilden. (A) Ist keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen vorhanden und sind die Proteine durch eine Distanz $r > 2R_0$ voneinander getrennt, findet FRET in keinem nennenswerten Ausmaß statt, und der Donor D fluoresziert in ungehinderter Intensität. (B) Wenn eine Interaktion zwischen den beiden Membranproteinen stattfindet und $r < 2R_0$, tritt FRET auf. Der Donor emittiert weniger Photonen, seine Fluoreszenz wird gequenchet. Stattdessen fluoresziert der Akzeptor A. (C) Wenn der Akzeptor zerstört wird, z.B. durch Ausbleichen, nimmt die Donorfluoreszenz zu. Durch diese Zunahme kann die FRET-Effizienz quantifiziert werden.

Dieses Prinzip erfordert, daß der Akzeptor unter Bedingungen gebleicht werden kann, bei denen der Donor nicht beeinträchtigt wird, d.h. die Anregungsspektren von Donor und Akzeptor müssen weit genug auseinander liegen (Kenworthy, 2001). Ein Donor-Akzeptor-Paar, das diese Bedingung erfüllt, ist CFP-YFP. Diese beiden Derivate des *green fluorescent protein* (GFP) wurden in den letzten Jahren in ihren Fluoreszenz-Eigenschaften optimiert (Zhang et al., 2002) und lassen sich leicht an verschiedene Proteine anhängen, um deren Interaktion zu untersuchen. Sie wurden auch in der vorliegenden Arbeit für die FRET-Messungen verwendet.

Bei allen FRET-Messungen ist es unbedingt erforderlich, sowohl positive als auch negative Kontrollen durchzuführen, um echte FRET-Ereignisse von systembedingten Artefakten unterscheiden zu können (Karpova et al., 2003). Um sicherzustellen, daß mit dem

vorliegenden Meßsystem FRET-Ereignisse überhaupt registriert werden können, wurde ein CFP-YFP-Fusionsprotein als Positivkontrolle verwendet (Schmid et al., 2001). In diesem Konstrukt sind die beiden Fluoreszenzproteine durch einen 20 Aminosäuren langen Linker miteinander verbunden, so daß die Distanz zwischen den Fluorophoren ausreichend gering sein sollte, um FRET zu ermöglichen.

Während aller Bildaufnahmen werden trotz der geringen für die Aufnahmen benötigten Laserintensität beide Fluoreszenzfarbstoffe ein wenig ausgebleicht. In der Zeit, die zum Bleichen des Akzeptors benötigt wird, kann eine Erholung der Fluoreszenzintensität des Donors stattfinden, so daß die Donorintensität anschließend erhöht ist, ohne daß tatsächlich ein FRET-Ereignis vorliegt. Als Negativkontrolle wurden deshalb die gleichen Messungen an Zellen durchgeführt, die nur den Donor (CFP) exprimierten.

Um falsche Positivsignale erkennen zu können, wurden außerdem mit Fluoreszenzfarbstoffen versehene Proteine koexprimiert, die nicht miteinander interagieren können. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür der humane Glutamattransporter EAAT2 verwendet, an den ein CFP angehängt wurde und der mit den YFP-hClC-2 Konstrukten kotransfiziert wurde.

2.8.3 Versuchsablauf bei FRET-Messungen

Die Durchführung der FRET-Messungen erfolgte ausschließlich mit fixierten Zellen (siehe Abschnitt 2.5.6). Nachdem eine Zelle ausgewählt worden war, die sowohl CFP als auch YFP in geeigneter Intensität exprimiert (in einer für die FRET-Messungen tauglichen Zelle muß die Intensität der Akzeptorfluoreszenz stärker oder zumindest genauso stark sein wie die der Donorfluoreszenz; die Donorfluoreszenz darf außerdem keine Sättigung erreichen, damit eine FRET-bedingte Zunahme noch möglich ist), wurde zunächst ein Probebild aufgenommen, um das Bild optimal auszusteuern. Im folgenden wurden die Parameter, die die Fluoreszenzintensität beeinflussen, wie z.B. Laserintensität, die Bildpixelanzahl, die Aufnahmegeschwindigkeit, die Aufnahmeanzahl pro Bildgenerierung und der Bildaufnahmeabstand, über die gesamte Meßreihe konstant belassen.

Aufnahmekonstanten:	Laserintensität (514 nm)	1,05 %
	Laserintensität (458 nm)	10 %
	Objektiv	63x
	Bildpixelanzahl	256×256
	Aufnahmegeschwindigkeit	8 (gerätspezifisch)
	Aufnahmeanzahl pro Bild	2
	Bildaufnahmeabstand	0 ms
	Detektorverstärkung YFP	480
	Detektorverstärkung CFP	710

Anschließend erfolgte die Festlegung der sogenannten „*regions of interest*“ (ROIs), in denen die Intensität der Fluorophoren gemessen wurde. In ROI 1 wurde dabei der Akzeptor ausgeblendet, ROI 2 diente als Referenz, und ROI 3 wurde außerhalb der Zelle definiert, um die Intensität der Hintergrundfluoreszenz bestimmen zu können. ROI 1 und 2 wurden so bestimmt, daß sie hauptsächlich Zellmembran beinhalten.

Danach wurde eine Meßreihe erstellt, die den Verlauf der Fluoreszenzintensität von Donor und Akzeptor vor und nach dem Bleichen des Akzeptors erfassen sollte. Dazu wurden zunächst fünf Bilder aufgenommen (I_1 - I_5), dann wurde der Akzeptor mit 100 %iger Laserintensität (514 nm) in 100 Wiederholungen gebleicht und anschließend weitere fünf Bilder aufgenommen (I_6 - I_{10}). Die jeweiligen Intensitäten vor und nach dem Bleichen wurden mit Hilfe der Steuerungssoftware des LSM 510 ermittelt.

2.8.4 Datenanalyse

Um die FRET-Effizienz E_f zu berechnen, wurde für die in ROI 1 erhobenen Daten folgende Formel verwendet:

$$E_f = \frac{(I_6 - I_5)}{(I_6 - B)} \times 100 \quad (9)$$

I_n ist dabei die Fluoreszenzintensität des Donors bei der n-ten Aufnahme und B die mittlere Hintergrundintensität. Die Formel beschreibt also die prozentuale Zunahme der Donor-Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen des Akzeptors zwischen der 5. und der 6. Aufnahme.

Als Kontrolle C_f wurde die gleiche Formel auf die Intensitäten aus ROI 2, also der nicht gebleichten Fläche, angewandt:

$$C_f = \frac{(I_6 - I_5)}{(I_6 - B)} \times 100 \quad (10)$$

Um das systembedingte Rauschen erfassen zu können, wurde außerdem der Verlauf der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen durch folgende Formel berechnet:

$$N_f = \frac{(I_5 - I_4)}{(I_5 - B)} \times 100 \quad (11)$$

Die Werte für E_f , C_f und N_f wurden gemittelt und der Standardfehler bestimmt.

Des Weiteren wurde das Verhältnis von YFP zu CFP nach Abzug der jeweiligen Hintergrundintensität $(I_{YFP} - B_{YFP}) / (I_{CFP} - B_{CFP})$ berechnet, um eine mögliche Abhängigkeit der FRET-Effizienz von diesem Verhältnis erkennen zu können.

Überdies wurde die mittlere YFP-Intensität vor dem Akzeptorbleichen ermittelt und außerdem die generelle Dichte von Fluoreszenzfarbstoffen vor dem Bleichen wie folgt bestimmt:

$$D = \sqrt{(I_{\text{YFP}_1} - B_{\text{YFP}}) \cdot (I_{\text{CFP}_1} - B_{\text{CFP}})} \quad (12)$$

um einen möglichen Zusammenhang der FRET-Effizienz mit einer etwaigen Überexpression der Fluorophoren zu erkennen (eine zu dichte Expression von Donor- und Akzeptorproteinen könnte allein aufgrund der räumlichen Nähe zu FRET-Ereignissen führen, obwohl keine direkte Interaktion vorliegt). I_{YFP_1} und I_{CFP_1} sind dabei die Fluoreszenzintensitäten von YFP bzw. CFP bei der ersten Aufnahme.

3 ERGEBNISSE

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von hCIC-2 und rCIC-2

Humane und Ratten-CIC-2 Kanäle wurden in tsA201-Zellen exprimiert und ihre Ströme mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen.

Da die Aktivierung hyperpolarisationsaktivierter CIC-Kanäle von der intrazellulären Cl⁻-Konzentration abhängt (Fahlke et al., 1995; Pusch et al., 1999), wurde als Standardlösung eine intrazelluläre Lösung mit einer relativ hohen Cl⁻-Konzentration (124 mM) verwendet. Um die Auswirkungen der intrazellulären Cl⁻-Konzentration genauer zu untersuchen, wurde diese in einzelnen Versuchen entsprechend reduziert.

Die Ströme des hCIC-2 Kanals in seiner nativen Form waren zu klein, um Aussagen bezüglich der Auswirkungen von stromreduzierenden Meßbedingungen treffen zu können. Um die Expression zu erhöhen, wurde deshalb an den hCIC-2 WT C-terminal ein eR-Exportsignal (FCYENE) angehängt (Ma et al., 2001). Konstrukte mit und ohne FCYENE besaßen identische biophysikalische Eigenschaften. Bei der Analyse der absoluten Stromgröße wurden die beiden Konstrukte getrennt behandelt. In weiteren Versuchen wurden die Ströme jedoch auf jeweils einen absoluten Wert normiert, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, und gingen deshalb im folgenden - wenn im Text nicht anders erwähnt - gemeinsam in die Auswertung mit ein.

In einigen Versuchen mit hCIC-2 war im Verlauf der Messungen eine Zunahme der absoluten Stromamplitude zu verzeichnen, für die noch keine Erklärung gefunden werden konnte. Eine Volumenzunahme der Zelle konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da die Zellen während der Messungen auf Schwellung hin beobachtet wurden und geschwollene Zellen nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden. Auch eine versuchsweise Zugabe von 1 mM ATP in die intrazelluläre Lösung hatte keine Auswirkungen auf die zeitlich bedingte Stromzunahme, so daß ein veränderter Phosphorylierungszustand des Kanals als Grund ebenfalls ausfällt. Um unter diesen Umständen dennoch annähernd gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurde in diesen Fällen nur die jeweils erste Messung nach Erreichen der *whole-cell* Konfiguration für die Datenanalyse verwendet.

3.1.1 Aktivierungseigenschaften von hCIC-2 WT und rCIC-2 WT

Um das Aktivierungsverhalten von hCIC-2 und rCIC-2 WT Kanälen unter Standardbedingungen zu analysieren, wurden die mit dem jeweiligen Kanal transfizierten

Zellen ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV auf verschiedene Spannungen zwischen +55 mV und -165 mV mit jeweils 20 mV Differenz geklemmt und anschließend auf +75 mV depolarisiert, um schließlich wieder zum Ausgangspotential von 0 mV zurückzukehren. Die Dauer der Spannungssprünge wurde dabei in Abhängigkeit von der Aktivierungsgeschwindigkeit des jeweiligen Kanals festgelegt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Aktivierung bei der negativsten Spannung (-165 mV) einen *steady state* erreichte, die Stromamplitude also nicht weiter zunahm, bevor die Depolarisierung erfolgte. Die Zeit zwischen dem Beginn zweier Meßdurchgänge wurde so festgesetzt, daß eine komplette Deaktivierung der Kanäle sichergestellt war, bevor die nächste Aktivierung stattfand.

Repräsentative Stromspuren bei dem beschriebenen Spannungsprotokoll sind in den Abbildungen 3.1 A (hCIC-2) und B (rCIC-2) gezeigt. Zellen, die den hCIC-2 Kanal exprimierten, wurden in diesem Fall für 2,5 s auf die verschiedenen Testpotentiale geklemmt, mit rCIC-2 transfizierte Zellen für 700 ms. Sowohl der humane als auch der Ratten CIC-2 Kanal sind bei positiven Spannungen geschlossen und aktivieren langsam bei Hyperpolarisation. Eine spannungs- oder zeitabhängige Inaktivierung ist dabei nicht zu beobachten. Bei dem anschließenden Sprung auf +75 mV findet eine Deaktivierung statt. In untransfizierten tsA201-Zellen, die den gleichen Spannungsprotokollen ausgesetzt wurden, traten solche Ströme nicht auf.

Nächste Seite:

Abbildung 3.1: Aktivierung von hCIC-2 und rCIC-2 WT.

A, B: Spannungsprotokolle und repräsentative Stromantworten von hCIC-2 WT (A) bzw. rCIC-2 WT (B) exprimierenden tsA201-Zellen bei 124 mM $[Cl^-]_i$. Ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV wurden die Zellen für 2,5 s (hCIC-2) bzw. 700 ms (rCIC-2) in Abständen von jeweils 20 mV auf verschiedene Spannungen zwischen -165 mV und +55 mV geklemmt, um sie dann für 200 ms auf +75 mV zu depolarisieren. Die Zeit zwischen den einzelnen Durchgängen betrug 40 s (hCIC-2) bzw. 15 s (rCIC-2).

C, D: Spannungsabhängigkeit der absoluten *steady state* Stromamplituden von hCIC-2 (C) und rCIC-2 (D), entsprechend der in A und B abgebildeten Spannungsprotokolle. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 7 (C) bzw. 5 (D) Zellen. In C sind außerdem die Amplituden von untransfizierten tsA201-Zellen gezeigt (\circ), die dem gleichen Spannungsprotokoll ausgesetzt wurden ($n = 7$).

E, F: Spannungsabhängigkeit der langsamen (τ_1 , \bullet) und schnellen (τ_2 , \circ) Aktivierungszeitkonstanten von hCIC-2 (E) und rCIC-2 (F), die durch die Annäherung einer biexponentiellen Funktion an die Stromspuren ermittelt wurden. Die Daten stammen von denselben Zellen, deren Amplituden in C und D dargestellt sind.

G, H: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit (P_{offen}) von hCIC-2 (G) und rCIC-2 (H). Die Daten wurden von 9 (hCIC-2) bzw. 6 (rCIC-2) Zellen gemittelt. Die Kurven stellen an die gemittelten Werte angenäherte einfache Boltzmann-Funktionen dar, von denen die Leckstrom-Komponente subtrahiert wurde und die anschließend auf die maximale Amplitude normiert wurden. Die halbmaximale Aktivierung $V_{1/2}$ liegt bei $-84,5 \pm 2,2$ mV (G) und $-75,7 \pm 4,2$ mV (H), die Steigungen bei $-21,9 \pm 1,3$ mV (G) bzw. bei $-23,7 \pm 1,8$ mV (H).

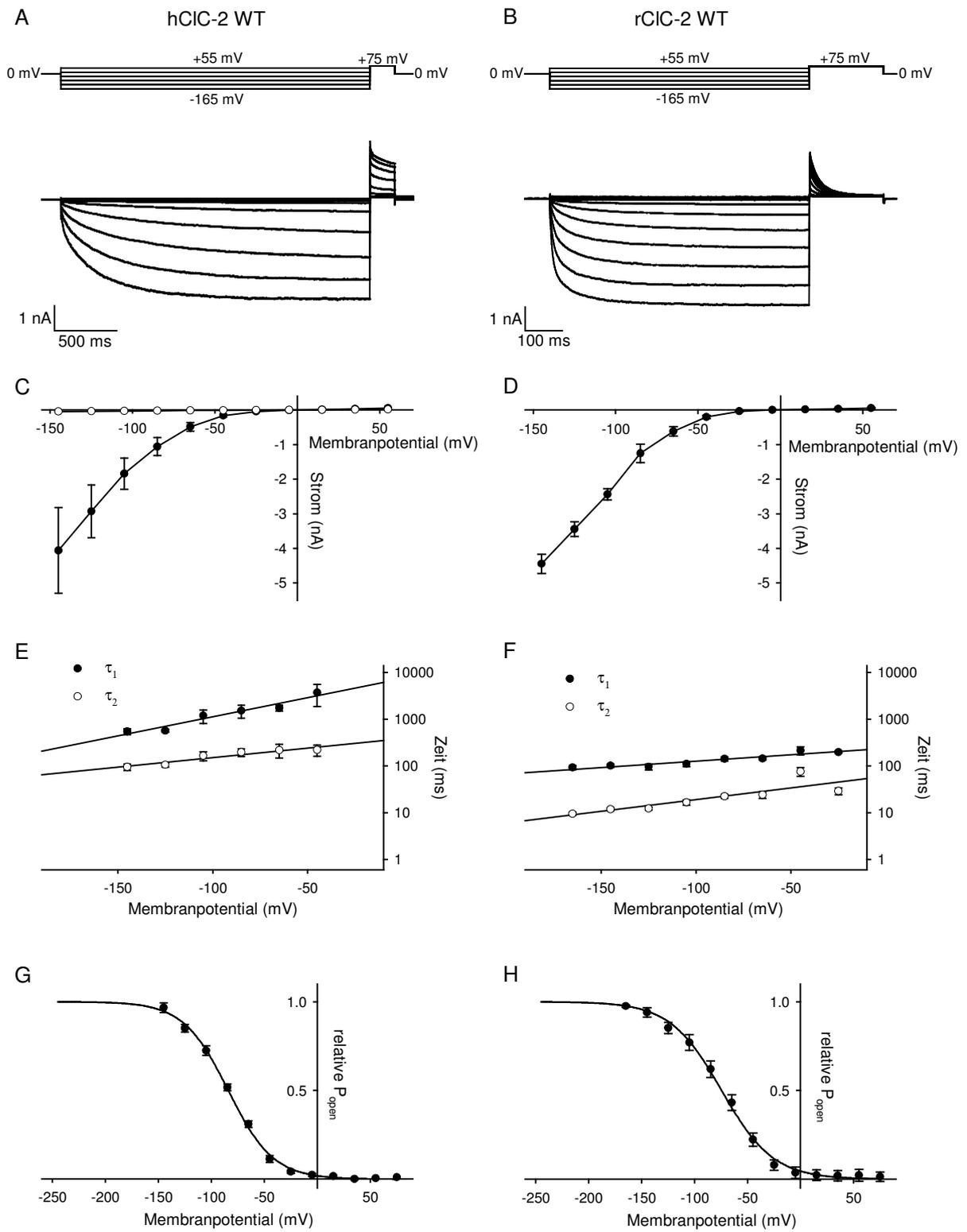


Abbildung 3.1: Aktivierung von hCIC-2 und rCIC-2 WT.

Erläuterungen siehe vorige Seite.

Die Amplitude der CIC-2 Ströme am Ende der Hyperpolarisation steigt mit zunehmend negativer Spannung an (Abb. 3.1 C, D). Die absoluten Größen der Amplituden von hCIC-2 und rCIC-2 im *steady state* sind vergleichbar: bei -145 mV beträgt die Amplitude $4,1 \pm 1,2$ nA für hCIC-2 ($n = 7$) und $4,4 \pm 0,3$ nA für rCIC-2 ($n = 5$). In Abbildung 3.1 C sind zum Vergleich außerdem die Stromamplituden von untransfizierten tsA201-Zellen bei den entsprechenden Membranpotentialen dargestellt. Die Stromamplitude bei -145 mV beträgt hier $0,04 \pm 0,005$ nA ($n = 7$). Auch bei dieser Darstellungsweise ist deutlich zu erkennen, daß beide Kanäle bei positiven Potentialen geschlossen sind und erst bei Spannungen unterhalb von -25 mV aktivieren. Sie können deshalb als einwärts rektifizierend bezeichnet werden.

Der Zeitverlauf der Aktivierung läßt sich durch eine biexponentiale Funktion beschreiben und ist relativ langsam, wobei der Rattenkanal deutlich schneller aktiviert als der menschliche. Die Aktivierungszeitkonstanten liegen in einer Größenordnung von 100 und 1000 ms für den humanen CIC-2 Kanal bzw. von 10 und 100 ms für den Ratten CIC-2 Kanal und sind leicht spannungsabhängig (Abb. 3.1 E, F): mit zunehmender Hyperpolarisation erfolgt die Aktivierung schneller.

Um die Aktivierungseigenschaften der untersuchten CIC-2 Kanäle genauer zu charakterisieren, wurden Aktivierungskurven erstellt. Dazu wurden die Amplituden der sogenannten *tail currents* unmittelbar nach dem Sprung auf +75 mV in Abhängigkeit vom vorangegangenen Membranpotential dargestellt und eine einfache Boltzmann-Funktion an die Werte angenähert. Die Leckstromkomponente wurde subtrahiert und die Stromamplituden sowie die angepaßte Boltzmann-Funktion auf die maximale Amplitude normiert. Auf diese Weise ergibt sich die relative Offenwahrscheinlichkeit P_{offen} der beiden Kanäle (Abb. 3.1 G, H).

Auch hier verhalten sich der humane und der Rattenkanal ähnlich: bei positiven Spannungen ist die Offenwahrscheinlichkeit in beiden Fällen null und nimmt dann bei negativen Spannungen sigmoidal zu. Der menschliche CIC-2 Kanal erreicht seine halbmaximale Aktivierung bei $-84,5 \pm 2,2$ mV ($n = 9$), der Ratten CIC-2 nur wenig früher ($-75,7 \pm 4,2$ mV, $n = 6$). Die Steigung beträgt $-21,9 \pm 1,3$ mV für hCIC-2 bzw. $-23,7 \pm 1,8$ mV für rCIC-2. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

In allen ihren Aktivierungseigenschaften unterscheiden sich der menschliche und der Ratten CIC-2 Kanal also lediglich hinsichtlich ihrer Aktivierungsgeschwindigkeit. Absolute Stromamplituden, das Potential der halbmaximalen Aktivierung sowie die entsprechenden Steigungen und somit die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit sind nicht signifikant unterschiedlich.

3.1.2 Deaktivierungseigenschaften von hCIC-2 WT und rCIC-2 WT

Um die Deaktivierung von hCIC-2 und rCIC-2 zu untersuchen, wurden die Zellen, die den jeweiligen Kanal exprimierten, ausgehend von 0 mV zunächst auf -125 mV hyperpolarisiert, um die Kanäle zu aktivieren. Für hCIC-2 betrug die Aktivierungsdauer dabei 1 s, für rCIC-2 125 ms. Anschließend wurden für eine Dauer von 1,9 s (hCIC-2) bzw. 350 ms (rCIC-2) verschiedene Spannungen zwischen +135 mV und +15 mV mit jeweils 20 mV Differenz angelegt, um die Kanäle wieder zu deaktivieren. Die Testpotentiale lagen alle im positiven Spannungsbereich, da nur hier eine Deaktivierung von CIC-2 Kanälen stattfindet. Die Stromspuren, die durch dieses Spannungsprotokoll hervorgerufen wurden, sind in den Abbildungen 3.2 A und B dargestellt. Bereits hier ist erkennbar, daß die Rattenisoform von CIC-2 schneller und kompletter deaktiviert als der humane Kanal.

Um diese Unterschiede genauer zu charakterisieren, wurde an den Stromverlauf der Deaktivierung eine Funktion aus zwei Exponentialen und einer Konstanten angepaßt. Dadurch wird der Strom in eine schnell deaktivierende, eine langsam deaktivierende und eine nicht deaktivierende Komponente aufgeteilt (Fahlke et al., 1996).

Die Deaktivierungszeitkonstanten der schnell und der langsam deaktivierenden Komponente in Abhängigkeit von der Spannung sind in den Abbildungen 3.2 C und D gezeigt. Sie sind im Gegensatz zu den Zeitkonstanten der Aktivierung nicht spannungsabhängig und liegen für den menschlichen CIC-2 Kanal bei etwa 600 ms und 50 ms und für rCIC-2 bei etwa 50 ms und 16 ms. Der Rattenkanal deaktiviert also deutlich schneller als der humane CIC-2 Kanal.

Nächste Seite:

Abbildung 3.2: Deaktivierung von hCIC-2 und rCIC-2 WT.

A, B: Spannungsprotokolle und repräsentative Stromantworten von hCIC-2 WT (A) bzw. rCIC-2 WT (B) exprimierenden tsA201-Zellen. Die Zellen wurden von 0 mV für 1 s (A) bzw. 125 ms (B) auf -125 mV hyperpolarisiert und anschließend für 1,9 s (A) bzw. 350 ms (B) auf verschiedene Spannungen zwischen +135 mV und +15 mV depolarisiert.

C, D: Spannungsabhängigkeit der langsamen (τ_1 , ●) und schnellen (τ_2 , ○) Deaktivierungszeitkonstanten von hCIC-2 (C) und rCIC-2 (D), durch die Annäherung einer biexponentiellen Funktion an den Zeitverlauf der Deaktivierung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von 14 (hCIC-2) bzw. 5 (rCIC-2) Zellen.

E, F: Spannungsabhängigkeit der anteiligen Stromamplituden der langsam deaktivierenden (●), schnell deaktivierenden (○) und nicht deaktivierenden (▼) Komponente, die sich aus denselben an den Zeitverlauf der Deaktivierung angepaßten biexponentiellen Funktionen wie in C und D ergeben. Mittelwerte \pm Standardfehler derselben Zellen wie in C bzw. D.

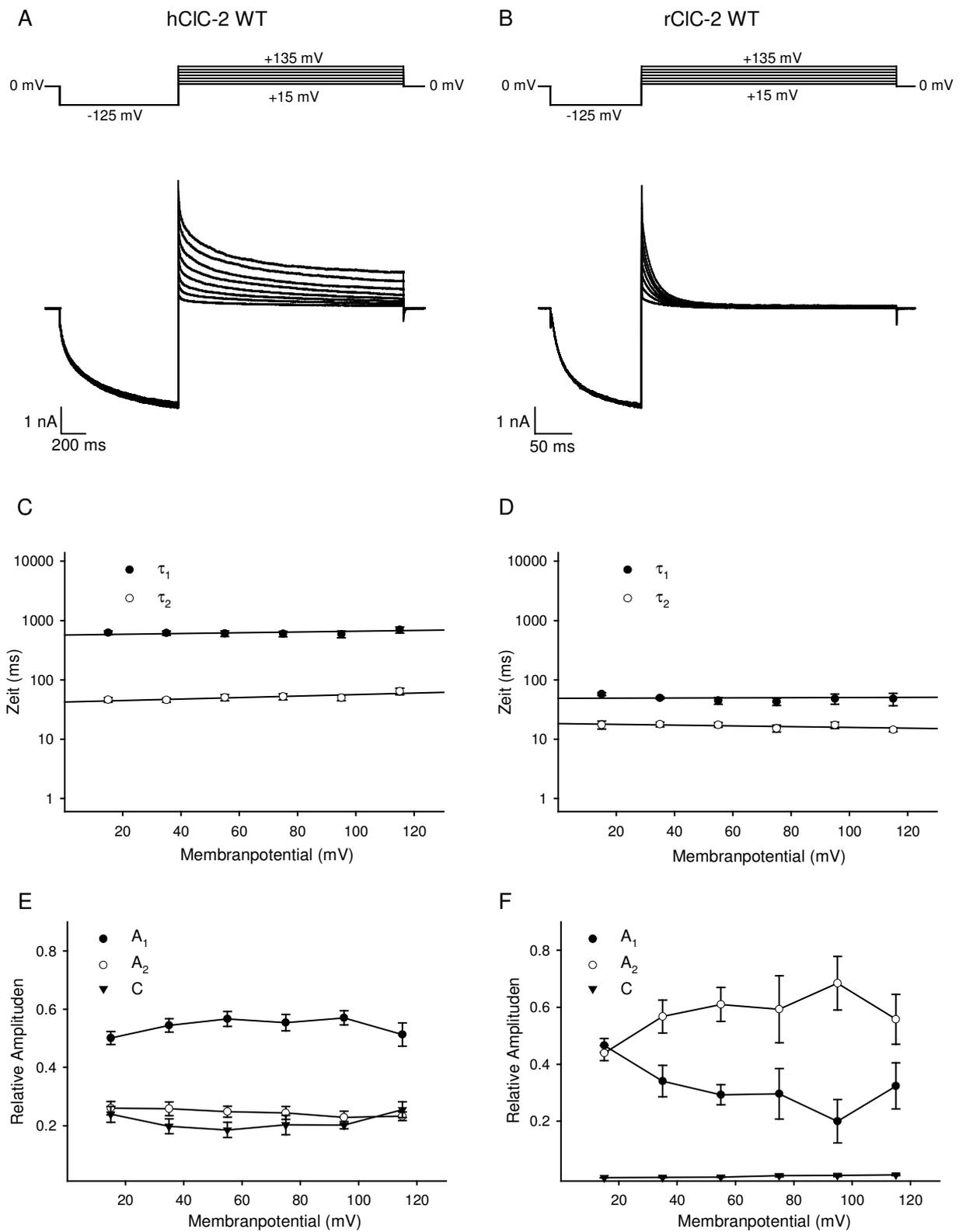


Abbildung 3.2: Deaktivierung von hCIC-2 und rCIC-2 WT.

Erläuterungen siehe vorige Seite.

Durch die biexponentielle Annäherung lassen sich außerdem die anteiligen Stromamplituden der drei Komponenten bestimmen. Diese wurden berechnet, indem die Stromamplitude der jeweiligen Komponente durch die Gesamtamplitude bei dem entsprechenden Potential dividiert wurde. Auf diese Weise ergibt sich der Anteil der schnell deaktivierenden, langsam deaktivierenden bzw. nicht deaktivierenden Komponente am Gesamtstrom. Die Abhängigkeit dieser drei Komponenten vom Membranpotential ist in den Abbildungen 3.2 E und F dargestellt. Im Fall des humanen CIC-2 Kanals sind alle drei Komponenten weitgehend spannungsunabhängig. Die langsam deaktivierende Komponente A1 hat den größten Anteil am Gesamtstrom (ca. 50 %), etwa 20 % aller Kanäle deaktivieren überhaupt nicht. Beim rCIC-2 Kanal verhält es sich anders: die nicht deaktivierende Komponente ist nahezu nicht vorhanden, was die komplette Deaktivierung des Kanals erklärt. Die schnell deaktivierende Komponente hat den größten Anteil am Gesamtstrom und nimmt mit steigender Depolarisation zu, während die langsam deaktivierende Komponente von +15 mV nach +115 mV abnimmt. Das bedeutet, daß sich mit zunehmender Depolarisation mehr Kanäle im schnell deaktivierenden Zustand befinden und somit die Deaktivierung des Gesamtstroms bei steigender Spannung schneller abläuft.

Um herauszufinden, ob die Deaktivierungszeitkonstanten von CIC-2 von der Dauer der vorangegangenen Aktivierung abhängen, wurden die Kanäle zunächst durch eine Hyperpolarisation auf -145 mV aktiviert und anschließend durch eine 175 ms lange Depolarisation auf +100 mV deaktiviert. Die Dauer des hyperpolarisierenden Spannungssprungs betrug zunächst 6,25 ms und wurde dann mit jedem Durchgang um 6,25 ms bis auf maximal 300 ms verlängert (Abb. 3.3 A).

Dieser Versuch wurde exemplarisch nur an rCIC-2 durchgeführt.

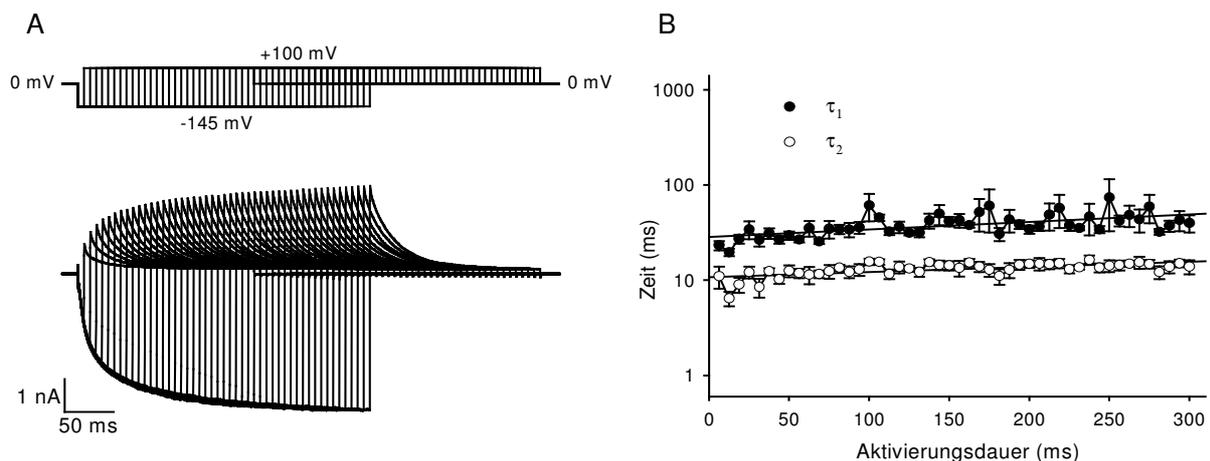


Abbildung 3.3: Zeitverlauf der Deaktivierung von rCIC-2 WT.

A: Spannungsprotokoll und zugehörige Stromantwort einer mit rCIC-2 WT transfizierten tsA201-Zelle. Die Zelle wurde für eine Dauer von 6,25 ms auf -145 mV hyperpolarisiert und anschließend für 175 ms auf +100 mV depolarisiert. Der hyperpolarisierende Spannungssprung wurde mit jedem Durchgang um 6,25 ms bis auf maximal 300 ms verlängert.

B: Abhängigkeit der langsamen (τ_1 , ●) und schnellen (τ_2 , ○) Deaktivierungszeitkonstanten von der vorangegangenen Hyperpolarisationsdauer. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von 5 Zellen.

Die maximale Amplitude sowohl der Einströme als auch der *tail currents* nahm dabei mit steigender Aktivierungsdauer zu, bis ein *steady state* erreicht war.

An den Stromverlauf der Deaktivierung wurde für jede Aktivierungsdauer eine biexponentielle Funktion angenähert, um Aussagen über die Deaktivierungszeitkonstanten sowie die relativen Stromamplituden der verschiedenen Stromkomponenten treffen zu können. Abbildung 3.3 B zeigt die Abhängigkeit der Deaktivierungszeitkonstanten von der Dauer der vorangegangenen Aktivierung. Mit zunehmender Zeit ist ein leichter, aber signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg sowohl der schnellen als auch der langsamen Zeitkonstante zu beobachten. Das heißt, nach längerer und folglich vollständigerer Aktivierung deaktivieren die Kanäle langsamer. Eine Abhängigkeit der anteiligen Stromamplituden von der Aktivierungsdauer war nicht zu beobachten (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.1.3 Strom-Spannungs-Kennlinien von hCIC-2 WT und rCIC-2 WT

Zur weiteren Charakterisierung von hCIC-2 und rCIC-2 wurden Strom-Spannungs-Kennlinien aufgenommen. Strom-Spannungs-Kennlinien stellen die Stromamplituden in Abhängigkeit vom Haltepotential dar und werden verwendet, um das Umkehrpotential eines Kanals zu ermitteln. Der Kanal wird dazu zunächst maximal aktiviert, um dann den instantanen Strom bei verschiedenen Potentialen zu bestimmen. Dabei geht man davon aus, daß sich der Offenzustand der Kanäle unmittelbar nach dem Spannungssprung noch nicht geändert hat. Das Umkehrpotential ist das Potential, an dem der Strom seine Polarität ändert. Außerdem können auf diese Weise gleichrichtende oder rektifizierende Eigenschaften eines Kanals beobachtet werden. Rektifizierung bedeutet, daß durch den Kanal bei Spannungen entweder oberhalb oder unterhalb des Umkehrpotentials weniger Strom fließt als bei entsprechenden Spannungen auf der anderen Seite des Umkehrpotentials.

Zur Erstellung von Strom-Spannungs-Kennlinien der hier untersuchten CIC-2 Kanäle wurden die Zellen zunächst auf -125 mV hyperpolarisiert (bei hCIC-2 für 215 ms, bei rCIC-2 für 37 ms), um sie anschließend für 10 ms (hCIC-2) bzw. 3 ms (rCIC-2) auf verschiedene Spannungen zwischen -195 mV und +185 mV zu klemmen (Abb. 3.4 A). Die Stromamplitude unmittelbar nach Ende der Hyperpolarisation wurde dann auf die Amplitude bei +185 mV normiert und gegen das Membranpotential aufgetragen (Abb. 3.4 B).

Es zeigt sich, daß sowohl der humane als auch der Ratten CIC-2 Kanal eine lineare Strom-Spannungsbeziehung aufweisen und damit im voll aktivierten Zustand keine gleichrichtenden Eigenschaften besitzen, was mit bereits beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt (Thiemann, et al., 1992). Die normierten Stromamplituden der beiden Kanäle unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Hinsichtlich ihres Umkehrpotentials besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen hCIC-2 ($V_{\text{rev}} = -10,1 \pm 2,7$ mV, $n = 5$) und rCIC-2 ($V_{\text{rev}} = -14,2 \pm 6,9$ mV, $n = 11$).

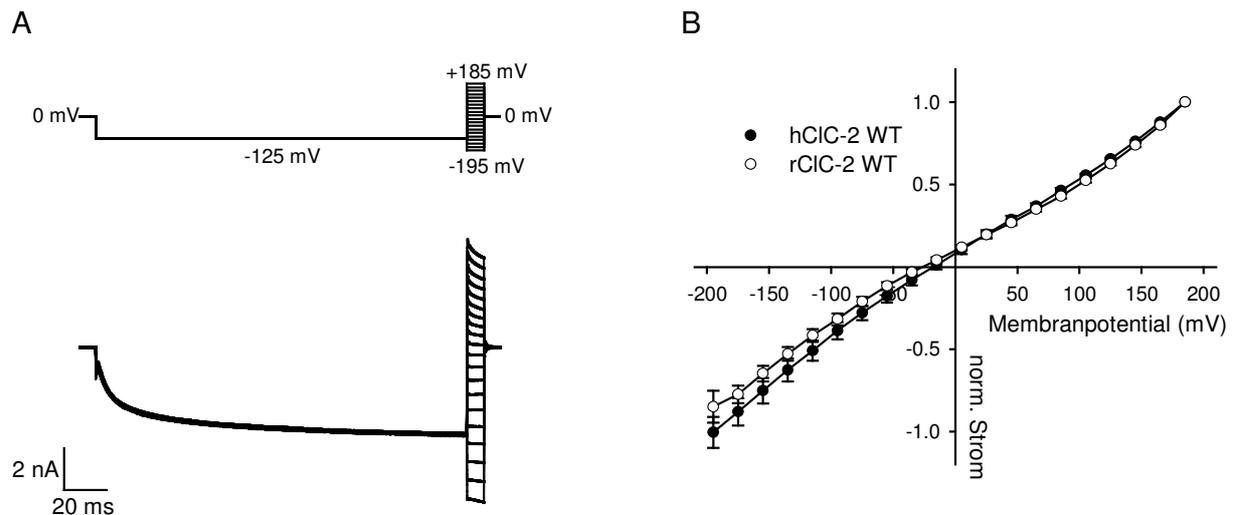


Abbildung 3.4: Strom-Spannungs-Kennlinien von hCIC-2 WT und rCIC-2 WT.

A: Spannungsprotokoll und zugehörige Stromantwort einer mit hCIC-2 WT transfizierten tsA201-Zelle. Die Zelle wurde für 215 ms auf -125 mV hyperpolarisiert und anschließend für 10 ms auf verschiedene Spannungen zwischen +185 mV und -195 mV (im Abstand von jeweils 20 mV) geklemmt.

B: Spannungsabhängigkeit der instantanen Stromamplituden von hCIC-2 WT (●) und rCIC-2 WT (○) nach einem aktivierenden Spannungspuls (-125 mV) über 215 ms (hCIC-2 WT) bzw. 37 ms (rCIC-2 WT). Die absoluten Werte wurden auf die Stromamplitude bei +185 mV normiert und anschließend gemittelt ($n = 5$ für hCIC-2 WT und $n = 11$ für rCIC-2 WT).

Da es also bezüglich des Aktivierungs- und Deaktivierungsverhaltens sowie der Gleichrichtungseigenschaften und des Umkehrpotentials zwischen hCIC-2 und rCIC-2 nur sehr geringfügige Unterschiede gibt, sind die Ergebnisse der Experimente, die im folgenden nur für einen der beiden Kanäle durchgeführt wurden, mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf den anderen Kanal übertragbar.

3.1.4 Vergleich des rCIC-2 Wildtyps mit der Deletionsmutante rCIC-2 Δ 16-61

Bei dem Versuch, das Schaltverhalten von rCIC-2 genauer zu charakterisieren, wurde eine N-terminale Domäne aus 45 Aminosäuren gefunden, deren Deletion (Δ 16-61) bei Ganzzellaufleitungen in *Xenopus*-Oozyten zum Verlust der Spannungsabhängigkeit und der Osmosensitivität führt und einen konstitutiv offenen Phänotyp erzeugt (Gründer et al., 1992; Jordt & Jentsch, 1997). Um dies auch in Säugetierzellen zu überprüfen, wurde die Deletionsmutante rCIC-2 Δ 16-61 im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

tsA201-Zellen, die entweder den rCIC-2 WT oder die Deletionsmutante exprimierten, wurden für 280 ms auf verschiedene Potentiale zwischen +75 mV und -185 mV geklemmt und anschließend für 80 ms auf +75 mV depolarisiert. Repräsentative Stromspuren von diesen Zellen sind in den Abbildungen 3.5 A und B gezeigt. Danach ist auf den ersten Blick zunächst

kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante zu erkennen: die Deletionsmutante ist genau wie der Wildtyp bei positiven Potentialen geschlossen und aktiviert langsam bei Hyperpolarisation. Die absolute Stromgröße war im Mittel bei der Deletion jedoch signifikant höher als beim rCIC-2 WT ($p < 0,01$): nach einer Aktivierung von 280 ms lag die mittlere maximale Amplitude bei -185 mV für den Wildtyp bei $2,4 \pm 0,4$ nA ($n = 7$), für die $\Delta 16-61$ Mutante hingegen bei $7,7 \pm 4,0$ nA ($n = 5$). Bei der Betrachtung der Stromspuren fällt außerdem auf, daß die Deletionsmutante schneller aktiviert als der Wildtypkanal. Dies äußert sich ebenfalls in den Aktivierungszeitkonstanten (Abb. 3.5 C und D): bei stärkerer Hyperpolarisation liegen sowohl die langsamen als auch die schnellen Aktivierungszeitkonstanten der Mutante signifikant unter denen des Wildtyps ($p < 0,01$). Sie zeigen außerdem eine ausgeprägtere Abhängigkeit vom Membranpotential.

Die Aktivierungskurve von rCIC-2 $\Delta 16-61$ ließ sich im Gegensatz zu der des Wildtyps nur mit einer doppelten Boltzmann-Funktion beschreiben (Abb. 3.5 F). Die beiden $V_{1/2}$ -Werte der Mutante liegen bei $-46,6 \pm 1,7$ mV und $-99,5 \pm 3,6$ mV ($V_{1/2}$ des Wildtyps nach 280 ms Aktivierung bei $-111,3 \pm 4,0$ mV).

Um die Deaktivierung der Deletionsmutante mit der des rCIC-2 Wildtyps zu vergleichen, wurde das gleiche Spannungsprotokoll verwendet wie in Abschnitt 3.1.2 für rCIC-2 beschrieben. Der Zeitverlauf der Deaktivierung wurde hier ebenfalls mit einer Summe aus zwei Exponentialen und einem konstanten Term angenähert. Die Abhängigkeit der Deaktivierungszeitkonstanten vom Membranpotential unterscheidet sich nicht signifikant von denen des Wildtyps (Ergebnisse nicht gezeigt).

Nächste Seite:

Abbildung 3.5: Vergleich von rCIC-2 WT und rCIC-2 $\Delta 16-61$.

A, B: Spannungsprotokolle und repräsentative Stromantworten von rCIC-2 WT (A) bzw. rCIC-2 $\Delta 16-61$ (B) exprimierenden tsA201-Zellen. Ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV wurden die Zellen bei 124 mM $[Cl^-]_i$ für 280 ms in Abständen von jeweils 20 mV auf verschiedene Spannungen zwischen -185 mV und +75 mV geklemmt, um sie dann für 80 ms auf +75 mV zu depolarisieren. Die Zeit zwischen den einzelnen Durchgängen betrug 10 s.

C, D: Spannungsabhängigkeit der langsamen (τ_1 , ●) und schnellen (τ_2 , ○) Aktivierungszeitkonstanten von rCIC-2 WT (C) und rCIC-2 $\Delta 16-61$ (D), die durch die Annäherung einer biexponentiellen Funktion an die Stromspuren ermittelt wurden. Die Daten wurden von 7 (rCIC-2 WT) bzw. 6 (rCIC-2 $\Delta 16-61$) Zellen gemittelt.

E, F: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit (P_{offen}) von rCIC-2 WT (E) und rCIC-2 $\Delta 16-61$ (F). Die Daten stammen von denselben Zellen, deren Aktivierungszeitkonstanten in C und D dargestellt sind. Die Kurven stellen an die gemittelten Werte angenäherte einfache (rCIC-2 WT) bzw. doppelte (rCIC-2 $\Delta 16-61$) Boltzmann-Funktionen dar, von denen die Leckstrom-Komponente subtrahiert wurde und die anschließend auf die maximale Amplitude normiert wurden. $V_{1/2}$ -Werte liegen bei $-111,3 \pm 4,0$ mV (E) bzw. $-46,6 \pm 1,7$ mV und $-99,5 \pm 3,6$ mV (F).

G, H: Spannungsabhängigkeit der anteiligen Stromamplituden der langsam deaktivierenden (●), schnell deaktivierenden (○) und nicht deaktivierenden (▼) Komponente von rCIC-2 WT (G) und rCIC-2 $\Delta 16-61$ (H), die sich aus an den Zeitverlauf der Deaktivierung angepaßten biexponentiellen Funktionen ergeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils 5 (rCIC-2 WT) bzw. 6 (rCIC-2 $\Delta 16-61$) Zellen.

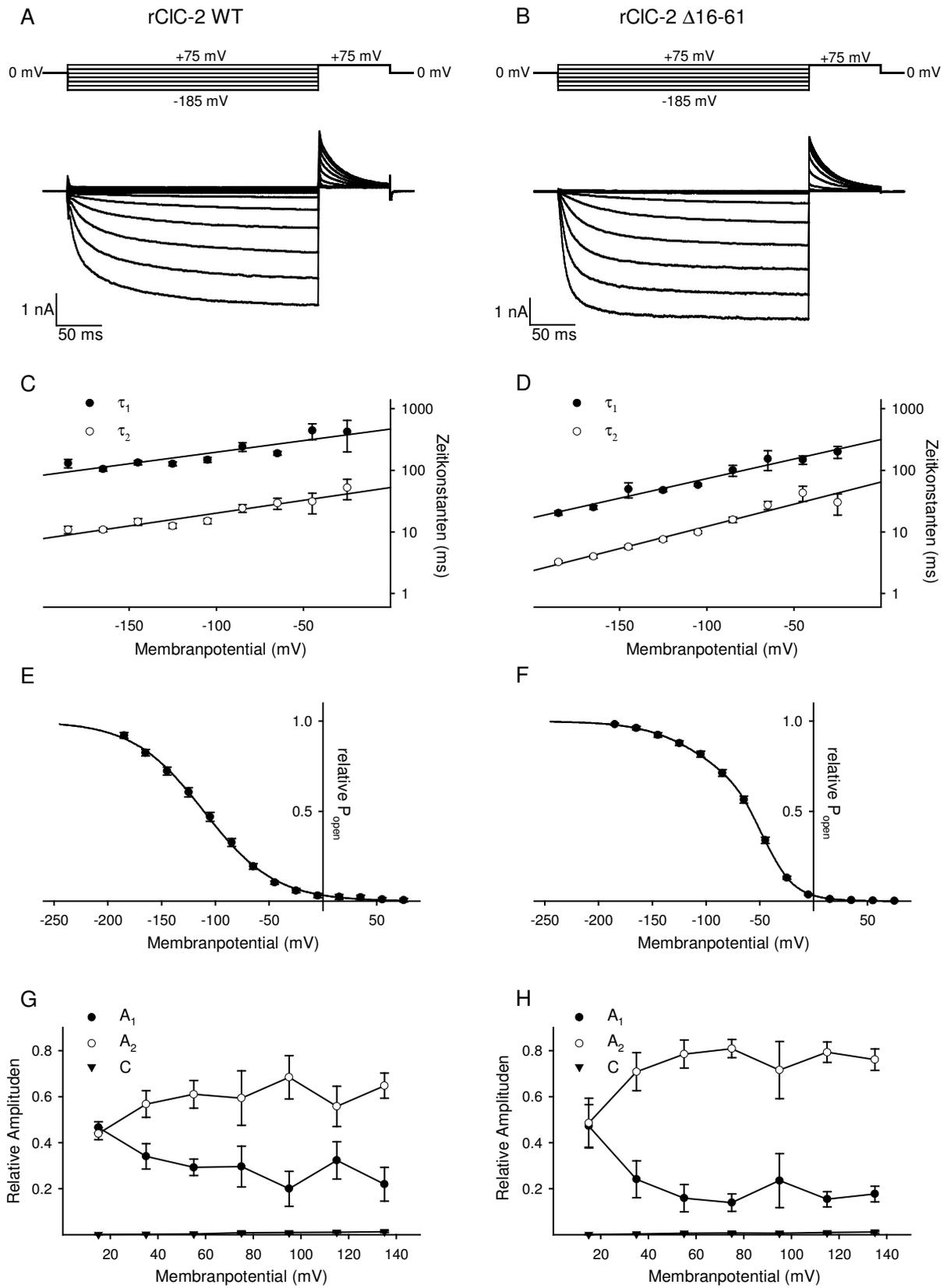


Abbildung 3.5: Vergleich von rCIC-2 WT und rCIC-2 Δ 16-61.

Erläuterungen siehe vorige Seite.

Die anteiligen Stromamplituden der Deaktivierung zeigen für die Deletionsmutante von rCIC-2 die gleiche Spannungsabhängigkeit wie für den Wildtyp, jedoch deutlich ausgeprägter (Abb. 3.5 G, H): die nicht deaktivierende Komponente ist ebenfalls vernachlässigbar gering. Die schnell deaktivierende Komponente nimmt wie beim WT mit steigender Depolarisation zu, während die langsam deaktivierende Komponente abnimmt. Jedoch ist der absolute Anteil der schnell deaktivierenden Komponente am Gesamtstrom bei der Deletion größer als beim Wildtyp (im Mittel etwa 70 % gegenüber ca. 60 % beim WT), während die langsame Komponente einen entsprechend kleineren Anteil des Gesamtstroms vermittelt (ca. 20 % im Gegensatz zu etwa 30 % beim WT). Dieser Unterschied erklärt die schnellere Deaktivierung der Deletionsmutante verglichen mit dem Wildtyp rCIC-2.

Obwohl sich also rCIC-2 Δ 16-61 und der Wildtyp bezüglich ihrer Aktivierungs- und Deaktivierungsgeschwindigkeit und des Verlaufs der relativen Offenwahrscheinlichkeit geringfügig unterscheiden, konnte der beschriebene konstitutiv offene Phänotyp der Deletionsmutante in Säugerzellen nicht beobachtet werden.

3.1.5 Block von rCIC-2 Δ 16-61 durch Iodid-Ionen

Ein typisches Merkmal des CIC-2 Kanals ist die im Vergleich zu Cl⁻ schlechtere Permeabilität von I⁻-Anionen (Clark et al., 1998; Varela et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Eigenschaften des Iodidblocks genauer charakterisiert werden, um daraus eventuelle Rückschlüsse auf das Schaltverhalten des Kanals ziehen zu können. Aufgrund der stabileren Expression der rCIC-2 Δ 16-61 Mutante im Vergleich zum rCIC-2 Wildtyp wurden die Experimente zur Charakterisierung des Iodidblocks ausschließlich mit der Deletionsmutante durchgeführt. Wegen des sehr ähnlichen Schaltverhaltens von Mutante und Wildtyp-Kanal sind die hierbei ermittelten Ergebnisse auf den Wildtyp übertragbar.

Die rCIC-2 Δ 16-61 exprimierenden Zellen wurden nach entsprechenden Kontrollmessungen in der Standard-Badlösung (0 mM I⁻) mit einer extrazellulären Lösung perfundiert, in der 20 mM des NaCl durch NaI ersetzt worden war. Zunächst wurde ein Spannungsprotokoll verwendet, in dem die Zellen für 280 ms auf verschiedene Spannungen zwischen +75 mV und -165 mV geklemmt wurden, bevor sie für 80 ms auf +75 mV depolarisiert wurden (siehe Abb. 3.5 A und B). Mit 20 mM I⁻ in der externen Lösung bleiben grundlegende Eigenschaften des typischen CIC-2 Stromes erhalten: der Kanal ist bei positiven Potentialen geschlossen und aktiviert langsam bei Hyperpolarisierung. Die absolute Stromamplitude ist jedoch reduziert. In Abbildung 3.6 A ist beispielhaft die Stromantwort einer Zelle bei Hyperpolarisation auf -165 mV für 0 mM I⁻ (graue Spur) und 20 mM I⁻ (schwarze Spur) gezeigt (zur Orientierung ist außerdem die Nulllinie gepunktet eingezeichnet). Die *steady state* Amplitude wird durch das extrazelluläre Iodid auf ca. 30 % dezimiert. Diese Verringerung zeigt sich auch in den Aktivierungskurven mit und ohne Iodid (Abb. 3.6 B). Bei positiven Spannungen und geschlossenem Kanal ist kein Unterschied zwischen den beiden Kurven zu erkennen, erst bei

negativen Potentialen, also mit zunehmender Aktivierung, wird der Block durch die I⁻-Ionen allmählich ausgeprägter. Die maximale Amplitude mit 20 mM I⁻ beträgt lediglich 28 % der maximalen Amplitude ohne Iodid. Außerdem werden die V_{1/2}-Werte durch das extrazelluläre Iodid um ca. 10 mV in negativer Richtung verschoben (-39,9 ± 1,6 mV und -84,3 ± 8,9 mV für 0 mM I⁻ bzw. -46,0 ± 2,2 mV und -97,8 ± 12,1 mV für 20 mM I⁻).

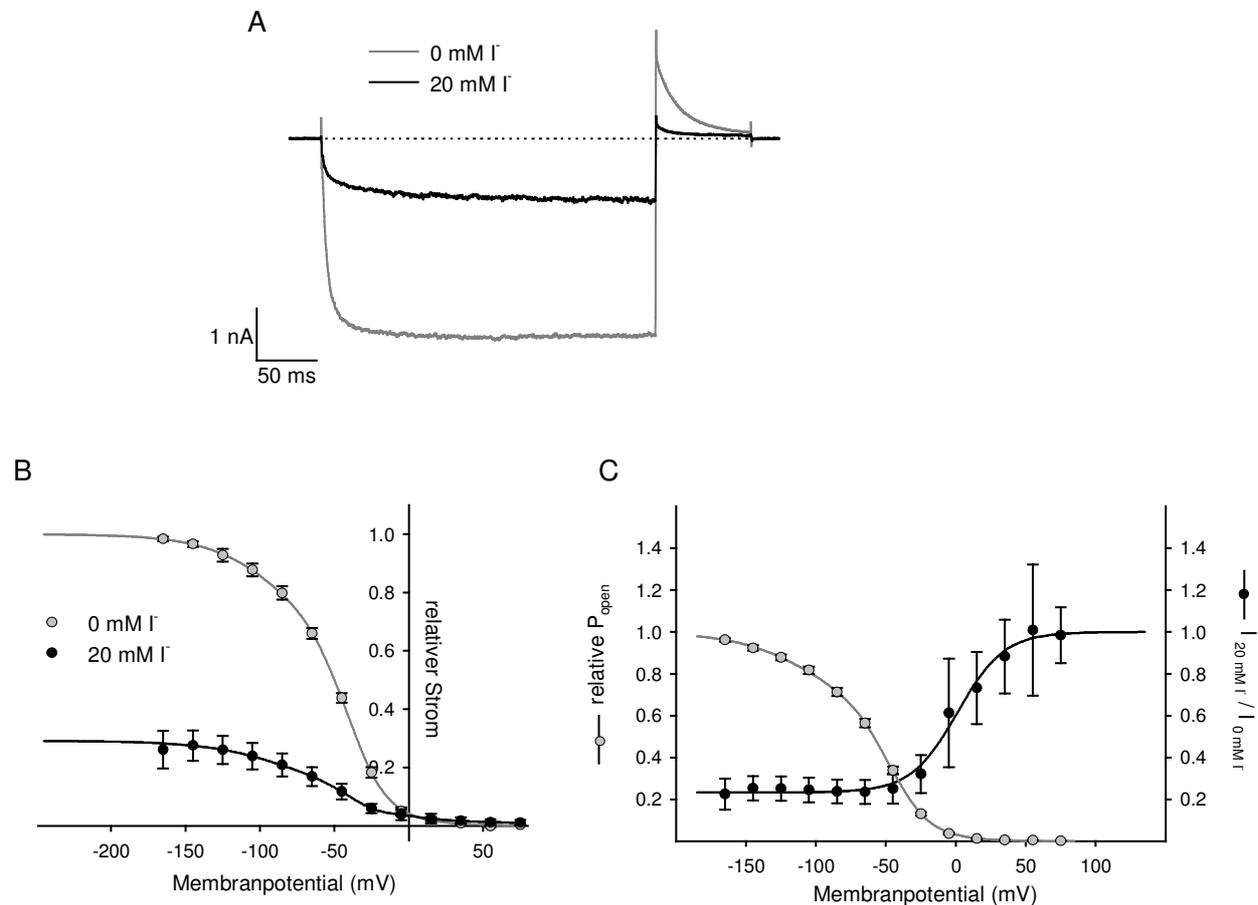


Abbildung 3.6: Abhängigkeit des Iodidblocks von rCIC-2 Δ16-61 vom Offenzustand des Kanals.

A: Stromantwort einer mit rCIC-2 Δ16-61 transfizierten tsA201-Zelle mit 0 mM extrazellulärem I⁻ (graue Spur) und 20 mM extrazellulärem I⁻ (schwarze Spur). Die Zelle wurde jeweils für 280 ms auf -165 mV hyperpolarisiert und anschließend für 80 ms auf +75 mV depolarisiert. Zum Vergleich ist außerdem der Nullstrom eingezeichnet (gepunktete Linie).

B: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeiten (P_{offen}) von rCIC-2 Δ16-61 nach einer Hyperpolarisation auf -165 mV für 280 ms mit 0 mM extrazellulärem I⁻ (○) und 20 mM extrazellulärem I⁻ (●). Die Daten wurden von 4 Zellen gemittelt. Die Kurven stellen an die gemittelten Werte angenäherte doppelte Boltzmann-Funktionen dar, von denen die Leckstrom-Komponente subtrahiert wurde und die anschließend auf die maximale Amplitude bei 0 mM I⁻ normiert wurden. V_{1/2}-Werte lagen bei -39,9 ± 1,6 mV und -84,3 ± 8,9 mV für 0 mM I⁻ und bei -46,0 ± 2,2 mV und -97,8 ± 12,1 mV für 20 mM I⁻.

C: Anteil des nicht-geblockten Stromes in Abhängigkeit vom Membranpotential (●), ermittelt aus den Daten der Zellen aus B. Für jede Spannung wurden die Stromamplituden bei 20 mM I⁻ durch die Amplituden bei 0 mM I⁻ dividiert. Die Werte wurden durch eine einfache Boltzmann-Funktion angenähert, die ihren V_{1/2}-Wert bei -4,3 ± 2,9 mV erreicht. Zum Vergleich ist außerdem die Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit (P_{offen}) von rCIC-2 Δ16-61 bei 0 mM I⁻ dargestellt (○).

Um den Anteil des Stromes zu ermitteln, der nicht durch Iodid geblockt wird, wurde für jede Spannung die Stromamplitude mit 20 mM I durch die Stromamplitude ohne Iodid geteilt. Dieser anteilige Strom ist in Abbildung 3.6 C in Abhängigkeit vom Membranpotential dargestellt. Die Werte können durch eine einfache Boltzmann-Funktion beschrieben werden. Zum Vergleich ist außerdem die Aktivierungskurve von rClC-2 Δ 16-61 in 0 mM I eingezeichnet. Durch diese Darstellungsweise wird erneut deutlich, daß der Block bei geöffnetem Kanal am stärksten ausgeprägt ist. Bei positiven Potentialen, wenn der Kanal geschlossen ist, ist kein Block vorhanden. Erst bei allmählicher Aktivierung des Kanals nimmt der Block durch Iodidionen zu, erreicht bei einem Potential von $-4,3 \pm 2,9$ mV ($n = 4$) seine halbmaximale Ausdehnung, bis er ab ca. -100 mV maximal wird. Er ist jedoch nie ganz vollständig: selbst bei maximaler Offenwahrscheinlichkeit von ClC-2 wird immer noch etwa ein Viertel des Gesamtstromes nicht geblockt. Der Block durch I ist also offensichtlich vom Offenzustand des Kanals abhängig: nur wenn der Kanal geöffnet ist, können die I-Ionen in der Pore binden.

Eine Spannungsabhängigkeit des Iodidblocks ist aus dem vorangegangenen Versuch nicht erkennbar, da zur Erstellung der Aktivierungskurve die Stromamplitude bei immer derselben Spannung gemessen wurde. Um die Abhängigkeit des Blocks vom Membranpotential zu untersuchen, wurde der Kanal durch eine Hyperpolarisation auf -145 mV erst maximal aktiviert und dann die Stromamplitude mit und ohne Iodid bei verschiedenen Spannungen gemessen. Dazu wurde das in Abschnitt 3.1.3 beschriebene und in Abbildung 3.4 A gezeigte Spannungsprotokoll verwendet. Die Ströme wurden anschließend auf die Amplitude bei -195 mV und 0 mM I normiert.

Die Strom-Spannungs-Kennlinien von rClC-2 Δ 16-61 mit und ohne Iodid sind in Abbildung 3.7 A dargestellt. Die Anwesenheit von 20 mM extrazellulärem Iodid hat eine signifikante Verschiebung des Umkehrpotentials in Richtung positiverer Spannungen zur Folge ($V_{\text{rev}(0 \text{ mM I})} = -4,0 \pm 0,7$ mV, $V_{\text{rev}(20 \text{ mM I})} = 0,8 \pm 0,1$ mV, $p < 0,05$, $n = 3$).

Des weiteren wird die lineare Beziehung zwischen instantanem Strom und Membranpotential in iodidfreiem extrazellulärem Medium zu einer einwärts rektifizierenden in 20 mM extrazellulärem Iodid: bei -195 mV beträgt der Anteil des durch I nicht geblockten Stromes 50 %, während bei +185 mV nur noch ca. 16 % des Stromes nicht durch I geblockt werden. Der Block des offenen ClC-2 Kanals durch Iodidionen ist also offensichtlich spannungsabhängig und bei positiven Potentialen stärker als bei negativen, wie von einem Anion zu erwarten ist.

Der gleiche Versuch wurde außerdem mit einem Präpuls von -60 mV durchgeführt (Abb. 3.7 B). Eine Einwärtsgleichrichtung unter Iodid des zuvor linearen instantanen Stromes ist auch hier zu beobachten, allerdings ist der Iodidblock nicht ganz so stark ausgeprägt: bei -195 mV sind 73 % des Stromes nicht geblockt, bei +185 mV beträgt der Anteil etwa 36 %. Da durch den Präpuls von -60 mV der Kanal nicht maximal aktiviert wird, ist dies ein weiterer Beweis dafür, daß der Iodidblock vom Offenzustand des Kanals abhängt.

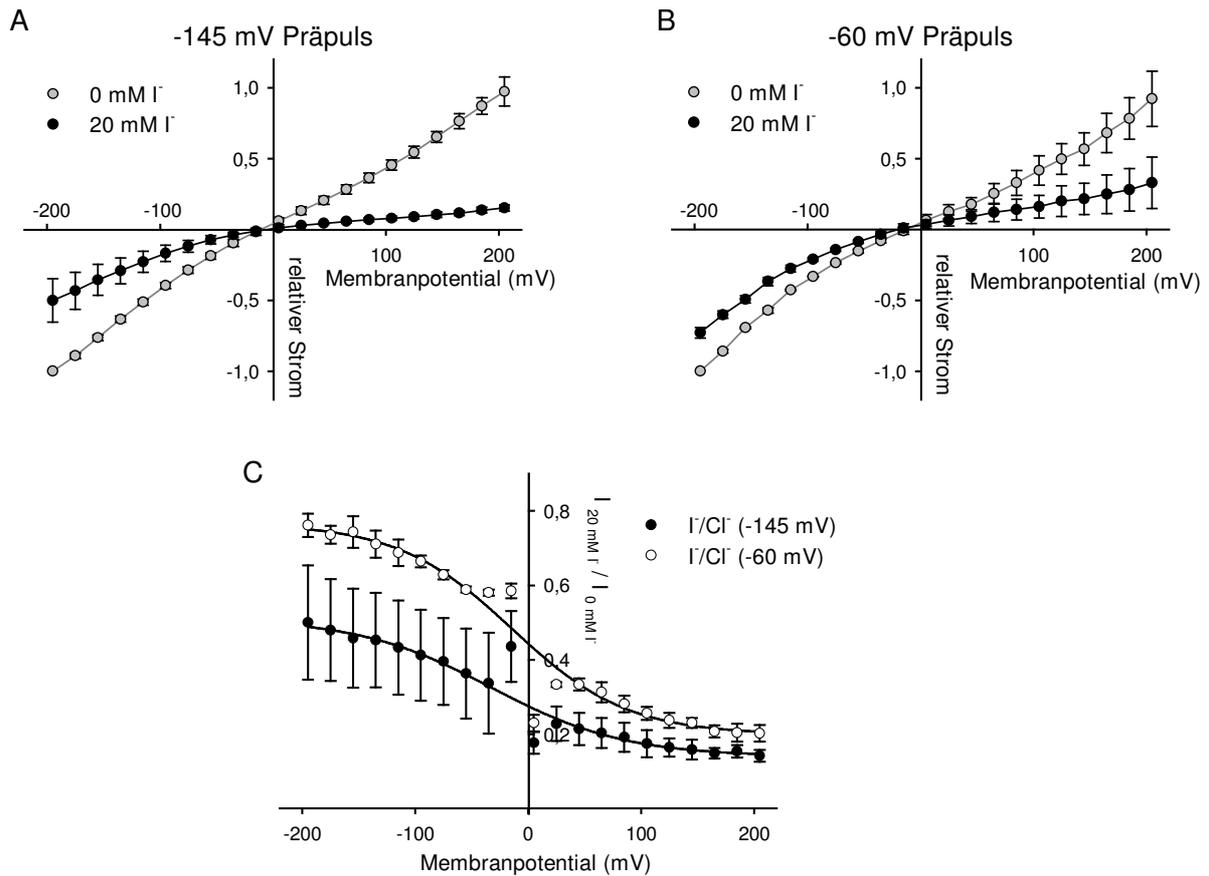


Abbildung 3.7: Spannungsabhängigkeit des Iodidblocks von rClC-2 Δ16-61 bei verschiedenen aktivierenden Präpuls.

A, B: Spannungsabhängigkeit der instantanen Stromamplituden von rClC-2 Δ16-61 mit 0 mM (●) und 20 mM (○) extrazellulärem I⁻ nach einem 37 ms langen, aktivierenden Spannungspuls von -145 mV (A) bzw. -60 mV (B). Die absoluten Werte wurden jeweils auf die Stromamplitude bei -195 mV und 0 mM I⁻ normiert und anschließend gemittelt (n = 3 (A) bzw. n = 2 (B)).

C: Anteil des nicht durch 20 mM I⁻ geblockten Stromes nach einem Präpuls von -145 mV (●) bzw. von -60 mV (○), ermittelt aus den Daten der Zellen aus A und B. Für jede Spannung wurden die Stromamplituden bei 20 mM I⁻ durch die bei 0 mM I⁻ dividiert. Diese Werte wurden durch einfache Boltzmann-Funktionen angenähert, deren V_{1/2}-Werte bei -24,6 ± 12,1 mV (-145 mV Präpuls) bzw. -13,0 ± 5,5 mV (-60 mV Präpuls) liegen.

Dies wird ebenfalls deutlich durch eine Darstellung des nicht-geblockten Stromanteils in Abhängigkeit vom Membranpotential für die verschiedenen Präpulse. Dafür wurde erneut der Strom mit 20 mM I⁻ durch den Strom ohne Iodid dividiert und der so ermittelte Anteil des nicht-geblockten Stromes gegen die Spannung aufgetragen (Abb. 3.7 C). Diese Werte konnten auch hier mit einer einfachen Boltzmann-Funktion beschrieben werden. Der nicht-geblockte Anteil der Ströme bei einem Präpuls von -145 mV ist für alle Spannungen geringer als bei einem Präpuls von -60 mV, was ebenfalls für die Abhängigkeit des Blocks vom Offenzustand des Kanals spricht. Seine halbmaximale Ausdehnung erreicht der Iodidblock nach einem Präpuls von -145 mV bei einer Spannung von -24,6 ± 12,1 mV (n = 3), nach einem Präpuls von -60 mV hingegen bei -13,0 ± 5,5 mV (n = 2). Die entsprechenden Steigungen betragen -55,6 ± 1,7 mV (-145 mV Präpuls) und -55,8 ± 4,4 mV (-60 mV

Präpuls). Daraus lassen sich die jeweiligen Dissoziationskonstanten von I^- bei 0 mV berechnen: der $K_D(0)$ -Wert beträgt $9,0 \pm 4,7$ mM für einen Präpuls von -145 mV und $15,8 \pm 1,9$ mM für einen Präpuls von -60 mV. Das heißt, bei einem stärker hyperpolarisierenden Präpuls und somit einer vollständigeren Aktivierung genügt bereits eine geringere I^- -Konzentration, um 50 % aller Kanäle zu blocken.

Der Block von rClC-2 durch Iodid-Ionen ist also sowohl von der Spannung als auch vom Offenzustand des Kanals abhängig.

3.1.6 Einfluß der intrazellulären Cl^- -Konzentration auf das Aktivierungsverhalten von hClC-2 WT

Das Schaltverhalten verschiedener Mitglieder der ClC-Kanal-Familie ist sowohl von der extrazellulären als auch von der intrazellulären Cl^- -Konzentration abhängig. Besonders die Aktivierung hyperpolarisationsaktivierter ClC-Kanäle wird stark durch intrazelluläres Chlorid beeinflusst (Fahlke et al., 1995; Pusch et al., 1999). Da die in dieser Arbeit als Standardlösung verwendete intrazelluläre Lösung mit 124 mM Cl^- eine unphysiologisch hohe Cl^- -Konzentration besitzt, wurde in verschiedenen Versuchen die intrazelluläre Cl^- -Konzentration reduziert, um den Einfluß von intrazellulärem Chlorid auf die Aktivierung von hClC-2 WT Kanälen zu untersuchen. Das Chlorid wurde dabei durch eine entsprechende Menge Glutamat ersetzt.

Die Abbildungen 3.8 A-C zeigen repräsentative Stromspuren mit hClC-2 WT transfizierter tsA201-Zellen bei verschiedenen intrazellulären Cl^- -Konzentrationen. Um einen Ausgleich der Cl^- -Konzentrationen zwischen Bad und Pipettenlösung zu vermeiden, wurde das Haltepotential an das jeweilige Cl^- -Gleichgewichtspotential angepaßt. Für 34 mM $[Cl^-]_i$ ergab sich so ein Haltepotential von -38 mV, für 15 mM $[Cl^-]_i$ -54 mV und für 4 mM $[Cl^-]_i$ eins von -85 mV. Die Zellen wurden für 1,4 s auf verschiedene Spannungen zwischen -165 mV und +55 mV im Abstand von jeweils 20 mV geklemmt, um sie anschließend für 400 ms auf +75 mV zu depolarisieren. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich mit abnehmender intrazellulärer Cl^- -Konzentration die absolute Stromamplitude reduziert und die Aktivierung des Stromes außerdem erst bei stärkerer Hyperpolarisation erfolgt.

Die Reduktion des absoluten Stromes ist auch aus Abbildung 3.8 D ersichtlich. Hier ist die gemittelte absolute Stromamplitude in Abhängigkeit vom Membranpotential nach einer 2,5 s langen Spannungsklemme für die verschiedenen intrazellulären Cl^- -Konzentrationen dargestellt. Bei -125 mV beträgt die Stromamplitude $2,8 \pm 0,6$ nA für 124 mM $[Cl^-]_i$ ($n = 9$), $0,26 \pm 0,06$ nA für 34 mM $[Cl^-]_i$ ($n = 9$), $0,15 \pm 0,02$ nA für 15 mM $[Cl^-]_i$ ($n = 7$) und $0,06 \pm 0,01$ nA für 4 mM $[Cl^-]_i$ ($n = 5$).

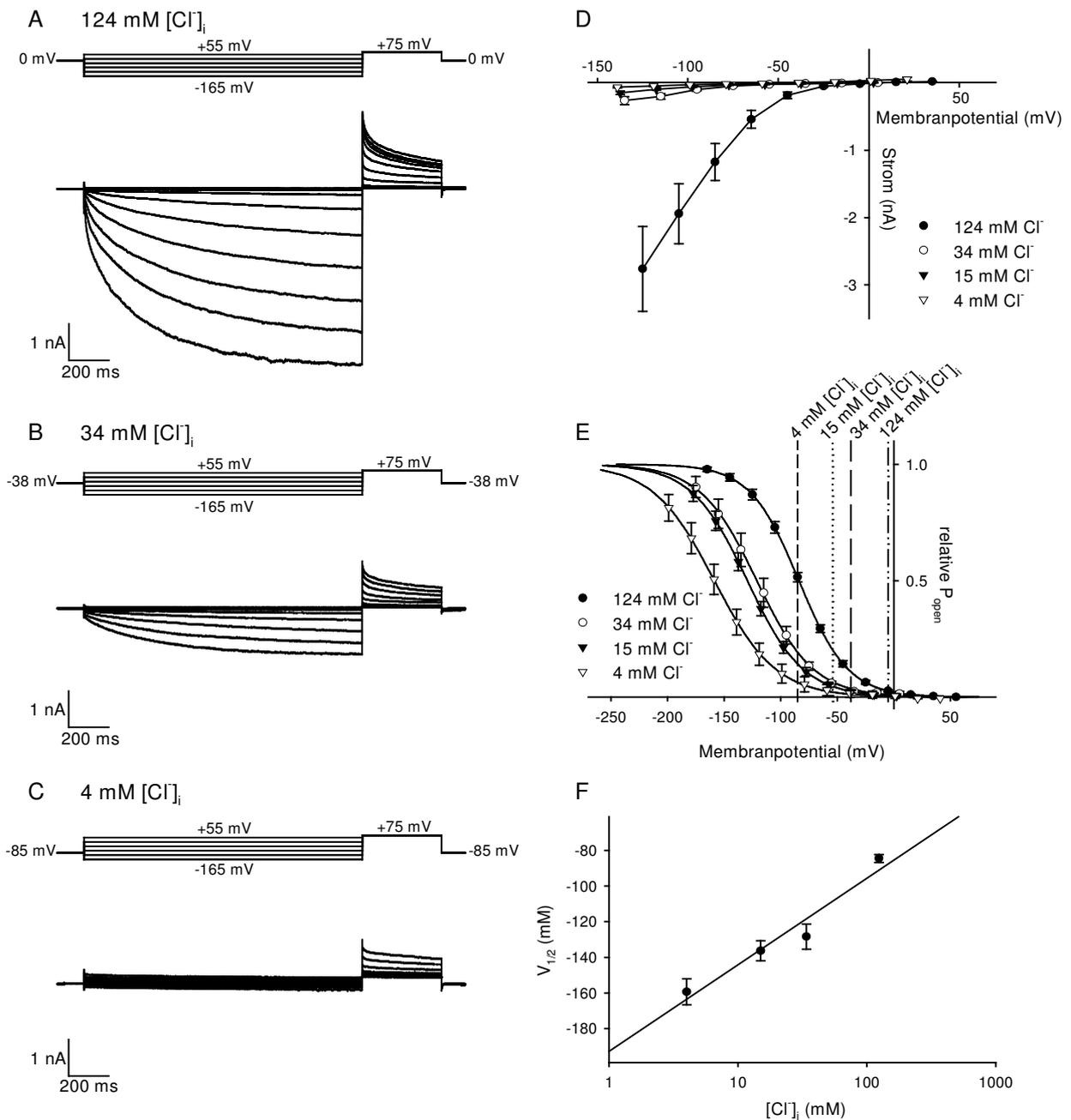


Abbildung 3.8: Abhängigkeit des Aktivierungsverhaltens von hClC-2 WT von $[Cl^-]_i$

A-C: Spannungsprotokolle und repräsentative Stromantworten von tsA201-Zellen, die mit hClC-2 WT transfiziert wurden, bei 124 mM $[Cl^-]_i$ (A), 34 mM $[Cl^-]_i$ (B) und 4 mM $[Cl^-]_i$. Ausgehend von verschiedenen Haltepotentialen wurden die Zellen für 1,4 s auf verschiedene Spannungen zwischen -165 mV und +55 mV geklemmt und anschließend für 400 ms auf +75 mV depolarisiert.

D: Spannungsabhängigkeit der absoluten Stromamplituden von hClC-2 WT nach einem 2,5 s langen Vorpuls bei 124 mM $[Cl^-]_i$ (●, n = 9), 34 mM $[Cl^-]_i$ (○, n = 9), 15 mM $[Cl^-]_i$ (▼, n = 7) und 4 mM $[Cl^-]_i$ (▽, n = 5).

E: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit (P_{open}) von hClC-2 WT nach einem 2,5 s langen Vorpuls bei 124 mM $[Cl^-]_i$ (●, n = 9), 34 mM $[Cl^-]_i$ (○, n = 9), 15 mM $[Cl^-]_i$ (▼, n = 7) und 4 mM $[Cl^-]_i$ (▽, n = 5). Die Daten wurden von denselben Zellen erhoben wie in D. Die $V_{1/2}$ -Werte für die verschiedenen $[Cl^-]_i$ liegen bei $-84,5 \pm 2,2$ mV (●), $-128,3 \pm 7,0$ mV (○), $-136,3 \pm 5,6$ mV (▼) und $-159,3 \pm 7,4$ mV (▽). Die vertikalen gestrichelten Linien stellen die Cl^- -Gleichgewichtspotentiale bei den verschiedenen Cl^- -Konzentrationen dar.

F: Abhängigkeit der $V_{1/2}$ -Werte von $[Cl^-]_i$ in halb-logarithmischer Auftragung (n = 5 - 9, wie in D und E). Die Gerade stellt eine lineare Regressionsgerade dar ($r^2 = 0,94$).

Die Abhängigkeit der Aktivierung vom intrazellulären Chlorid läßt sich anhand der relativen Offenwahrscheinlichkeiten von hCIC-2 WT bei den jeweiligen Cl^- -Konzentrationen erkennen (Abb. 3.8 E): mit abnehmender interner Cl^- -Konzentration findet eine parallele Verschiebung der Aktivierungskurve von hCIC-2 WT in Richtung negativer Potentiale statt. Die $V_{1/2}$ -Werte verschieben sich von $-84,5 \pm 2,2$ mV bei 124 mM $[\text{Cl}^-]_i$ nach $-128,3 \pm 7,0$ mV bei 34 mM $[\text{Cl}^-]_i$ und $-136,3 \pm 5,6$ mV bei 15 mM $[\text{Cl}^-]_i$ bis hin zu $-159,3 \pm 7,4$ mV bei 4 mM $[\text{Cl}^-]_i$. In der Graphik sind außerdem die Gleichgewichtspotentiale für die jeweiligen Chloridkonzentrationen eingezeichnet (gestrichelte senkrechte Linien). Man kann erkennen, daß eine nennenswerte Öffnung des Kanals bei jeder intrazellulären Chloridkonzentration erst negativ vom jeweiligen Cl^- -Gleichgewichtspotential erfolgt.

Die Relation zwischen der Spannung der halbmaximalen Aktivierung von hCIC-2 WT und der intrazellulären Cl^- -Konzentration ist in anderer Weise noch einmal in Abbildung 3.8 F gezeigt: die $V_{1/2}$ -Werte stehen demnach in einem logarithmischen Verhältnis zu $[\text{Cl}^-]_i$.

3.2 Funktionelle Auswirkungen drei verschiedener CIC-2 Mutationen aus Familien mit idiopathischer generalisierter Epilepsie

In dem Gen *CLCN2*, das den CIC-2 Kanal codiert, wurden in drei nicht miteinander verwandten Familien mit idiopathischer generalisierter Epilepsie (IGE) drei verschiedene Mutationen gefunden (Haug et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Mutationen mit molekularbiologischen Methoden in die DNA des CIC-2 Wildtyps eingeführt, die mutierten Kanäle in tsA201-Zellen heterolog exprimiert und ihre funktionellen Eigenschaften mit Hilfe der *whole-cell Patch-Clamp* Technik und mit fluorometrischen Methoden untersucht, um eine mögliche Erklärung für das Auftreten von epileptischen Anfällen in den betroffenen Patienten zu finden.

3.2.1 Elektrophysiologische Untersuchung der M200fsX231 Mutation

Die M200fsX231 Mutation umfaßt die Insertion eines einzelnen Nukleotids an der Basenpaar-Position 597 des *CLCN2* Gens (597insG), was zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons führt. Das hieraus resultierende Protein ist dadurch stark verkürzt: statt aus 898 Aminosäuren wie der Wildtyp besteht der mutierte Kanal aus nur noch 230 Aminosäuren, die lediglich die ersten sechs der sonst 18 α -Helices des Wildtyp-Kanals bilden (Abb. 3.9 A).

Das zusätzliche Nukleotid wurde mit Hilfe einer PCR in das hCIC-2 WT Konstrukt eingefügt und seine Insertion durch Sequenzierung verifiziert.

Die Transfektion von tsA201-Zellen mit dem mutierten Kanal führte zu keiner meßbaren Stromantwort (Abb. 3.9 C). Die transfizierten Zellen wurden den gleichen Spannungsprotokollen ausgesetzt, die zur Charakterisierung des Wildtyp-CIC-2 Kanals

verwendet wurden (1,4 s lange Spannungssprünge auf Potentiale zwischen -165 mV und +55 mV). Die mittlere Stromamplitude bei -125 mV betrug $0,06 \pm 0,01$ nA ($n = 12$) und unterschied sich damit nicht signifikant von den Strömen untransfizierter tsA201-Zellen beim gleichen Membranpotential. Das gleiche gilt für Zellen, die mit der DNA eines mutierten Kanals transfiziert wurden, an den C-terminal das eR-Exportsignal FCYENE angehängt wurde (mittlere Stromamplitude bei -125 mV: $0,07 \pm 0,01$ nA, $n = 4$).

CIC-Kanäle sind Dimere (Dutzler et al., 2002). Deshalb besteht in heterozygoten Patienten ein großer Teil der CIC-2 Kanäle aus einer WT- und einer mutierten Untereinheit, vorausgesetzt, daß zwischen mutierten und WT-Untereinheiten eine Interaktion stattfinden kann. Um die Funktionalität dieser Heterodimere zu testen, wurden tsA201-Zellen mit einem Konstrukt transfiziert, in dem eine WT- und eine mutierte Untereinheit mit einem 20 Aminosäuren-langen Linker hintereinandergehängt wurden (Fahlke et al., 1997a). Eine Hyperpolarisation dieser Zellen auf -125 mV ergab ebenfalls keinen meßbaren Strom ($0,06 \pm 0,01$ nA, $n = 13$). Die Transfektion mit Heterodimeren aus zwei aneinandergehängten Wildtyp-Untereinheiten resultierte hingegen in Strömen, die mit denen von transfizierten Monomeren vergleichbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt), was beweist, daß die künstlich erzeugten CIC-2 Heterodimere prinzipiell funktionell sind.

Die M200fsX231 Mutation wurde außerdem in einem Verhältnis von 1:1 mit dem WT hCIC-2 kotransfiziert. Diese Zellen zeigten einen signifikant kleineren Strom ($p < 0,01$) als solche, die nur mit hCIC-2 WT transfiziert worden waren: die maximalen Stromamplituden nach einer 1,4 s langen Hyperpolarisation auf -125 mV betrugen $0,5 \pm 0,3$ nA für die Kotransfektion ($n = 14$) bzw. $2,9 \pm 0,8$ nA ($n = 7$) für den Wildtyp. Die Abhängigkeit der absoluten Stromamplituden von der Membranspannung ist in Abbildung 3.9 E für alle Transfektionen mit der M200fsX231 Mutation zusammenfassend dargestellt.

3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung der del74-117 Mutation

Bei der del74-117 Mutation handelt es sich um eine alternative Spleißvariante des hCIC-2 WT Kanals. Kurz vor der 3'-Spleißstelle in Intron 2 fehlt eine 11 Basenpaare lange Sequenz, was ohne eine Verschiebung des Leserasters zum Verlust von Exon 3 und damit von 44 Aminosäuren (AS 74-117) des Proteins führt. Ein großer Teil der Helix B des CIC-2 Kanals ist dadurch deletiert (Abb. 3.9 B).

Die Deletion der entsprechenden Nukleotide wurde durch eine PCR in das CIC-2 Wildtyp Konstrukt eingeführt und die Basenabfolge der Mutation durch eine Sequenzierung überprüft. Mit dem mutierten Kanal transfizierte tsA201-Zellen, die dem gleichen Spannungsprotokoll ausgesetzt wurden, das zur Charakterisierung der Wildtyp-Ströme verwendet wurde, lieferten keine meßbaren Stromantworten (Abb. 3.9 D). Bei einer 1,4 s langen Hyperpolarisation auf -125 mV lag die mittlere Stromamplitude bei $0,09 \pm 0,03$ nA ($n = 9$). Dies ist statistisch nicht signifikant verschieden von Stromantworten untransfizierter tsA201-Zellen.

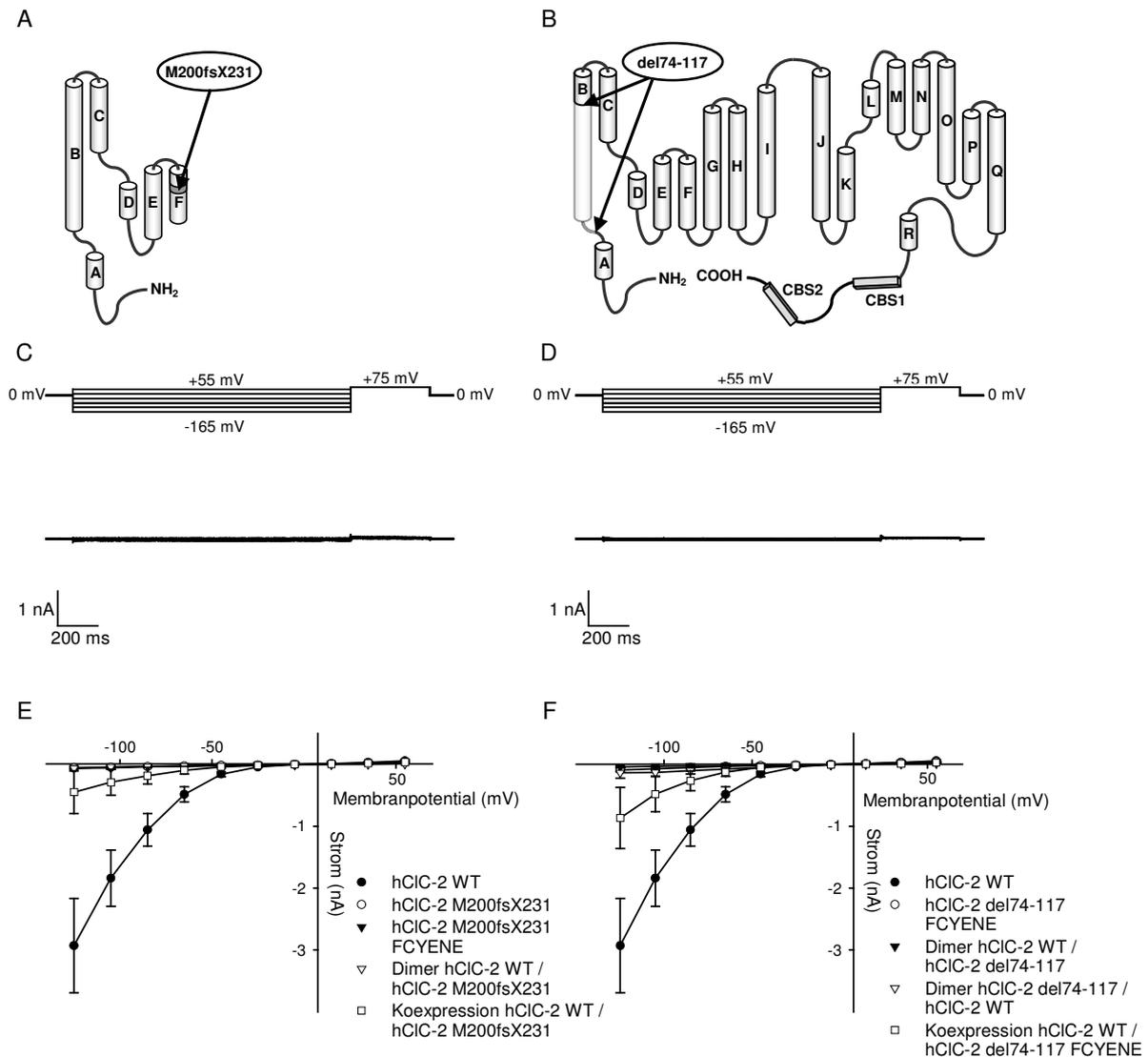


Abbildung 3.9: Die Mutationen M200fsX231 und del74-117 führen zu einem Funktionsverlust von hCIC-2 Kanälen.

A, B: Mutmaßliche Membrantopologie der CIC-2 Mutationen M200fsX231 und del74-117 (in Anlehnung an die Membrantopologie von CIC-Kanälen nach Dutzler et al., 2002). Das eingefügte Nukleotid in hCIC-2 M200fsX231 (A) ist als dunkler Ring dargestellt, die deletierten 44 Aminosäuren der Helix B in hCIC-2 del74-117 (B) sind heller hervorgehoben.

C, D: Spannungsprotokolle und repräsentative Stromantworten von tsA201-Zellen, die mit hCIC-2 M200fsX231 (C) bzw. hCIC-2 del74-117 (D) transfiziert wurden. Ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV wurden die Zellen bei 124 mM [Cl]_i für 1,4 s in Abständen von jeweils 20 mV auf verschiedene Spannungen zwischen -165 mV und +55 mV geklemmt, um sie dann für 400 ms auf +75 mV zu depolarisieren.

E: Spannungsabhängigkeit der absoluten Stromamplituden nach einem 1,4 s langen Vorpuls von hCIC-2 WT (●, n = 7), hCIC-2 M200fsX231 (○, n = 12), hCIC-2 M200fsX231 FCYENE (▼, n = 4), einem Dimer aus hCIC-2 WT und hCIC-2 M200fsX231 (▽, n = 13) und einer 1:1 Kotransfektion von hCIC-2 WT und hCIC-2 M200fsX231 (□, n = 14).

F: Spannungsabhängigkeit der absoluten Stromamplituden nach einem 1,4 s langen Vorpuls von hCIC-2 WT (●, n = 7), hCIC-2 del74-117 FCYENE (○, n = 9), dem Dimer hCIC-2 WT / hCIC-2 del74-117 (▼, n = 7), dem Dimer hCIC-2 del74-117 / hCIC-2 WT (▽, n = 7) und einer 1:1 Kotransfektion von hCIC-2 WT und hCIC-2 del74-117 FCYENE (□, n = 7).

Um die Funktionalität von Heterodimeren aus WT und del74-117 Mutanten zu testen, wurden zwei Konstrukte, die eine WT und eine mutierte Untereinheit durch einen Linker aus 20 Aminosäuren in einem gemeinsamen Leserahmen verbanden (Fahlke et al., 1997a), in tsA201-Zellen exprimiert. Auch hier waren bei -125 mV keine Stromantworten meßbar ($0,05 \pm 0,01$ nA, n = 7 für das Dimer WT/del74-117 und $0,14 \pm 0,08$ nA, n = 7 für das Dimer del74-117/WT).

Eine Kotransfektion von hCIC-2 WT und hCIC-2 del74-117 FCYENE im Verhältnis 1:1 führte zu einem signifikant kleineren absoluten Strom ($0,87 \pm 0,49$ nA, n = 7) als die alleinige Transfektion von hCIC-2 WT ($2,9 \pm 0,8$ nA, n = 7, $p < 0,05$). Die absoluten Stromamplituden in Abhängigkeit vom Membranpotential für alle Expressionen der del74-117 Mutation sind in Abbildung 3.9 F dargestellt.

Genau wie M200fsX231 hCIC-2 Kanäle sind also auch del74-117 hCIC-2 Kanäle nicht funktionell. Da in beiden Fällen auch die Heterodimere keine funktionellen Kanäle bilden, haben die Mutationen einen dominant-negativen Effekt.

3.2.3 Fluorometrische Untersuchungen der M200fsX231 und del74-117 Mutationen

Die fehlende Funktionalität von hCIC-2 M200fsX231 und hCIC-2 del74-117 Kanälen kann zwei mögliche Ursachen haben: entweder die mutierten Proteine werden aufgrund ihrer Deletionen gar nicht in die Zellmembran eingebaut oder sie gelangen bis in die Zellmembran, sind aber nicht in der Lage, dort funktionelle Kanäle zu bilden. Um dies zu überprüfen, wurde N-terminal ein YFP an den jeweiligen Kanal angehängt, um eine subzelluläre Lokalisation des Kanalproteins zu ermöglichen. Als positive Kontrolle wurde ein hCIC-2 WT Kanal verwendet, an dessen N-Terminus ebenfalls ein YFP angehängt worden war. tsA201-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert, und die Expression der Fusionsproteine aus YFP und den verschiedenen CIC-2 Kanälen wurde an einem konfokalen Mikroskop untersucht.

Repräsentative Aufnahmen von tsA201-Zellen, die den hCIC-2 Wildtyp, hCIC-2 M200fsX231 FCYENE, hCIC-2 del74-117 FCYENE, das hCIC-2 WT/hCIC-2 M200fsX231 Dimer und das hCIC-2 WT/hCIC-2 del74-117 Dimer mit jeweils einem N-terminal angehängten YFP exprimieren, sind in Abbildung 3.10 gezeigt. In allen Fällen ist Fluoreszenz auch in der Zellmembran zu erkennen, woraus zu schließen ist, daß zumindest ein Teil der Fusionsproteine in der Membran lokalisiert ist. Die fehlende Funktionalität der Mutationen ist also nicht auf einen fehlgeleiteten Transport der Kanalproteine innerhalb der Zelle zurückzuführen, sondern muß in einer beeinträchtigten Kanalfunktion begründet sein.

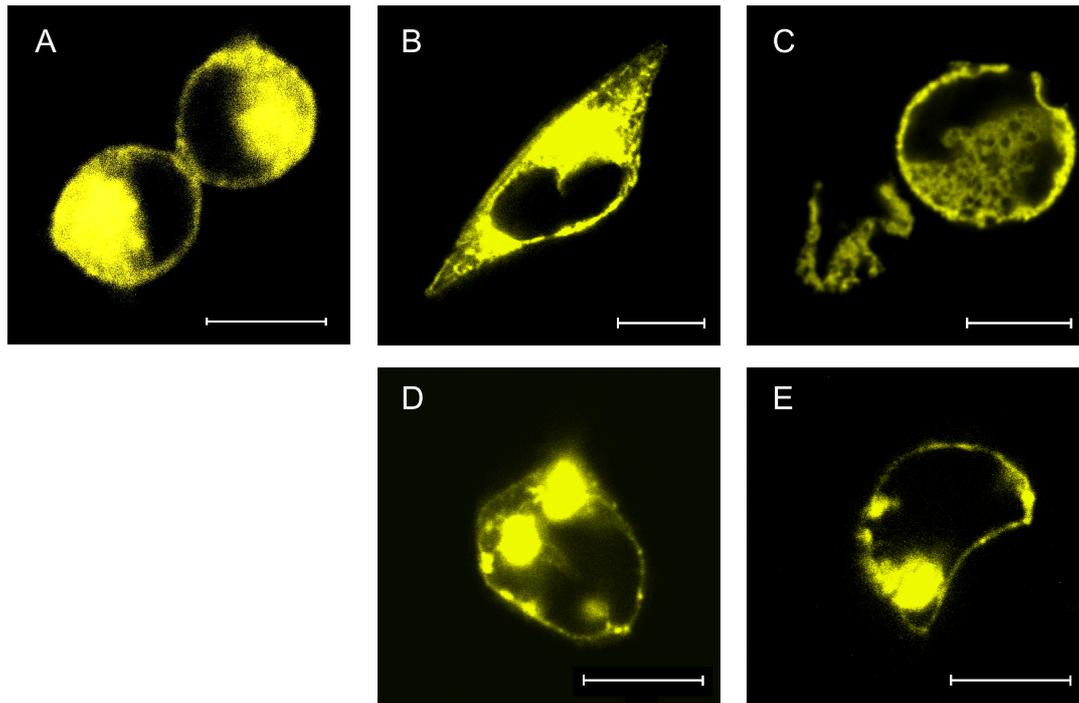


Abbildung 3.10: Die nicht-funktionellen hClC-2 Mutanten sind in der Zellmembran lokalisiert.

Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von tsA201 Zellen, die mit dem hClC-2 Wildtyp (a), hClC-2 M200fsX231 FCYENE (b), hClC-2 del74-117 FCYENE (c), dem hClC-2 WT / hClC-2 M200fsX231 Dimer (d) und dem hClC-2 WT / hClC-2 del74-117 Dimer (e) mit jeweils einem N-terminal angehängten YFP transfiziert wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

3.2.4 FRET-Untersuchungen zur Interaktion der M200fsX231 und der del74-117 Mutationen mit dem hClC-2 Wildtyp

Durch die Fluoreszenz-Aufnahmen konnte nachgewiesen werden, daß sich auch die mutierten hClC-2 Kanäle in der Zellmembran befinden. Ein fehlgeleiteter intrazellulärer Transport der Proteine scheidet somit als Ursache für den dominant-negativen Effekt der Mutationen aus.

Die künstlich erzeugten Heterodimere sind offensichtlich nicht funktionell. Ob die mutierten Kanäle *in vivo* jedoch überhaupt dazu fähig sind, mit den Wildtyp-Untereinheiten zu interagieren, ist nicht sicher. Die reduzierten Ströme der Kotransfektionen können also entweder auf die fehlende Funktionalität der Heterodimere oder auf eine mangelnde Interaktionsfähigkeit der Mutanten zurückzuführen sein. Um herauszufinden, ob eine Interaktion zwischen Wildtyp- und mutierten Kanaluntereinheiten stattfindet, wurden FRET-Messungen am konfokalen Mikroskop durchgeführt. FRET-Ereignisse wurden dabei anhand des Quenchens der Donor-Fluoreszenz durch den Akzeptor ermittelt, was durch die Zunahme der Donor-Fluoreszenzintensität nach Ausbleichen des Akzeptors quantifiziert werden konnte. Für die Experimente wurden fixierte Zellen verwendet, um eine Diffusion gebleichter und ungebleichter Fusionsproteine zu verhindern.

Um sicherzustellen, daß mit dem hier verwendeten System überhaupt FRET-Ereignisse registriert werden konnten, wurden als Positivkontrolle tsA201-Zellen verwendet, die mit einem Fusionsprotein aus CFP und YFP transfiziert worden waren. In diesem Konstrukt sind die beiden Fluorophoren nur durch einen Linker aus 20 Aminosäuren voneinander getrennt. Daß diese Distanz ausreichend gering für ein Auftreten von FRET-Ereignissen ist, wurde in anderen Arbeiten nachgewiesen (Schmid et al., 2001). In Abbildung 3.11 ist beispielhaft der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von YFP und CFP während einer Messung in einer mit diesem Fusionskonstrukt transfizierten Zelle für die gebleichte (A) und die nicht-gebleichte (B) Region dargestellt. In der gebleichten Region sind eine Abnahme der YFP-Intensität sowie eine parallele Zunahme der CFP-Intensität deutlich zu erkennen, während in der nicht-gebleichten Region keine starken Schwankungen im Intensitätsverlauf zu verzeichnen sind. Die Quantifizierung von FRET-Ereignissen erfolgte über die Meßgrößen E_f in der gebleichten Region, die die prozentuale Zunahme der CFP-Intensität nach dem Bleichen des Akzeptors beschreibt. Als Kontrollwert C_f wurde die gleiche Größe für eine nicht-gebleichte Referenz-Region derselben Zelle bestimmt. Um das systembedingte Rauschen zu erfassen, wurde außerdem die Veränderung der CFP-Intensität in der gebleichten Region vor dem Bleichvorgang ermittelt (N_f). Im Fall der Positivkontrolle lag die FRET-Effizienz E_f bei $24,1 \pm 0,6$, C_f bei $4,0 \pm 0,8$ und N_f bei $-1,5 \pm 0,4$ ($n = 15$). Der Wert für E_f ist also ca. sechs mal so groß wie der für C_f , was auf einen starken FRET-Effekt hindeutet. Durch dieses Experiment wurde bewiesen, daß mit dem verwendeten Meßsystem FRET-Ereignisse wahrgenommen werden können.

In Abbildung 3.11 ist zu erkennen, daß die Intensität beider Farbstoffe bereits vor dem beabsichtigten Bleichen des Akzeptors leicht abnimmt, was durch die für die Bildaufnahmen benötigte Laserintensität verursacht wird. Während des Bleichen des Akzeptors kann sich die Intensität des Donors jedoch erholen, so daß die Donorfluoreszenz anschließend auch in der nicht-gebleichten Region leicht erhöht ist (Abb. 3.11 B).

Um eine Fehlinterpretation dieser Zunahme als FRET-Ereignis auszuschließen, wurden als Negativkontrolle Messungen an Zellen durchgeführt, die nur mit einem CFP-Konstrukt transfiziert waren. Dafür wurde der humane Glutamatttransporter EAAT2 verwendet, an den N-terminal ein CFP angehängt worden war. Obwohl bei diesem Experiment kein Akzeptor vorhanden war, wurden diese Zellen genauso mit Licht der Wellenlänge 514 nm und 100 %iger Laserintensität bestrahlt und anschließend die Veränderungen in der CFP-Intensität ermittelt. Erstaunlicherweise resultierten diese Experimente ebenfalls in einem positiven Wert für E_f ($4,0 \pm 0,3$, $n = 28$), obwohl FRET hier unmöglich sein sollte, da kein Akzeptor vorhanden ist, der die Donor-Fluoreszenz quenchen könnte. Die Kontrollwerte für C_f und N_f sind hingegen signifikant kleiner als E_f ($0,8 \pm 0,5$ bzw. $-0,7 \pm 0,3$, $n = 28$, $p < 0,01$). Ein möglicher Grund für diese positive FRET-Effizienz könnte in nicht immobilisierten, zelleigenen Hintergrundfluorophoren liegen, auf die der gemessene FRET-Effekt zurückzuführen ist.

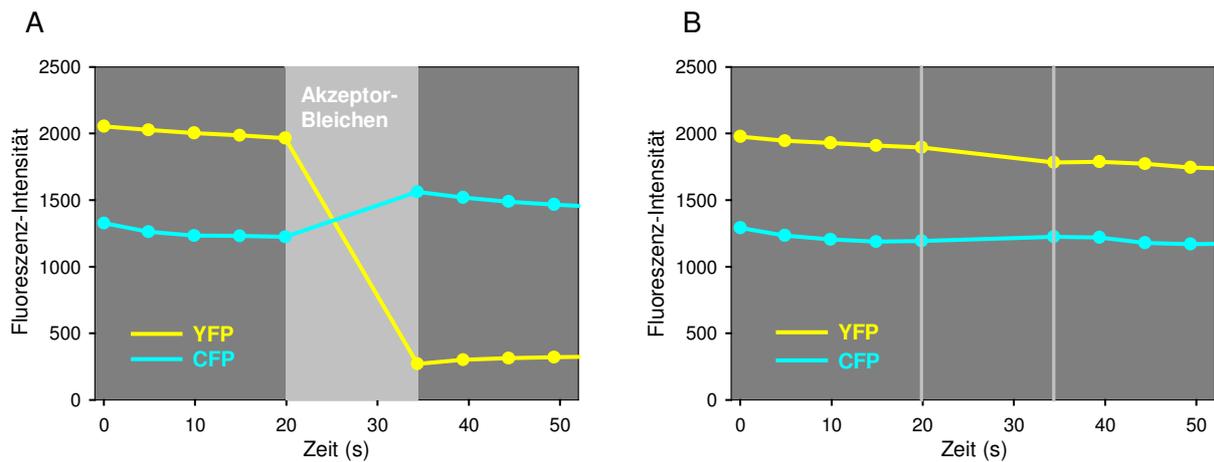


Abbildung 3.11: Beispiel für den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während einer FRET-Messung.

Verlauf der Intensitäten von YFP (gelb) und CFP (blau) in der Region ROI 1, in der der Akzeptor gebleicht wurde (A), und in der Kontrollregion ROI 2, in der kein Bleichen stattfand (B). Alle 5 s wurden die beiden Intensitäten gemessen. Nach fünf Aufnahmen wurde der Akzeptor (YFP) gebleicht, anschließend wurden weitere fünf Bilder gemacht. Der Zeitraum, in dem in ROI 1 das YFP gebleicht wurde, ist in A hellgrau unterlegt und zum Vergleich in B durch graue Linien gekennzeichnet.

Da also offensichtlich eine endogene Hintergrundfluoreszenz auch zu positiven Werten für E_f führen kann, wurden für alle Kotransfektionen von hCIC-2 Wildtyp und Mutanten, deren Interaktionsfähigkeit mittels FRET-Messungen überprüft werden sollte, zusätzliche Negativkontrollen durchgeführt, die als Referenz dienen, um falsche Positivsignale erkennen zu können. Für diese Negativkontrollen wurde der humane Glutamattransporter EAAT2 verwendet, an den N-terminal ein CFP angehängt wurde und der mit den entsprechenden YFP-hCIC-2 Konstrukten kotransfiziert wurde.

In Tabelle 3.1 sind sämtliche Koexpressionen der verwendeten Fluoreszenz - hCIC-2 Konstrukte in tsA201 Zellen aufgelistet, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, um sie auf mögliche FRET-Effekte hin zu untersuchen.

Tabelle 3.1: Kotransfektionen zur Ermittlung der FRET-Effizienz E_f

	CFP hCIC-2 WT	CFP EAAT2
YFP hCIC-2 WT	x	x
YFP hCIC-2 M200fsX231 FCYENE	x	x
YFP hCIC-2 del74-117 FCYENE	x	x

Bei der Auswertung der Ergebnisse mit der hier verwendeten Methode zur Quantifizierung von FRET-Ereignissen wurden einige zusätzliche Einschränkungen vorgenommen. Da man bei einer größeren Menge an Akzeptor ein stärkeres Quenchen der Donor-Intensität erwarten würde, wurden für jede Zelle die YFP-Intensität und die generelle Dichte beider Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Bleichen sowie das Verhältnis von YFP zu CFP nach Abzug

der jeweiligen Hintergrundintensität B bestimmt. Bei einigen Koexpressionen war die FRET-Effizienz E_f tatsächlich deutlich von dem Verhältnis von $(I_{YFP}-B_{YFP}) / (I_{CFP}-B_{CFP})$ sowie von der anfänglichen YFP-Intensität abhängig (Abb. 3.12).

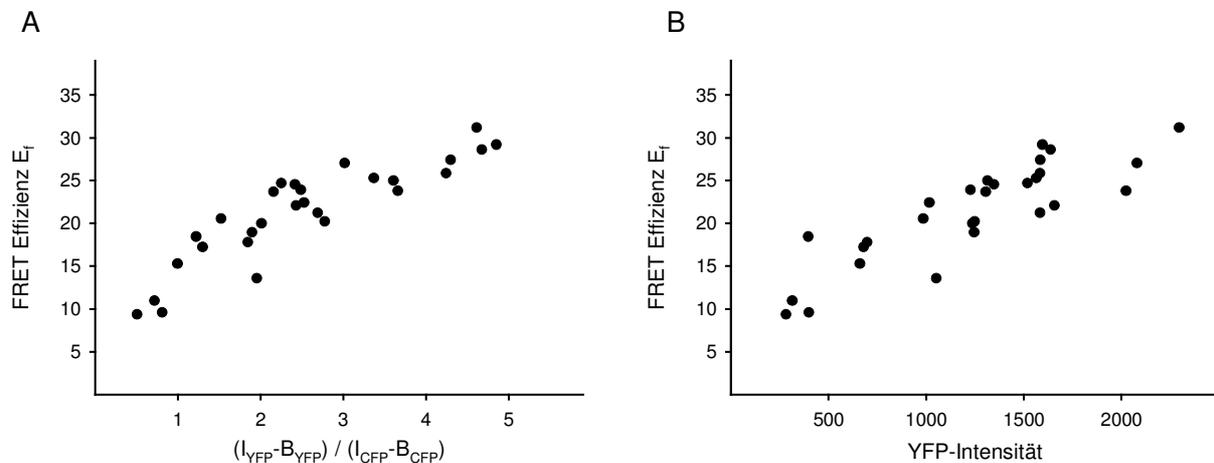


Abbildung 3.12: Die FRET-Effizienz E_f ist abhängig vom Verhältnis der beiden Fluoreszenz-Intensitäten sowie von der absoluten YFP-Intensität.

A: Abhängigkeit der FRET-Effizienz E_f vom Verhältnis $(I_{YFP}-B_{YFP}) / (I_{CFP}-B_{CFP})$. Für 28 Zellen, die mit CFP hCIC-2 WT und YFP hCIC-2 M200fsX231 kotransfiziert worden waren, wurde jeweils die Intensität von YFP bzw. CFP zu Beginn der Messung ermittelt und die mittlere Hintergrund-Intensität B für die jeweilige Emissionswellenlänge des entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffes subtrahiert. Die FRET-Effizienz E_f wurde berechnet wie im Abschnitt 2.8.4 beschrieben.

B: Abhängigkeit der FRET-Effizienz E_f von der YFP-Intensität vor dem Bleichvorgang. Für 28 Zellen wurde E_f gegen die mittlere YFP-Intensität der ersten fünf Bilder vor dem Bleichen aufgetragen.

Um in dieser Hinsicht einheitlichere Bedingungen zu schaffen, wurden bei allen Meßreihen nur die Zellen in die Auswertung mit einbezogen, bei denen das Verhältnis $(I_{YFP}-I_B) / (I_{CFP}-I_B)$ zwischen 1 und 2 und deren YFP-Intensität zu Beginn zwischen 1500 und 3000 lag. Eine Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der generellen Dichte an Fluoreszenzfarbstoffen war nie zu erkennen, wenn nicht auch gleichzeitig eine Abhängigkeit von der YFP-Intensität vorlag, so daß diese Größe nicht weiter berücksichtigt wurde.

Abbildung 3.13 A zeigt die Werte für E_f und C_f für alle in Tabelle 3.1 aufgelisteten Kotransfektionen. In allen Fällen ist die FRET-Effizienz E_f deutlich positiver als die Negativkontrolle, in der nur ein CFP-Fusionsprotein transfiziert wurde (hier lag E_f bei $4,0 \pm 0,3$), und außerdem signifikant größer als die Kontrollwerte C_f und N_f . Dies gilt jedoch sowohl für die Kotransfektionen von zwei hCIC-2 Untereinheiten als auch für die Versuche, bei denen CIC-2 mit dem Glutamattransporter kotransfiziert wurde. Im Fall des CIC-2 Wildtyps zeigt die Negativkontrolle mit EAAT2 sogar einen signifikant größeren FRET-Effekt als die Kotransfektion von zwei Wildtyp-Untereinheiten ($p < 0,01$). Da nicht anzunehmen ist, daß CIC-2 mit EAAT2 interagiert, muß dies auf unspezifische Interaktionen zurückzuführen sein, die ebenfalls einen FRET-Effekt hervorrufen.

In einem zweiten Experiment wurde deshalb versucht, die Interaktion zwischen den CIC-2 Untereinheiten auf indirektem Wege nachzuweisen. Dazu wurde als Referenz eine Kotransfektion von YFP-hCIC-2 und CFP-hCIC-2 verwendet, in der für beide Konstrukte die gleiche Menge DNA transfiziert wurde. Zu diesem FRET-Paar wurden die zu testenden Kanäle (hCIC-2 WT, hCIC-2 M200fsX231 und hCIC-2 del74-117) ohne angehängtes Fluoreszenzprotein in zehnfacher Menge hinzutransfiziert. Wenn der zusätzlich transfizierte, nicht-fluoreszierende Kanal mit dem fluoreszierenden Wildtyp interagiert, sollte dies die Interaktion zwischen YFP-hCIC-2 und CFP-hCIC-2 stören und somit die FRET-Effizienz verringern. Als Negativkontrolle wurde auch hier der humane Glutamattransporter EAAT2 zu dem Referenz-FRET-Paar hinzutransfiziert. Die Komponenten der einzelnen Kotransfektionen sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Kombination verschiedener CIC-2 Untereinheiten mit und ohne angehängtes Fluoreszenzprotein zum indirekten Nachweis eines FRET-Effektes.

	A	B	C	D	E
CFP hCIC-2 WT	+	+	+	+	+
YFP hCIC-2 WT	+	+	+	+	+
hCIC-2 WT	-	+	-	-	-
hCIC-2 M200fsX231	-	-	+	-	-
hCIC-2 del74-117	-	-	-	+	-
EAAT2	-	-	-	-	+

Abbildung 3.13 B zeigt, daß auch auf diese Weise keine spezifische Interaktion zwischen den verschiedenen hCIC-2 Untereinheiten nachgewiesen werden konnte: die FRET-Effizienz des Referenz-Paares (A, $E_f = 11,6 \pm 0,6$) wird nur durch EAAT2 (E) in einem signifikanten Ausmaß verringert ($E_f = 8,9 \pm 0,6$, $p < 0,01$), die verschiedenen hCIC-2 Untereinheiten (B-D) zeigten dagegen alle keinen Effekt. Da eine Interaktion zwischen hCIC-2 und EAAT2 unwahrscheinlich ist, bleibt nur die Schlußfolgerung, daß eine spezifische Interaktion zwischen den mutierten Untereinheiten und dem Wildtyp von hCIC-2 mit der FRET-Methode nicht nachweisbar ist. Ob die fehlende Funktionalität der Heterodimere auf eine mangelnde Interaktionsfähigkeit der Mutanten zurückzuführen ist, bleibt also ungeklärt.

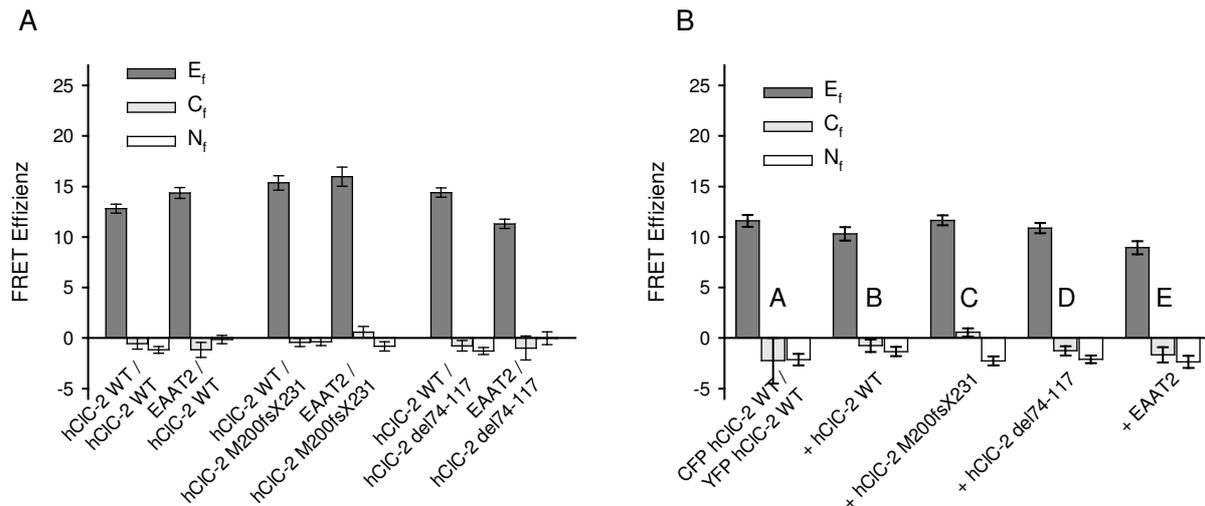


Abbildung 3.13: FRET-Effizienzen für verschiedene Kotransfektionen von hCIC-2 WT, den IGE-Mutanten M200fsX231 und del74-117 und dem Glutamattransporter EAAT2.

A: E_f , C_f und N_f -Werte für Kotransfektionen von CFP hCIC-2 WT bzw. CFP EAAT2 mit YFP hCIC-2 WT, YFP hCIC-2 M200fsX231 bzw. YFP hCIC-2 del74-117 (entsprechend Tabelle 3.1).

B: E_f , C_f und N_f -Werte für Kotransfektionen von CFP hCIC-2 WT und YFP hCIC-2 WT alleine (A) und für Kotransfektionen von CFP hCIC-2 WT und YFP hCIC-2 WT mit der zehnfachen Menge an hCIC-2 WT (B), hCIC-2 M200fsX231 (C), hCIC-2 del74-117 (D) bzw. EAAT2 (E) ohne angehängtes YFP (entsprechend Tabelle 3.2).

3.2.5 Elektrophysiologische Untersuchung der G715E Mutation

Bei der Mutation G715E handelt es sich um eine Punktmutation (Abb. 3.14 A): ein einzelnes Nukleotid an der Basenpaarposition 2144 ist ausgetauscht (G2144A). Dadurch wird im Protein an der Position 715 zwischen den beiden CBS-Domänen ein Glycin durch ein Glutamat ersetzt (G715E).

Mit Hilfe einer PCR wurde diese Punktmutation in das hCIC-2 WT Konstrukt eingefügt und der Erfolg der PCR durch Sequenzierung überprüft.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Mutationen sind hCIC-2 G715E Kanäle funktionell. Abbildung 3.14 B zeigt eine repräsentative Stromantwort einer tsA201-Zelle mit 124 mM intrazellulärem Chlorid, die mit hCIC-2 G715E transfiziert wurde. Die Zelle wurde für 2,5 s auf verschiedene Spannungen zwischen -165 mV und +55 mV geklemmt und anschließend für 200 ms auf +75 mV depolarisiert. Genau wie der Wildtyp ist der mutierte Kanal bei positiven Potentialen geschlossen und aktiviert langsam bei Hyperpolarisation. Die Aktivierungszeitkonstanten, die durch die Annäherung einer biexponentiellen Funktion an den Zeitverlauf der Aktivierung ermittelt wurden, liegen etwa in der gleichen Größenordnung wie beim hCIC-2 WT (zwischen 800 und 2200 ms für die langsame Zeitkonstante und zwischen 135 und 480 ms für die schnelle Zeitkonstante) und sind ebenfalls leicht spannungsabhängig, d.h. sie nehmen mit zunehmender Hyperpolarisierung ab. Auch die mittleren absoluten Stromamplituden sind mit denen des WT Kanals vergleichbar (siehe Tabelle 3.3).

Die Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit bei 124 mM $[Cl^-]_i$ unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant von der des Wildtyps: die G715E Mutante erreicht ihre halbmaximale Aktivierung nach einer 2,5 s langen Hyperpolarisation bei $-86,5 \pm 5,0$ mV, die Steigung beträgt $-21,7 \pm 1,7$ mV ($n = 7$); der Wildtyp hat einen $V_{1/2}$ -Wert von $-84,5 \pm 2,2$ mV und eine Steigung von $-17,8 \pm 4,7$ mV ($n = 9$).

Bei hohem intrazellulären Cl^- -Gehalt ist also kein Unterschied zwischen dem hCIC-2 Wildtyp und der G715E Mutante feststellbar. Dies ändert sich jedoch bei niedrigeren intrazellulären Cl^- -Konzentrationen: genau wie beim Wildtyp wird auch bei hCIC-2 G715E die absolute Stromamplitude durch Verringerung von $[Cl^-]_i$ reduziert (siehe Tabelle 3.3). Auch die Aktivierungskurve des mutierten Kanals verschiebt sich durch eine Reduktion von $[Cl^-]_i$ in Richtung negativer Potentiale (Abb. 3.14 C), jedoch ist diese Verschiebung nicht so ausgeprägt wie beim hCIC-2 WT (Tabelle 3.3): die $V_{1/2}$ -Werte der G715E Mutante liegen bei allen reduzierten intrazellulären Chloridkonzentrationen positiver als die des Wildtyps. Dieser Unterschied ist in allen Fällen signifikant ($p < 0,05$).

Tabelle 3.3: Vergleich der absoluten Stromamplituden nach Hyperpolarisation auf -125 mV für 2,5 s und der $V_{1/2}$ -Werte von hCIC-2 WT und hCIC-2 G715E bei verschiedenen intrazellulären Chloridkonzentrationen

$[Cl^-]_i$	absolute Stromamplituden (nA)		$V_{1/2}$ -Werte (mV)	
	hCIC-2 WT	hCIC-2 G715E	hCIC-2 WT	hCIC-2 G715E
124 mM	$2,8 \pm 0,6$ ($n = 9$)	$2,8 \pm 0,9$ ($n = 7$)	$-84,5 \pm 2,2$ ($n = 9$)	$-86,5 \pm 5,0$ ($n = 7$)
34 mM	$0,26 \pm 0,06$ ($n = 9$)	$0,35 \pm 0,14$ ($n = 4$)	$-128,3 \pm 7,0$ ($n = 9$)	$-99,7 \pm 4,5$ ($n = 4$)
15 mM	$0,15 \pm 0,02$ ($n = 7$)	$0,17 \pm 0,04$ ($n = 7$)	$-136,3 \pm 5,6$ ($n = 7$)	$-118,2 \pm 4,9$ ($n = 7$)
4 mM	$0,06 \pm 0,01$ ($n = 5$)	$0,04 \pm 0,01$ ($n = 8$)	$-159,3 \pm 7,4$ ($n = 5$)	$-135,5 \pm 6,9$ ($n = 8$)

Die geänderte Abhängigkeit des Schaltverhaltens von der intrazellulären Chloridkonzentration wird auch in Abbildung 3.14 D deutlich. Das logarithmische Verhältnis zwischen den $V_{1/2}$ -Werten und $[Cl^-]_i$ bleibt erhalten, zeigt allerdings eine geänderte Steigung. Der mutierte Kanal besitzt demnach einen höheren $K_D(0)$ -Wert und zeigt eine steilere Spannungsabhängigkeit der Chloridbindung als der Wildtyp (Cui et al., 1997).

Das Verhalten von Heterodimeren aus einer WT- und einer mutierten Untereinheit wurde im Fall der G715E Mutante nicht untersucht, da der Funktionszugewinn der mutierten Homodimere bereits eine hinreichende Erklärung für das Auftreten von epileptischen Anfällen bietet (siehe Diskussion, Abschnitt 4.4.2).

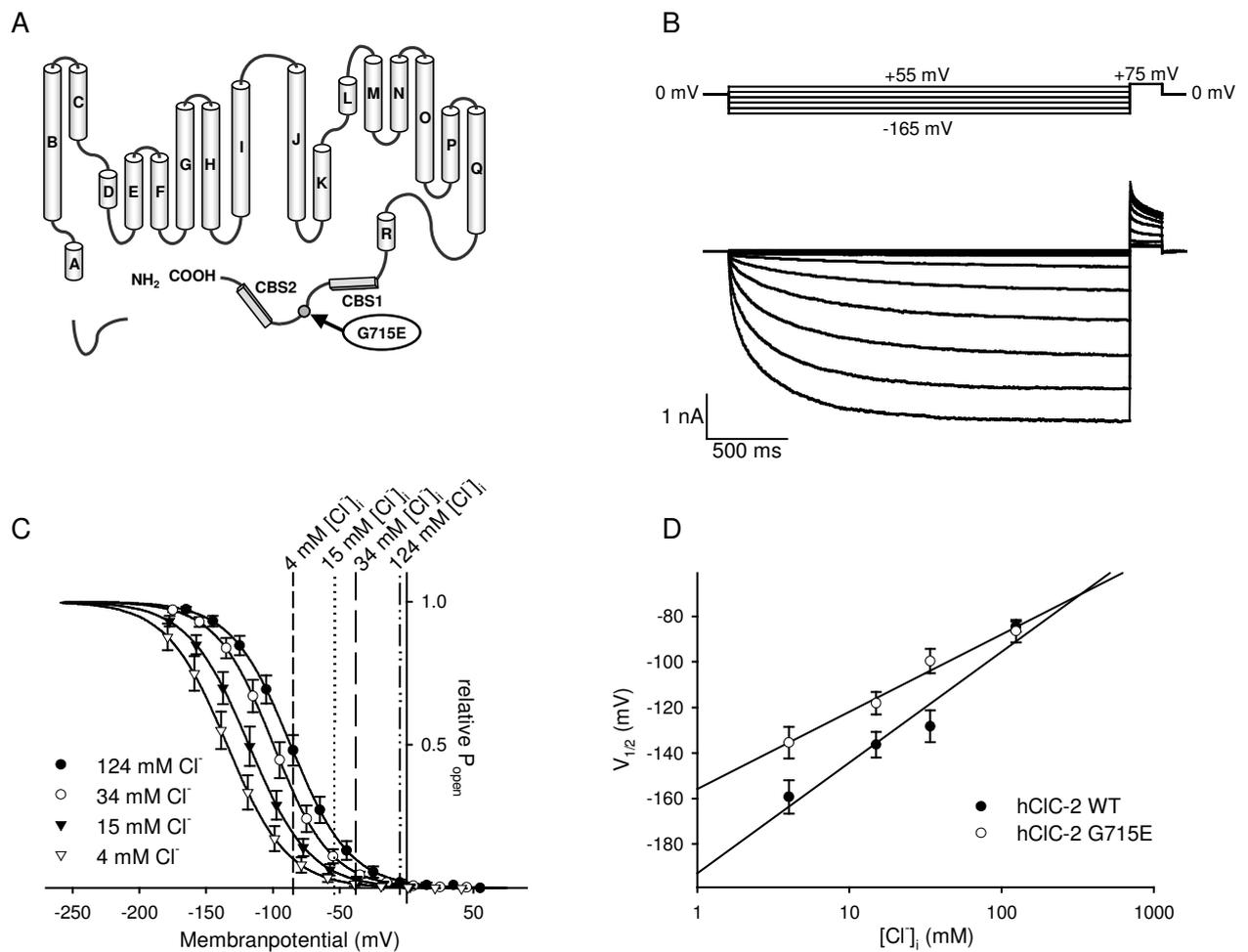


Abbildung 3.14: Die G715E Mutante ist funktionell und zeigt eine geänderte Spannungsabhängigkeit des Schaltverhaltens von hClC-2.

A: Mutmaßliche Membrantopologie der ClC-2 Mutation G715E (in Anlehnung an die Membrantopologie von ClC-Kanälen nach Dutzler et al., 2002). Die Punktmutation im C-Terminus des Kanals ist als grauer Punkt dargestellt.

B: Spannungsprotokoll und repräsentative Stromantwort einer tsA201-Zelle, die mit hClC-2 G715E transfiziert wurde bei 124 mM $[Cl^-]_i$. Ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV wurde die Zelle für 2,5 s auf verschiedene Spannungen zwischen -165 mV und +55 mV geklemmt und anschließend für 200 ms auf +75 mV depolarisiert.

C: Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit (P_{offen}) von hClC-2 G715E nach einem 2,5 s langen Vorpuls bei 124 mM $[Cl^-]_i$ (●, n = 7), 34 mM $[Cl^-]_i$ (○, n = 4), 15 mM $[Cl^-]_i$ (▼, n = 7) und 4 mM $[Cl^-]_i$ (▽, n = 8). Von den gemittelten Werten sowie den angenäherten einfachen Boltzmann-Funktionen wurde die Leckstrom-Komponente subtrahiert, anschließend wurden sie auf die maximale Amplitude normiert. Die $V_{1/2}$ -Werte für die verschiedenen $[Cl^-]_i$ liegen bei $-86,5 \pm 5,0$ mV (●), $-99,7 \pm 4,5$ mV (○), $-118,2 \pm 4,9$ mV (▼) und $-135,5 \pm 6,9$ mV (▽). Die vertikalen gestrichelten Linien markieren die Gleichgewichtspotentiale bei den verschiedenen $[Cl^-]_i$.

D: Abhängigkeit der $V_{1/2}$ -Werte von $[Cl^-]_i$ in halb-logarithmischer Auftragung für hClC-2 WT (●) und hClC-2 G715E (○, n = 4 - 8, wie in C). Die Geraden repräsentieren lineare Regressionsgeraden ($r^2 = 0,94$ für hClC-2 WT und $r^2 = 0,98$ für hClC-2 G715E).

4 DISKUSSION

CIC-2 ist ein Mitglied der CIC-Kanalfamilie mit einem ubiquitären Expressionsmuster, das sich mit seiner Aktivierung durch Membranhyperpolarisation, hypotones Medium und niedrigen pH-Wert in seinen biophysikalischen Eigenschaften von anderen CIC-Kanälen unterscheidet (Jentsch et al., 2002). Er wurde vor etwa zehn Jahren kloniert (Thiemann et al., 1992) und seitdem mit verschiedenen molekularbiologischen, elektrophysiologischen, immun-histologischen und proteinbiochemischen Methoden sowohl in nativen Zellen als auch in unterschiedlichen heterologen Expressionssystemen untersucht. Es wurden bislang verschiedene physiologische Funktionen für CIC-2 vorgeschlagen, die von der Regulation des Zellvolumens über eine Rolle beim transepithelialen Transport bis hin zu einer Beteiligung an der Erregbarkeit von Neuronen und Myocyten reichen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden der CIC-2 Kanal der Ratte und der des Menschen elektrophysiologisch charakterisiert und mit bereits beschriebenen Ergebnissen aus der Literatur verglichen. Mögliche Schlußfolgerungen für die Struktur-Funktions-Beziehungen dieses Kanals, die sich daraus ergeben, werden in der ersten Hälfte dieses Abschnitts dargestellt. Der zweite Teil der Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung drei verschiedener Mutationen von CIC-2, die in Patienten mit idiopathischer generalisierter Epilepsie (IGE) identifiziert wurden. Die hierbei entdeckten Änderungen in der Kanalfunktion bieten eine mögliche Erklärung für das Auftreten epileptischer Anfälle und lassen Rückschlüsse auf die Bedeutung von CIC-2 bei der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit zu, die am Ende dieses Abschnitts diskutiert werden.

4.1 Heterologe Expression von CIC-2

In dieser Arbeit wurden Experimente zur Charakterisierung der biophysikalischen Eigenschaften von CIC-2 an rekombinanten Isoformen des Menschen (hCIC-2) und der Ratte (rCIC-2) durchgeführt. Die Kanäle wurden in einer humanen Zelllinie (tsA201-Zellen) transient exprimiert und ihre Ströme elektrophysiologisch mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration gemessen.

In der Literatur existieren zahlreiche Berichte über die heterologe Expression von CIC-2. Sowohl in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* als auch in Säugerkzellen wurden von CIC-2 vermittelte Ströme untersucht. Diese unterschiedlichen Expressionssysteme können einen großen Einfluß auf die Kanaleigenschaften haben. Zum Beispiel hatte die Deletion einer N-terminalen Domäne von rCIC-2 völlig verschiedene Auswirkungen auf das Schaltverhalten,

je nachdem ob der Kanal in Oozyten oder in HEK293-Zellen exprimiert wurde (Gründer et al., 1992; Varela et al., 2002).

Da in dieser Arbeit mit hCIC-2 und rCIC-2 zwei Säuger-Isoformen des CIC-2 Kanals charakterisiert werden sollten, fiel die Wahl auf tsA201-Zellen als heterologes Expressionssystem. tsA201-Zellen stellen als humane Zellen eine äußere Umgebung dar, die den natürlichen Bedingungen von Ionenkanälen aus Säugetieren eher entspricht als zum Beispiel *Xenopus*-Oozyten. Diese könnten als Amphibienzellen möglicherweise endogene Faktoren besitzen, die in Säugerzellen nicht auftreten und somit zu einer ungewollten Modulation der Ströme von Säuger-CIC-2 führen. Durch den Einbau des großen T-Antigens des SV40-Virus in ihr Genom ist in tsA201-Zellen weiterhin eine bessere Expression transient transfizierter DNA zu erwarten als beispielsweise in HEK293-Zellen.

Auch die Verwendung verschiedener Meßkonfigurationen im gleichen Expressionssystem kann qualitativ unterschiedliche Resultate hervorbringen (Pusch et al., 1999; Varela et al., 2002). Die Messungen in dieser Arbeit wurden alle in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt. Diese Konfiguration bietet gegenüber der Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp*-Methode bei Oozyten-Messungen oder dem *cell-attached* Modus der *Patch-Clamp* Methode den Vorteil, die intrazelluläre Zusammensetzung genau bestimmen zu können und so definierte Meßbedingungen zu erhalten. Im Gegensatz zur *inside-out* Konfiguration können außerdem die Kanäle in der gesamten Zellmembran gemessen werden, was zur Entstehung von größeren Strömen führt, wenn der zu messende Kanal nicht übermäßig gut exprimiert, wie es bei CIC-2 der Fall war. Allerdings besteht - genau wie in der *inside-out* Konfiguration - die Gefahr einer Auswaschung eventueller endogener Faktoren, was einen Einfluß auf den gemessenen Strom haben kann (siehe Abschnitt 4.2.2). Da dies jedoch für alle durchgeführten Experimente gleichermaßen gilt, sind die hier erzielten Ergebnisse untereinander durchaus vergleichbar und können als Grundlage für Schlußfolgerungen über die Struktur-Funktions-Beziehungen von CIC-2 dienen.

Der hCIC-2 Kanal wurde zunächst in seiner nativen Form untersucht. Um größere Ströme zu erhalten, wurde dann C-terminal ein eR-Exportsignal an den Kanal gehängt, von dem eine Erhöhung der Anzahl funktioneller Kanäle in der Zellmembran beschrieben worden war (Ma et al., 2001). Die angehängten zusätzlichen sechs Aminosäuren FCYENE führten zu einer stabileren Expression von CIC-2, ohne die Eigenschaften seines Stromes qualitativ zu ändern, weshalb im weiteren Verlauf ausschließlich das hCIC-2 FCYENE Konstrukt verwendet wurde.

Ein weiteres methodisches Problem bestand in einer gelegentlichen Zunahme des absoluten Stromes von hCIC-2 im Verlauf der Messungen. Da CIC-2 eine äußerst langsame Kinetik besitzt und die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Spannungssprüngen daran angepaßt wurden, dauerte eine Messung etwa zehn Minuten. In dieser Zeit kam es in einigen Fällen zu einer Vergrößerung der absoluten Stromamplitude, was sich darin äußerte, daß dieselbe Zelle unter identischen Bedingungen bei einem zweiten Meßdurchgang häufig größere Ströme zeigte als beim ersten Mal. Eine Zunahme des Stromes durch endogene

schwellungsaktivierte Kanäle konnte ausgeschlossen werden, da Volumenveränderungen der Zelle während des Versuchs optisch überprüft wurden und Zellen, die eine Schwellung aufwiesen, nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine Modulation des Stromes von ClC-2 durch Phosphorylierung nachweisen (Fritsch & Edelman, 1996; Tewari et al., 2000; Furukawa et al., 2002). Eine versuchsweise Zugabe von 1 mM ATP in die intrazelluläre Lösung hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Stromzunahme, so daß ein veränderter Phosphorylierungszustand des Kanals als Grund ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Um unter diesen Umständen dennoch möglichst einheitliche Bedingungen zu erlangen, wurde jeweils nur die erste Messung direkt nach Erreichen der *whole-cell* Konfiguration für die Auswertungen verwendet.

4.2 Biophysikalische Charakterisierung von ClC-2

4.2.1 Vergleich von hClC-2 und rClC-2

Der humane ClC-2 Kanal wurde bislang noch nicht ausführlich beschrieben. Die menschliche und die Ratten-Isoform sind auf Aminosäure-Ebene zu 94 % homolog (Cid et al., 1995), und es liegt nahe, daß die beiden Kanäle hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften viele Ähnlichkeiten aufweisen. In dieser Arbeit wurden beide Isoformen deshalb grundlegend elektrophysiologisch charakterisiert. Die erzielten Ergebnisse werden bereits in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von rClC-2 gegenübergestellt. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der unter den hier verwendeten Meßbedingungen gewonnenen Resultate dargelegt, was die identifizierten Charakteristika von hClC-2 ebenfalls als plausibel erscheinen läßt.

Zur Untersuchung des ClC-2 Stromes wurden die mit hClC-2 oder rClC-2 transfizierten Zellen auf verschiedene Potentiale geklemmt, um zunächst das Strom-Spannungsverhalten der Kanäle zu charakterisieren. Dabei wurden die Zeitspannen der Meßprotokolle an die jeweilige Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsgeschwindigkeit des Kanals angepaßt, so daß sichergestellt war, daß die Aktivierung am Ende eines Spannungssprunges einen konstanten Zustand erreicht hatte und daß der Kanal zwischen zwei Meßdurchgängen komplett deaktivieren konnte. Grundlegende Eigenschaften des so induzierten Stromes sind in den zwei untersuchten ClC-2 Isoformen gleich: beide Kanäle sind bei positiven Potentialen weitgehend geschlossen und aktivieren langsam bei Hyperpolarisation. Eine zeit- oder spannungsabhängige Inaktivierung tritt nicht auf (Abb. 3.1 A und B). Diese Charakteristika stimmen mit allen Berichten in der Literatur überein: der ClC-2 Kanal wurde stets als einwärts rektifizierend beschrieben, eine Inaktivierung wurde nie beobachtet (Thiemann et al., 1992; Staley et al., 1996; Park et al., 1998; Schwiebert et al., 1998; Furukawa et al., 1998; Xiong et al., 1999; Cid et al., 2000).

Sowohl der Zeitverlauf der Aktivierung als auch der der Deaktivierung von ClC-2 lassen sich mit zwei Exponenten und einem konstanten Term beschreiben. Die so ermittelten

Aktivierungszeitkonstanten sind für beide Kanäle leicht spannungsabhängig: sie verringern sich mit negativeren Potentialen, d.h. die Aktivierung erfolgt mit zunehmender Hyperpolarisierung schneller. Diese Eigenschaft wurde für rCIC-2 bzw. für gpCIC-2 aus dem Meerschweinchen von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls so beschrieben, und auch die absoluten Werte für die Aktivierungszeitkonstanten stimmen mit bereits veröffentlichten Daten überein (Park et al., 1998; Cid et al., 2000; Varela et al., 2002). Die hier gemessenen Zeitkonstanten der Deaktivierung zeigen hingegen keine Spannungsabhängigkeit (Abb. 3.2 C und D) - im Gegensatz zu anderen veröffentlichten Ergebnissen, denzufolge die Deaktivierung mit zunehmender Depolarisation schneller erfolgt (Park et al., 1998).

Hinsichtlich ihrer Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken besteht zwischen hCIC-2 und rCIC-2 ein quantitativer Unterschied: die Zeitkonstanten der Aktivierung und der Deaktivierung liegen für hCIC-2 jeweils eine Größenordnung über denen von rCIC-2 (Abb. 3.1 E u. F, Abb. 3.2 C u. D), d.h. hCIC-2 aktiviert und deaktiviert deutlich langsamer als rCIC-2. Dieser Unterschied schlägt sich auch in der Spannungsabhängigkeit der Amplituden der verschiedenen Stromkomponenten nieder (Abb. 3.2 E und F). Durch die Annäherung einer Funktion aus zwei Exponenten und einer Konstanten an den Stromverlauf wird der Strom in eine schnell aktivierende bzw. deaktivierende, eine langsam deaktivierende und eine nicht deaktivierende Komponente aufgeteilt. Die relativen Stromamplituden beschreiben dann den Anteil der Kanäle, die sich im schnell deaktivierenden, langsam deaktivierenden bzw. nicht deaktivierenden Zustand befinden (Fahlke et al., 1996). Im Fall des humanen CIC-2 Kanals hat die langsam deaktivierende Komponente den größten Anteil am Gesamtstrom, bei dem Rattenkanal trifft dies dagegen auf die schnell deaktivierende Komponente zu. Die nicht-deaktivierende Komponente ist bei rCIC-2 quasi nicht existent, während sie bei hCIC-2 etwa 20 % des gesamten Stromes ausmacht. Im Gegensatz zu den anteiligen Stromamplituden des menschlichen CIC-2 Kanals sind die der Ratte außerdem leicht spannungsabhängig: die schnell deaktivierende Komponente nimmt mit steigender Depolarisation zu, während die langsam deaktivierende Komponente abnimmt. Diese Unterschiede erklären die schnellere Aktivierung und Deaktivierung von rCIC-2 im Vergleich zu hCIC-2.

Für den CIC-2 Kanal der Ratte wurde des weiteren untersucht, ob die Zeitkonstanten der Deaktivierung von der Dauer der vorangegangenen Aktivierung abhängen. Dazu wurde der hyperpolarisierende Spannungssprung schrittweise verlängert und die Auswirkungen auf die Deaktivierungszeitkonstanten analysiert. Es konnte eine leichte Zunahme der Zeitkonstanten mit zunehmender Länge der vorangegangenen Aktivierung verzeichnet werden (Abb. 3.3 B). Nach einer längeren und somit vollständigeren Aktivierung deaktivieren die Kanäle also langsamer.

Zur weiteren Charakterisierung des Aktivierungsverhaltens von CIC-2 wurden Aktivierungskurven bestimmt. Die Aktivierungskurve ergibt sich aus den Stromamplituden bei einer konstanten Spannung, aber unterschiedlichem Aktivierungszustand des Kanals und stellt die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals dar. Im Fall von

CIC-2 läßt sie sich mit einer einfachen Boltzmann-Funktion beschreiben (Abb. 3.1 G und H). Das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$ -Wert) und die dazugehörige Steigung sind geeignete Parameter zur Beschreibung der Aktivierungskurve. Diese beiden Werte unterscheiden sich für hCIC-2 und rCIC-2 unter den hier verwendeten Bedingungen nicht signifikant voneinander (der $V_{1/2}$ -Wert bei 140 mM $[Cl^-]_i$ liegt für hCIC-2 bei -84,5 mV und für rCIC-2 bei -75,7 mV, die Steigung beträgt 21,9 mV für hCIC-2 und 23,7 mV für rCIC-2). Im Vergleich dazu aktiviert rCIC-2 in *Xenopus*-Oozyten erst ab Spannungen um -80 mV und erreicht selbst bei -180 mV noch nicht seine maximale Aktivierung (Thiemann et al., 1992), weshalb unter diesen Bedingungen kein $V_{1/2}$ -Wert ermittelt werden konnte. In nativen Zellen, in denen rCIC-2 in der *whole-cell* Konfiguration gemessen wurde, schwanken die $V_{1/2}$ -Werte bei 140 mM intrazellulärem Cl^- zwischen -34 mV (Staley et al., 1996) und -85 mV (Arreola et al., 2002). Eine vergleichbar hohe intrazelluläre Chloridkonzentration wurde für eine heterologe Expression von CIC-2 in bereits veröffentlichten Untersuchungen nicht verwendet, weshalb ein Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten nicht sinnvoll ist. Generell herrscht unter den in der Literatur veröffentlichten Daten bezüglich des Aktivierungsverhaltens von CIC-2 eine große Variabilität. Dies deutet darauf hin, daß die Aktivierung von CIC-2 noch durch andere Parameter beeinflusst wird, und steht in Einklang mit einem Befund dieser Arbeit über den Effekt der intrazellulären Chloridkonzentration auf die Lage der Aktivierungskurve von CIC-2 (siehe Abschnitt 4.2.4).

Eine Eigenschaft des CIC-2 Stromes, über die in allen Veröffentlichungen übereinstimmend berichtet wird, ist die lineare Strom-Spannungsbeziehung des offenen Kanals. Dafür werden die Stromamplituden bei verschiedenen Membranpotentialen aufgezeichnet, nachdem der Kanal zuvor maximal aktiviert wurde. Unter diesen Bedingungen besitzen sowohl hCIC-2 als auch rCIC-2 keine gleichrichtenden Eigenschaften (Abb. 3.4 B), was bereits veröffentlichte Ergebnisse bestätigt (Thiemann et al., 1992). Dagegen zeigt z.B. CIC-1, die CIC-Isoform des Skelettmuskels, im voll aktivierten Zustand eine deutliche Einwärtsgleichrichtung (Fahlke et al., 1997c).

Die hier ermittelten Werte zur Charakterisierung grundlegender biophysikalischer Eigenschaften von CIC-2 stimmen also alle mit bereits veröffentlichten Daten überein. Die Isoformen der Ratte und des Menschen unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihrer Aktivierungs- bzw. Deaktivierungskinetik. Weiterführende Untersuchungen zur Bedeutung des N-Terminus für das Schaltverhalten des Kanals, zu den Auswirkungen des Blocks durch Iodid oder zur Verknüpfung des Aktivierungsverhaltens mit der intrazellulären Cl^- -Konzentration, die in dieser Arbeit nur an einer der beiden Isoformen durchgeführt wurden, sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf den jeweils anderen Kanal übertragbar und gelten vermutlich ebenfalls für CIC-2 Kanäle anderer Spezies.

4.2.2 Die Bedeutung des N-Terminus für das Schaltverhalten von CIC-2

Kurz nach der Klonierung von CIC-2 wurde eine Domäne aus 45 Aminosäuren im zytoplasmatischen N-Terminus des Proteins identifiziert, die das Schaltverhalten des Kanals zu vermitteln schien (Gründer et al., 1992). Ihre Deletion oder Substitution mit entsprechenden Bereichen aus CIC-0 oder CIC-1 führte bei der Expression in *Xenopus*-Oozyten zu einem konstitutiv offenen Phänotyp: der mutierte Kanal zeigte kein spannungsabhängiges Schaltverhalten mehr, und auch die für CIC-2 typische Aktivierung durch niedrigen pH und die Osmosensitivität waren nicht mehr vorhanden. Die Deletion oder Mutation einzelner Aminosäuren innerhalb dieser Domäne hatte den gleichen Effekt. Die Insertion der deletierten Region in den C-Terminus des Kanals hingegen stellte die Spannungsabhängigkeit, die pH-abhängige Aktivierung und die Osmosensitivität wieder her. Aufgrund dieser Ergebnisse entwickelten die Autoren ein Modell, demzufolge das Schaltverhalten von CIC-2 ähnlich dem *ball-and-chain* Prinzip funktioniert, das für Na⁺-Kanäle vorgeschlagen worden war (Armstrong & Bezanilla, 1977) und für *Shaker* K⁺-Kanäle nachgewiesen werden konnte (Zagotta et al., 1990). Die vermeintliche Inaktivierungsdomäne entsprach demnach dem Ball, der an einer Polypeptidkette hängt und die Kanalpore verschließt. Eine potentielle Rezeptorregion für den putativen Ball wurde in späteren Studien identifiziert (Jordt & Jentsch, 1997): Mutationen am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne J (Abb. 1.2) führten ebenfalls zu einem Verlust von Spannungsabhängigkeit und Osmosensitivität. Diesem Bereich wurde deshalb eine Rolle als Rezeptor zugeschrieben, an den die N-terminale Inaktivierungsdomäne bindet, wenn der Kanal geschlossen ist. Niedrige Osmolarität oder hyperpolarisierende Spannungen sollten die Affinität des Rezeptors für den Ball reduzieren, so daß eine Dissoziation zur Öffnung des Kanals führen würde. Dieses *ball-and-chain* Modell wurde jedoch durch Messungen derselben N-terminalen Deletionsmutante in Frage gestellt, die in der *inside-out* Konfiguration an Membran-Patches von *Xenopus*-Oozyten durchgeführt wurden und den offenen Phänotyp nicht reproduzieren konnten (Pusch et al., 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit produzierten Ergebnisse mit der beschriebenen Mutante sprechen ebenfalls gegen dieses Modell. Die $\Delta 16-61$ Deletionsmutante wurde unter den gleichen Bedingungen untersucht wie der rCIC-2 WT und ihr Schaltverhalten mit dem des Wildtyps verglichen. *Whole-cell* Ableitungen von heterolog in tsA201-Zellen exprimierten rCIC-2 $\Delta 16-61$ Kanälen zeigten keinen konstitutiv offenen Phänotyp, sondern enthüllten stattdessen ein Schaltverhalten, das dem des Wildtyps sehr ähnelt (Abb. 3.6): der mutierte Kanal ist genau wie rCIC-2 WT bei positiven Potentialen geschlossen und aktiviert bei Hyperpolarisation. Ein Unterschied zum Wildtyp besteht lediglich in der Aktivierungsgeschwindigkeit: die Mutante aktiviert deutlich schneller, was aus einem Vergleich der Aktivierungszeitkonstanten ersichtlich wird (Abb. 3.6 D). Die Zeitkonstanten der Aktivierung zeigen - im Gegensatz zu dem beschriebenen Verlust der Spannungsabhängigkeit - sogar eine stärkere Abhängigkeit vom Membranpotential als die des

Wildtyps. Eine schnellere Kinetik ist auch bei der Deaktivierung zu beobachten. Die Deaktivierungszeitkonstanten der Mutante sind zwar nicht signifikant schneller als die des Wildtyps, jedoch sind die Anteile der verschiedenen Stromkomponenten am Gesamtstrom anders aufgeteilt (Abb. 3.6 G und H): die schnell deaktivierende Komponente macht einen deutlich größeren Teil des Gesamtstroms aus als beim rCIC-2 WT, was die insgesamt schnellere Deaktivierung von rCIC-2 $\Delta 16-61$ erklärt. Die Aktivierungskurve der Deletionsmutante unterscheidet sich insofern von der des Wildtyps, als daß sie im Vergleich zu der von rCIC-2 WT um etwa 35 mV in Richtung positiverer Potentiale verschoben ist. Sie kann außerdem nur mit einer doppelten Boltzmann-Funktion angenähert werden. Die Boltzmann-Funktion beschreibt in Abhängigkeit vom Membranpotential die relative Wahrscheinlichkeit dafür, daß sich ein Kanal entweder im offenen oder im geschlossenen Zustand befindet, und liefert somit die Spannungsabhängigkeit des Schaltverhaltens (Hille, 1992). Die Tatsache, daß die Aktivierungskurve der Deletionsmutante nicht wie die des Wildtyps mit einer einfachen, sondern nur mit einer doppelten Boltzmann-Funktion beschrieben werden kann, spricht dafür, daß durch die Deletion der N-terminalen Domäne etwas im Ablauf des Schaltprozesses von CIC-2 geändert ist. Möglicherweise hat sich bei der Abfolge der Konformationszustände beim Übergang des Kanals von „geschlossen“ nach „offen“ etwas verändert. Dennoch zeigen der Wildtyp und die Deletionsmutante ein sehr ähnliches Schaltverhalten. Der mutierte Kanal aktiviert lediglich schneller und etwas früher als die Wildtyp-Isoform. Das Schaltverhalten in der Deletionsmutante ist zwar verändert, bleibt jedoch grundsätzlich erhalten. Diese Tatsache spricht eindeutig gegen die *ball-and-chain* Hypothese.

Die hier ermittelten Daten werden durch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse bestätigt, in denen dieselbe Deletionsmutante ebenfalls in einem Säuger-Expressionssystem untersucht wurde (Varela et al., 2002). Die unterschiedlichen Ergebnisse, die bei Messungen an ganzen Oozyten und an *inside-out* Patches erzielt wurden, wurden ursprünglich einer putativen intrazellulären Komponente zugeschrieben, die einen Einfluß auf das Schaltverhalten von CIC-2 haben könnte und in der *inside-out* Konfiguration verloren geht (Pusch et al., 1999). Um die Rolle dieses intrazellulären Faktors zu untersuchen, führte die Arbeitsgruppe um Varela Messungen in der *whole-cell* Konfiguration durch und verwendete außerdem Nystatin-perforierte Patches. Durch diese Methode wird in der *cell-attached* Konfiguration der Membranfleck unter der Pipettenöffnung so perforiert, daß nur monovalente Ionen durch die Zellmembran gelangen können (Horn & Marty, 1988). Im Gegensatz zu der konventionellen *whole-cell* Konfiguration wird ein Auswaschen etwaiger größerer intrazellulärer Moleküle dadurch verhindert. Ein Vergleich des rCIC-2 Wildtyps mit der $\Delta 16-61$ Deletionsmutante in der *whole-cell* Konfiguration lieferte die gleichen Ergebnisse, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt wurden: die mutierten Kanäle zeigten ein sehr ähnliches Schaltverhalten wie der Wildtyp, lediglich die Aktivierung erfolgte in der Mutante schneller als beim rCIC-2 WT. Messungen mit Nystatin in der Patchpipette produzierten für die

Deletionsmutante jedoch tatsächlich den offenen Phänotyp, der zuvor schon in Oozyten beobachtet werden konnte. Die Ströme der Wildtyp-Isoform blieben in dieser Konfiguration hingegen unverändert. Typische Eigenschaften des CIC-2 Kanals wie der Block durch Cd^{2+} , relative Permeabilitäten anderer Anionen sowie seine Aktivierung durch niedrige pH-Werte blieben in der Deletionsmutante allerdings erhalten, unabhängig davon, welche Meßmethode verwendet wurde. Eine natürlich vorkommende Spleißvariante der CIC-2 Isoform des Meerschweinchens mit einer vergleichbaren Deletion im N-Terminus, gpCIC-2 $\Delta 77-86$, die ebenfalls eine schnellere Deaktivierungskinetik aufweist (Cid et al., 2000), zeigte hingegen in keiner der Meßkonfigurationen einen offenen Phänotyp.

Die Tatsache, daß der putative intrazelluläre Faktor nur die deletierte Isoform der Ratte im offenen Konformationszustand festhält und so das Schaltverhalten blockiert, jedoch weder beim CIC-2 Wildtyp noch bei der natürlich vorkommenden Deletionsmutante des Meerschweinchens Auswirkungen hat, läßt den beobachteten Effekt eher artifiziell als physiologisch erscheinen (Varela et al., 2002). Der Nachweis einer Interaktion von rCIC-2 mit Komponenten des Zytoskeletts könnte eine andere mögliche Begründung darstellen (Ahmed et al., 2000). Die Zerstörung von Aktin-Filamenten in der Zelle durch Cytochalasin und Latrunkulin führte zu einer Zunahme der CIC-2 Ströme, die dem offenen Phänotyp recht ähnlich sieht. Des weiteren konnte die vermeintliche Inaktivierungsdomäne im N-Terminus von rCIC-2 als der Bereich des Kanals identifiziert werden, der mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert.

Diese Ergebnisse und die Tatsache, daß die Deletionsmutanten sowohl in der Ratten- als auch in der Meerschweinchen-Isoform eine schnellere Kinetik aufweisen, implizieren eine wichtige Bedeutung für die N-terminale Domäne beim Schaltverhalten von CIC-2. Eine Funktion als Ball, der, analog zu dem *ball-and-chain* Modell für *Shaker* Kanäle, die Pore blockiert, scheidet aus. In Analogie zu CIC-0 und CIC-1 wurde spekuliert, daß auch CIC-2 zwei *gates* besitzt, die beide durch Hyperpolarisation aktiviert werden. Das langsamere der beiden *gates* würde durch den N-Terminus vermittelt und wäre somit in der N-terminalen Deletionsmutante verschwunden, was die schnellere Aktivierungskinetik von rCIC-2 $\Delta 16-61$ erklären würde (Pusch et al., 1999). Das putative langsame *gate* von CIC-2 wird dieser Theorie zufolge außerdem durch hypotones Medium aktiviert und wird im Gegensatz zu dem *slow gate* von CIC-0 durch niedrige extrazelluläre Chloridkonzentrationen nicht inhibiert. Damit würde es einen Schaltmechanismus darstellen, der in CIC-0 und CIC-1 nicht vorhanden ist, was die Einzigartigkeit der Osmosensitivität von CIC-2 erklären würde. Die Existenz dieses *gates* in CIC-2 ist jedoch durch die bis jetzt durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig belegt.

4.2.3 Eigenschaften des Iodid-Blocks von CIC-2

Die meisten bisher elektrophysiologisch untersuchten CIC-Kanäle werden unter anderem durch ihre $\text{Cl}^- > \text{I}^-$ Selektivität charakterisiert (Fahlke, 2001). Diese Eigenschaft konnte in der

vorliegenden Arbeit auch für CIC-2 nachgewiesen werden: das in Anwesenheit von extrazellulärem I^- zu positiveren Potentialen hin verschobene Umkehrpotential weist auf eine geringere Permeabilität von I^- im Vergleich zu Cl^- hin (Abb. 3.7). Bereits beschriebene Auswirkungen von Iodid auf den durch CIC-2 vermittelten Strom (Thiemann et al., 1992; Clark et al., 1998, Varela et al., 2002) werden durch die hier erzielten Ergebnisse bestätigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Iodidblock jedoch detaillierter untersucht werden, um daraus möglicherweise Schlußfolgerungen auf das Schaltverhalten des Kanals ziehen zu können. Für diese Experimente wurde die rCIC-2 Deletionsmutante $\Delta 16-61$ verwendet, da sie eine stabilere Expression als der Wildtyp-Kanal aufwies und die Ähnlichkeit ihrer Schalteigenschaften mit denen des Wildtyps zuvor bestätigt worden war (siehe Abschnitt 4.2.2). Die hier für die Mutante ermittelten Ergebnisse sind aufgrund dieser Vergleichbarkeit auch auf den CIC-2 Wildtyp übertragbar.

Zur genaueren Charakterisierung des Iodidblocks wurde nach entsprechenden Kontrollmessungen in iodidfreier Lösung 20 mM I^- appliziert. Dies hatte verschiedene Auswirkungen auf den Strom von CIC-2: 20 mM externes Iodid reduzierte die maximale Stromamplitude bei -165 mV auf ca. 30 % (Abb. 3.6 A und B). Durch Iodid in der extrazellulären Lösung wurde außerdem die Aktivierungskurve um etwa 10 mV in negativer Richtung verschoben (Abb. 3.6 B), analog zu einem an CIC-1 beobachteten Effekt (Rychkov et al., 1998). Ähnlich wie bei CIC-1 (Fahlke et al., 1997c) konnte in der vorliegenden Arbeit auch für CIC-2 eine Abhängigkeit des Iodidblocks vom Konformationszustand des Kanals nachgewiesen werden. Diese zeigt sich durch eine Darstellung des durch Iodid geblockten Stromanteils der Aktivierungskurve (Abb. 3.6 C): bei geschlossenem Kanal ist der Block nicht vorhanden. Mit zunehmender Kanalöffnung erreicht er allmählich seine maximale Ausprägung, kann den Strom jedoch nie vollständig blockieren, was mit bereits veröffentlichten Berichten übereinstimmt (Thiemann et al., 1992). Der Block durch Iodidionen ist außerdem spannungsabhängig, wie durch Versuche belegt werden konnte, in denen das Ausmaß des Blockes bei maximalem Aktivierungszustand des Kanals, aber unterschiedlichen Membranpotentialen gemessen wurde (Abb. 3.7): bei positiven Potentialen betrug der Block bis zu 85 %, während bei negativen Spannungen nur maximal 50 % des CIC-2 Stromes geblockt werden konnten. Bei einer geringeren vorausgegangenen Aktivierung von CIC-2 ist der Block weniger ausgeprägt, was erneut für seine Abhängigkeit vom Offenzustand des Kanals spricht.

Für CIC-2 konnte also - in Analogie zu CIC-1 - eine Abhängigkeit des Iodidblocks vom Membranpotential sowie vom Konformationszustand des Kanals nachgewiesen werden. Nur wenn der Kanal geöffnet ist, können I^- -Ionen in der Pore binden und so einen Teil des Stromes blockieren. Die Verschiebung der Aktivierungskurve durch Iodid deutet außerdem darauf hin, daß durch den Block auch das Schaltverhalten des Kanals geändert wird, was eventuell mit einer veränderten Affinität der Bindungsstellen zusammenhängen könnte.

Diese mit extrazellulärem Iodid erzielten Ergebnisse sprechen erneut gegen das hypothetisierte *ball-and-chain* Modell zur Inaktivierung von ClC-2 (siehe Abschnitt 4.2.2). Befände sich der Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmechanismus des Kanals tatsächlich auf der zytoplasmatischen Seite der Pore, sollte extrazelluläres Iodid in immer der gleichen Art und Weise binden, egal ob der Kanal geöffnet oder geschlossen ist. Daß dies nicht der Fall ist, konnte durch die oben beschriebenen Versuche belegt werden. Die hier ermittelten Eigenschaften des Iodidblocks bilden damit ein weiteres Argument gegen die vorgeschlagene Rolle des N-Terminus von ClC-2 als Inaktivierungsdomäne des Kanals.

4.2.4 Verknüpfung der Aktivierung von ClC-2 mit dem transmembranen Chlorid-Gradienten

Das Schaltverhalten ist in vielen ClC-Isoformen eng mit der Konzentration von Cl⁻-Ionen verknüpft. Eine Verringerung der externen Chloridkonzentration führt z.B. in ClC-0 und ClC-1 zu einer parallelen Verschiebung der Aktivierungskurve in positiver Richtung und hat somit eine deaktivierende Wirkung (Pusch et al., 1995; Rychkov et al., 1996). Die intrazelluläre Chloridkonzentration hat in ClC-0 Auswirkungen auf die Öffnungs- und Schließungsrate sowie auf die minimale Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Chen & Miller, 1996), während sie in ClC-1 nahezu keine Konsequenzen für das Aktivierungsverhalten des Kanals hat (Fahlke et al., 1995; Warnstedt et al., 2002). Für hyperpolarisations-aktivierte ClC-Kanäle verhält es sich anders: auf ClC-2 hat die Reduzierung der extrazellulären Cl⁻-Konzentration eine aktivierende Wirkung, während die Verringerung von [Cl⁻]_i in zwei hyperpolarisations-aktivierten Mutanten von ClC-0 und ClC-1 in einer Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativeren Potentialen resultiert, was eine Öffnung des Kanals erst bei stärkerer Hyperpolarisation zur Folge hat und somit einem deaktivierenden Effekt gleichkommt (Fahlke et al., 1995; Pusch et al., 1999).

Für ClC-2 wurde die Rolle von intrazellulärem Chlorid bis jetzt nur für die Deletionsmutante rClC-2 Δ16-61 untersucht (Pusch et al., 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirkung einer reduzierten intrazellulären Chloridkonzentration auf das Aktivierungsverhalten des Wildtyps von hClC-2 analysiert.

Die Verringerung von [Cl⁻]_i hatte eine Reduzierung der absoluten maximalen Stromamplitude zur Folge und resultierte außerdem in einer parallelen Verschiebung der Aktivierungskurve hin zu negativeren Potentialen (Abb. 3.8). Das Potential der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ steht dabei in einem logarithmischen Verhältnis zu [Cl⁻]_i (Abb. 3.8 F).

Für Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß bei einer derartigen Beziehung zwischen $V_{1/2}$ und der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration die Spannungsabhängigkeit des Schaltverhaltens ausschließlich durch die spannungsabhängige Bindung von Ca²⁺-Ionen und nicht durch einen intrinsischen Spannungssensor vermittelt wird (Cui et al., 1997). ClC-Kanäle besitzen keinen solchen geladenen Bereich des Proteins, der als

Spannungssensor fungieren könnte. Obwohl die Bindung von Cl⁻-Ionen in ClC-0 - und vermutlich auch in allen anderen ClC-Isoformen - selbst nicht spannungsabhängig ist, sondern die Spannungsabhängigkeit des Schaltvorgangs durch die Bewegung der gebundenen Cl⁻-Ionen durch das elektrische Feld zustande kommt (Chen & Miller, 1996), steht die hier für ClC-2 ermittelte logarithmische Beziehung zwischen $V_{1/2}$ und $[Cl^-]_i$ in Übereinstimmung mit der für Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle gezogenen Schlußfolgerung, daß kein intrinsischer Spannungssensor an dem spannungsabhängigen Schaltvorgang beteiligt ist.

In Analogie zur Rolle von Cl⁻ als Ladungsträger beim *gating*-Prozeß von ClC-0, wo die Bindung von extrazellulärem Chlorid und die darauffolgende Einwärtsbewegung des Anions mit dem Öffnen des Kanals verknüpft ist (Chen & Miller, 1996), könnte bei der Öffnung von ClC-2 ein ähnlicher Mechanismus für die Spannungsabhängigkeit des Schaltverhaltens verantwortlich sein. Hier würden die Cl⁻-Ionen allerdings von der intrazellulären Seite aus in die Pore gelangen.

Auch die Änderung der extrazellulären Cl⁻-Konzentration hat einen Effekt auf das Schaltverhalten von ClC-2 (Pusch et al., 1999): die aktivierende Wirkung einer reduzierten extrazellulären Chloridkonzentration wurde damit erklärt, daß die Bindung von Cl⁻-Ionen an eine Bindungsstelle im externen Bereich der Pore das Schließen des Kanals fördert (und so einen genau entgegengesetzten Effekt wie bei ClC-0 und ClC-1 besitzt). Qualitativ äußert sich dies durch eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativeren Potentialen. Damit hätte eine Erhöhung der extrazellulären Chloridkonzentration den gleichen Effekt wie eine Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration.

Anders als bei den Wildtyp-Isoformen von ClC-0 und ClC-1 aber ähnlich wie bei der hyperpolarisations-aktivierten Mutante ClC-1 D136G (Fahlke et al., 1995) erscheinen also nicht die absoluten Konzentrationen, sondern der transmembrane Chlorid-Gradient als maßgeblicher Faktor für das Aktivierungsverhalten von ClC-2. Diese Verbindung bildet die funktionelle Grundlage für eine mögliche Rolle von ClC-2 bei der neuronalen Chlorid-Homöostase in Neuronen des zentralen Nervensystems.

4.3 Mögliche physiologische Funktion von ClC-2 bei der neuronalen Cl⁻-Homöostase

Die relative Offenwahrscheinlichkeit des ClC-2 Kanals ist eng mit dem transmembranen Chlorid-Gradienten verknüpft. Setzt man die Lage der Aktivierungskurve auf der Spannungsachse in Beziehung zu dem jeweiligen Chlorid-Umkehrpotential (Abb. 3.8 E), so wird deutlich, daß ClC-2 nur bei Spannungen negativ des Umkehrpotentials in einem signifikanten Ausmaß aktiviert. Da das Cl⁻-Umkehrpotential in vielen Zellen unterhalb des Ruhemembranpotentials liegt, z.B. in Neuronen des Hippocampus (Misgeld et al., 1986; Thompson & Gähwiler, 1989), ist ClC-2 unter Ruhebedingungen und bei Aktionspotentialen oder exzitatorischen postsynaptischen Potentialen demnach geschlossen. Eine Aktivierung

von CIC-2 erfolgt durch eine Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration und die damit verbundene Verschiebung des Cl^- -Umkehrpotentials zu Spannungen, die sich oberhalb des Membranpotentials befinden. Als einwärts gleichrichtender Kanal vermittelt CIC-2 definitionsgemäß ausschließlich einen Ausstrom von Cl^- -Ionen aus der Zelle. Da CIC-2 keine zeit- oder spannungsabhängige Inaktivierung zeigt, strömt so lange Chlorid aus der Zelle aus, bis der intrazelluläre Chlorid-Gehalt wieder erniedrigt ist und sich das Cl^- -Umkehrpotential an das Ruhemembranpotential annähert. Für native CIC-2 Kanäle in Neuronen des Hippocampus wurde eine genau solche Aktivierung nachgewiesen (Staley, 1994). CIC-2 stellt so einen regulierbaren Weg dar, Cl^- aus der Zelle zu schaffen.

Die charakteristischen Eigenschaften von CIC-2 sowie die Verkopplung seiner Funktion mit dem transmembranen Chlorid-Gradienten legen den Schluß nahe, daß der CIC-2 Kanal eine physiologische Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären Chloridkonzentration besitzt. Der intrazelluläre Chloridgehalt ist von großer Bedeutung für die Wirkung von GABA in vielen Neuronen. Im adulten ZNS ist GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter. Die Aktivierung von anionenpermeablen GABA_A -Rezeptoren durch eine Ausschüttung von GABA führt zu einem Cl^- -Einstrom, wodurch das Neuron hyperpolarisiert und seine Erregbarkeit reduziert wird (Misgeld et al., 1986). Eine hochfrequente Stimulation von GABA_A -Rezeptoren kann allerdings ebenso eine depolarisierende und somit erregende Antwort zur Folge haben, was in verschiedenen Untersuchungen auf eine intrazelluläre Akkumulation von Cl^- zurückgeführt wurde (Staley et al., 1995; Kaila et al., 1997). Eine Aktivierung von GABA_A -Rezeptoren führt dann zu einem Cl^- -Ausstrom und einer Depolarisation der Zelle. Auch in der embryonalen und der frühen postnatalen Phase ist der intrazelluläre Cl^- -Gehalt in vielen Neuronen erhöht, weshalb GABA in dieser Zeit eine exzitatorische Wirkung besitzt (Miles, 1999). Im Laufe der Entwicklung verkehren sich die elektrophysiologischen Eigenschaften der GABA_A -Transmission im Hippocampus und im Neocortex von exzitatorisch in inhibitorisch, was auf eine ontogenetische Abnahme der intrazellulären Cl^- -Konzentration zurückzuführen ist (Cherubini et al., 1991; Owens et al., 1996). Diese Umschaltung wird durch viele Faktoren beeinflusst, die mit der neuronalen Aktivität zusammenhängen und sich gegenseitig bedingen (Ganguly et al., 2001). Eine Beteiligung von CIC-2 an diesem Prozeß erscheint plausibel, da der Kanal im neonatalen Gehirn zunächst in einer nicht-funktionellen Form vorliegt (Mladinic et al., 1999) und seine Expression in pyramidalen Neuronen des Hippocampus zeitgleich mit der Umschaltung der GABA-Antwort hochreguliert wird (Clayton et al., 1998). Im adulten Gehirn ist die Expression von CIC-2 auf Zellen beschränkt, die unter physiologischen Bedingungen eine inhibitorische GABA-Antwort zeigen (Smith et al., 1995), und seine *de novo*-Expression in Neuronen des dorsalen Rückenmarksganglions führt zu einer Umkehrung der dort normalerweise depolarisierenden GABA-Antwort in eine hyperpolarisierende (Staley et al., 1996). Dies alles legt den Schluß nahe, daß CIC-2 an der Sicherstellung einer inhibitorischen GABA-Antwort beteiligt ist.

Ein passiver Transportmechanismus wie der Chloridstrom durch einen Kanal ist allein jedoch nicht in der Lage, einen hohen transmembranen Chlorid-Gradienten aufrechtzuerhalten, wie er für eine GABAerge Inhibition erforderlich ist. Ein aktiver Prozeß ist notwendig, um ein Chlorid-Gleichgewichtspotential zu generieren, das unter dem Ruhemembranpotential liegt. Der neuronenspezifische K^+ - Cl^- -Kotransporter KCC2 (Payne et al., 1996; Song et al., 2002), der unter physiologischen Bedingungen einen auswärts gerichteten, gekoppelten Transport von K^+ und Cl^- vermittelt, ist maßgeblich an der Erzeugung dieses niedrigen Cl^- -Umkehrpotentials beteiligt (Hübner et al., 2001). Der K^+/Cl^- -Kotransport von KCC2 wird durch den transmembranen K^+ -Gradienten gesteuert: normalerweise ist die intrazelluläre K^+ -Konzentration höher als die extrazelluläre, so daß Kalium aus der Zelle ausgeschleust wird. Zusammen mit einem K^+ -Ion wird dabei jeweils ein Cl^- -Ion aus der Zelle transportiert, wodurch ein Transport von Cl^- gegen seinen elektrochemischen Gradienten stattfindet (Abb. 4.1 A). Dies führt zur Erzeugung einer niedrigen intrazellulären Chloridkonzentration, die essentiell ist für eine GABAerge synaptische Inhibition (Misgeld et al., 1986; Thompson & Gähwiler, 1989; Payne, 1997; Hübner et al., 2001; Ueno et al., 2002). Höchstwahrscheinlich hat KCC2 ebenfalls eine Bedeutung bei der $[Cl^-]_i$ -abhängigen Umschaltung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Antwort von exzitatorisch nach inhibitorisch im Entwicklungsprozeß unreifer Neuronen, da der Kotransporter zeitgleich mit dieser Veränderung vermehrt exprimiert wird (Rivera et al., 1999; Gulyas et al., 2001). Insgesamt scheint also KCC2 mit seinem auswärts gerichteten Cl^- -Transport eine wichtige Rolle bei der Etablierung einer niedrigen intrazellulären Cl^- -Konzentration zu spielen.

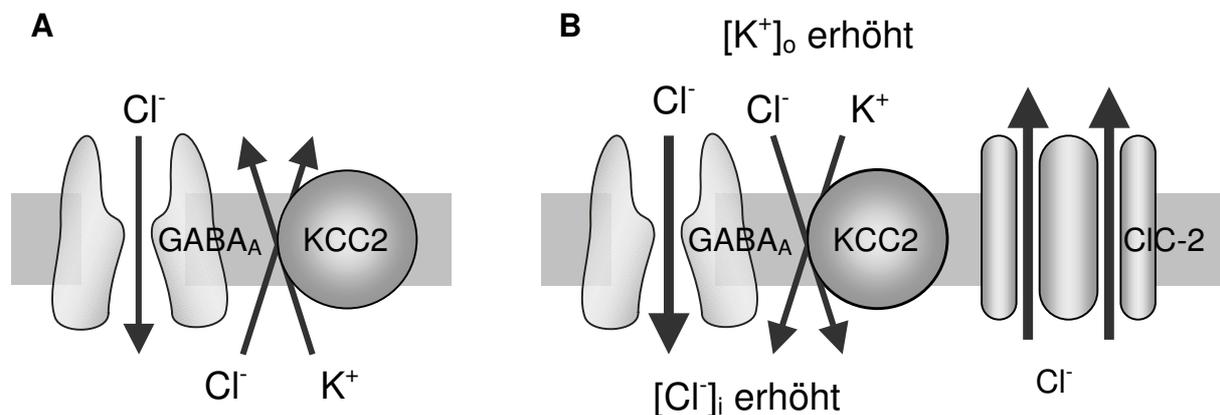


Abbildung 4.1: Hypothetische Rolle von CIC-2 bei der neuronalen Cl^- -Homöostase. **A:** Der K^+ - Cl^- -Kotransporter KCC2 vermittelt einen auswärts gerichteten Kotransport von K^+ und Cl^- und trägt so zur Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären Cl^- -Konzentration bei. Dadurch wird ein Einstrom von Cl^- durch GABA_A-Rezeptoren ermöglicht und eine inhibitorische GABA-Antwort sichergestellt. **B:** Nach einer intensiven Aktivität von GABAergen Interneuronen ist sowohl die intrazelluläre Cl^- -Konzentration als auch die extrazelluläre K^+ -Konzentration erhöht. Da der KCC2 Transporter hauptsächlich durch den transmembranen K^+ -Gradienten gesteuert wird, kann dies zu einem einwärts gerichteten K^+ - Cl^- -Kotransport und somit zu einer noch stärkeren intrazellulären Akkumulation von Cl^- führen. Unter diesen Bedingungen könnte CIC-2 die wichtigste Möglichkeit darstellen, Cl^- wieder aus der Zelle zu schaffen, um ein negatives Cl^- -Umkehrpotential und damit eine inhibitorische GABA-Antwort zu garantieren.

Da die Richtung des Transports von KCC2 jedoch hauptsächlich von dem transmembranen K^+ -Gradienten abhängt, kann es in bestimmten Situationen auch zu einem einwärts gerichteten K^+ - Cl^- -Kotransport kommen. Zum Beispiel nach hochfrequenter GABA_A-Rezeptorstimulation ist die extrazelluläre K^+ -Konzentration in der Umgebung pyramidalen Neuronen im Hippocampus erhöht (Kaila et al., 1997). Dies kann in einem verminderten Transport von Cl^- aus der Zelle oder sogar in einem einwärts gerichteten Kotransport von K^+ und Cl^- durch KCC2 resultieren (Payne, 1997; Ueno et al., 2002). Zusammen mit dem durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Cl^- -Einstrom führt dies zu einer intrazellulären Akkumulation von Cl^- und im folgenden zu einer gesteigerten Erregbarkeit von hippocampalen Neuronen (Staley et al., 1995; Kaila et al., 1997; DeFazio et al., 2000). Unter diesen Bedingungen erscheint der ClC-2 Kanal als die Hauptmöglichkeit, Chlorid aus der Zelle zu schaffen und ein negatives Cl^- -Umkehrpotential wiederherzustellen (Abb. 4.1 B). Dies wurde in Versuchen mit hippocampalen pyramidalen Neuronen nachgewiesen: wenn diese Zellen mit Chlorid beladen und gleichzeitig der K^+ - Cl^- -Kotransport durch Furosemid blockiert wurde, konnte die Aktivierung eines Chloridkanals mit den physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von ClC-2 den intrazellulären Cl^- -Gehalt wieder an normale Konzentrationen annähern (Staley, 1994). Mit der Wiederherstellung einer niedrigen intrazellulären Chloridkonzentration unter Bedingungen, bei denen der Auswärtstransport des K^+ - Cl^- -Kotransporters KCC2 blockiert ist, kommt ClC-2 also eine große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung einer inhibitorischen GABA-Antwort zu.

4.4 Pathophysiologische Konsequenzen der IGE-verursachenden Mutationen von ClC-2

Kürzlich wurde das menschliche Genom auf neue Prädispositions-Loci für idiopathische generalisierte Epilepsie (IGE) hin durchsucht (Sander et al., 2000). Dabei wurde ein neuer möglicher IGE-Locus in der chromosomalen Region 3q26 identifiziert, wo das Gen *CLCN2* für den ClC-2 Kanal lokalisiert ist (Protopopov et al., 1996). In 46 IGE-Familien wurde daraufhin nach Mutationen in *CLCN2* gesucht und in drei nicht miteinander verwandten Familien mit klinisch unterschiedlichen Epilepsieformen drei verschiedene Mutationen gefunden, die nach einem autosomal-dominanten Modus zusammen mit den klinischen Symptomen weitervererbt wurden (Haug et al., 2003).

Um eine mögliche pathophysiologische Erklärung für das Auftreten von epileptischen Anfällen im Zusammenhang mit diesen Mutationen zu finden, wurden die Mutationen in die DNA des hClC-2 Kanals eingeführt und die funktionellen Eigenschaften der mutierten Kanäle in dem hier verwendeten heterologen Expressionssystem mit elektrophysiologischen und fluorometrischen Methoden untersucht.

4.4.1 M200fsX231 und del74-117 führen zu einem Funktionsverlust

Die CIC-2 Mutation M200fsX231 wurde in einer IGE-Familie gefunden, in der die meisten Betroffenen an häufigen myoklonischen und generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (JME) litten. Lediglich eine Person war an EGMA erkrankt. In der Familie mit der del74-117 Mutation waren seltene generalisierte tonisch-klonische Anfälle beim Aufwachen (EGMA) das vorherrschende Syndrom, und nur ein Individuum war von Absence-Anfällen (CAE) betroffen (Haug et al., 2003).

Beide Mutationen haben mutmaßlich die Deletion großer Teile des Kanalproteins zur Folge (Abb. 3.9 A und B). Im Fall von M200fsX231 resultiert die Insertion eines einzelnen Nukleotids in einer Verschiebung des Leserasters und der nachfolgenden Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons. Das entsprechende Protein ist dadurch nach der 230. Aminosäure abgeschnitten und besitzt somit nur noch sechs der 18 α -Helices des Wildtyps (vergl. Abb. 1.2). Die letzten zwei Drittel der Peptidkette sind also nicht mehr vorhanden.

Bei der del74-117 Mutation handelt es sich um eine alternative Spleißvariante: in der Nähe der 3'-Spleißstelle des Introns 2 fehlt eine 11 bp lange Sequenz, was - ohne eine Leseraster-Verschiebung - zum Verlust von Exon 3 führt. In dem mutierten Kanal sind dadurch 44 Aminosäuren der α -Helix B deletiert.

Die Expression beider Mutationen in tsA201-Zellen führte zu keiner meßbaren Stromantwort. Die mutierten Kanäle sind als Homodimere also offensichtlich nicht funktionell. Aufgrund der Deletion großer, an der Porenbildung beteiligter Regionen des Kanals erscheint dies im Fall der M200fsX231 Mutation nicht überraschend. Für alternative Spleißvarianten, die wie die del74-117 Mutation die Deletion eines kompletten Exons zur Folge haben, gibt es in der Literatur zahlreiche Beispiele (Chu et al., 1996; Chu & Zeitlin, 1997; Mladinic et al., 1999; Loewen et al., 2000). Eine fehlende Funktionalität wurde jedoch nur in einem Fall berichtet, in welchem das Exon 2 deletiert war (Mladinic et al., 1999).

Da die Patienten mit den hier untersuchten Mutationen alle heterozygot waren (Haug et al., 2003) und CIC-Kanäle Dimere sind, besteht der größte Anteil von CIC-2 Kanälen in heterozygoten Patienten mutmaßlich aus einer Wildtyp- und einer mutierten Untereinheit - vorausgesetzt, daß die mutierten mit den Wildtyp-Untereinheiten interagieren können. Aus diesem Grund wurden verschiedene Heterodimere konstruiert, in denen eine Wildtyp-Untereinheit über einen Linker aus 20 Aminosäuren mit jeweils einer mutierten Untereinheit verbunden war. Die Transfektion dieser Heterodimere ergab ebenfalls keinen meßbaren Strom, unabhängig davon, in welcher Reihenfolge die Untereinheiten hintereinandergehängt waren. Kotransfektionen von Wildtyp- und mutierter DNA in einem Verhältnis von 1:1 hatten in beiden Fällen eine signifikante Verringerung der absoluten Stromamplitude um 85 % im Fall von M200fsX231 bzw. um 70 % im Fall von del74-117 zur Folge (Abb. 3.9 A und B).

Die mutierten Proteine sind also offensichtlich weder als Homodimere noch als Heterodimere mit einer Wildtyp-Untereinheit funktionell. Die Mutationen besitzen folglich einen dominant-

negativen Effekt. In Patienten führt dies voraussichtlich zu einer Reduktion der Anzahl funktioneller CIC-2 Kanäle.

Daß dies nicht auf einen fehlgeleiteten Transport der Kanalproteine zur Zellmembran zurückzuführen ist, wurde durch Fluoreszenz-Aufnahmen von mutierten Kanälen mit einem angehängten YFP nachgewiesen: die Membranständigkeit der mutierten Proteine war hier sowohl für die Homo- als auch für die Heterodimere deutlich zu erkennen (Abb. 3.10). Die Ursache für den fehlenden Strom könnte also entweder in der nicht vorhandenen Funktionalität der Heterodimere liegen oder in einer mangelnden Interaktionsfähigkeit der Mutanten. Durch FRET-Messungen wurde deshalb versucht herauszufinden, ob die mutierten Untereinheiten *in vivo* mit den Wildtyp-Untereinheiten interagieren können.

Mit dieser Methode ließ sich jedoch eine spezifische Interaktion nicht nachweisen. Beide Ansätze, sowohl der Versuch, FRET direkt zu messen, als auch ein indirekter Nachweis, führten zu keinem eindeutigen Ergebnis: der gemessene FRET-Effekt zwischen verschiedenen CIC-2 Untereinheiten, zwischen denen eine Interaktion notwendig für einen intakten Kanal und im Fall von zwei Wildtyp-Untereinheiten deshalb gesichert ist, war zwar deutlich verschieden von der Negativkontrolle, in der nur der Donor des FRET-Paares transfiziert worden war, aber dennoch genauso groß wie zwischen CIC-2 und dem Glutamattransporter EAAT2. Hier erscheint eine Interaktion jedoch eher unwahrscheinlich. Da die FRET-Effizienz ausschließlich von der Distanz zwischen den beiden Fluorophoren abhängt (siehe Gleichung (8)), kann solch ein unspezifischer FRET-Effekt wie der in dieser Arbeit gemessene auch durch eine Überexpression der Fluoreszenz-Proteine zustande kommen. Obwohl in keinem Versuch eine Abhängigkeit der FRET-Effizienz E_f von der generellen Dichte beider Fluorophoren zu sehen war, ist es möglich, daß die Proteine dennoch in solch hoher Dichte in der Membran vorlagen, daß allein ihre räumliche Nähe schon für einen FRET-Effekt ausreichte, ohne daß tatsächlich eine spezifische Interaktion stattfand. Eine weitere Reduktion der transfizierten DNA-Menge in diesen Versuchen führte lediglich zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz. Insofern stellte die offensichtlich zu gute Expression für diese Methode ein im Rahmen dieser Arbeit nicht lösbares Problem dar, was FRET zum Nachweis von spezifischen Interaktionen im Fall von CIC-2 als ungeeignet erscheinen läßt.

Wenn man davon ausgeht, daß die mutierten Proteine ähnlich gut exprimiert wurden wie der Wildtyp (was in den fluorometrischen Messungen den Anschein hatte) und daß bei einer Kotransfektion im Verhältnis 1:1 genauso viele mutierte wie Wildtyp-Untereinheiten in einer Zelle vorhanden waren, sollte der Anteil der Wildtyp-Homodimere in einer kotransfizierten Zelle 25 % betragen, wenn die Mutanten interaktionsfähig sind, bzw. 100 %, wenn die mutierten Untereinheiten nicht dimerisieren können. Die Tatsache, daß eine Kotransfektion von Wildtyp- und mutierten Untereinheiten zu einer Reduktion der absoluten Stromamplitude auf etwa 15 % im Fall der M200fsX231 Mutante bzw. auf ca. 30 % bei der del74-117 Mutation führte, legt den Schluß nahe, daß die mutierten Untereinheiten in der Lage sind, mit

dem Wildtyp zu interagieren. Endgültig kann dies aber erst auf einem methodisch anderen Weg nachgewiesen werden.

Unabhängig von dem Grund für den verringerten Strom deuten die hier in einem heterologen Expressionssystem erzielten Ergebnisse auf eine substantielle Reduktion der CIC-2 Kanalfunktion in Patienten mit der M200fsX231 oder der del74-117 Mutation hin. Eine Beeinträchtigung des Chlorid-Ausstromes und eine dadurch bedingte intrazelluläre Akkumulation von Chlorid wären die Folge. Entsprechend der in Abschnitt 4.3 hypothetisierten Rolle von CIC-2 bei der neuronalen Chlorid-Homöostase würde ein Ausfall des Kanals zu einer verminderten inhibitorischen oder sogar einer exzitatorischen GABA-Antwort führen und könnte deshalb neuronale Übererregbarkeit und epileptische Anfälle verursachen.

Ein Beispiel für diese Auswirkungen einer verminderten CIC-2 Expression existiert *in vivo* im neonatalen Hippocampus der Ratte (Mladinic et al., 1999): hier wird der CIC-2 Kanal hauptsächlich in einer verkürzten Form exprimiert, in der das Exon 2 deletiert ist. Diese Form ist nicht funktionell, und Auswirkungen auf die Chlorid-Homöostase durch eine intrazelluläre Ansammlung von Chlorid und eine darauf zurückzuführende depolarisierende Wirkung von GABA liegen nahe, da in der postnatalen Phase die GABA- und Glycin-vermittelte Antwort noch exzitatorisch ausfällt. Die Bedeutung der Cl⁻-Homöostase für die Entstehung epileptischer Anfälle wird durch ein weiteres Tiermodell angedeutet: in Ratten, bei denen durch wiederholte unterschwellige elektrische Reizung (sogenanntes *kindling*) der Amygdala künstlich eine Epilepsie herbeigeführt wurde, konnte eine erhöhte Expression des einwärts gerichteten Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporters NKCC1 zusammen mit einer reduzierten Expression von CIC-2 sowie des auswärts gerichteten K⁺-Cl⁻-Kotransporters KCC1 nachgewiesen werden (Okabe et al., 2003). Diese Veränderungen in der Expression implizieren eine Zunahme der intrazellulären Cl⁻-Konzentration, da NKCC1 Cl⁻ in der Zelle akkumuliert, während KCC1 und CIC-2 Cl⁻ aus der Zelle heraus schaffen. Dies könnte zu einer Reduktion der GABAergen Inhibition führen und so eine Erklärung für die beobachtete Epileptogenese darstellen.

Vor diesem Hintergrund erscheint ein Ausfall der CIC-2 Funktion als Folge der hier untersuchten Mutationen als ein plausibler Grund für das Auftreten epileptischer Anfälle.

4.4.2 G715E verändert das Aktivierungsverhalten von CIC-2

Die dritte in dieser Arbeit charakterisierte IGE-Mutation wurde in einer Familie gefunden, in der bei zwei Mitgliedern Absence-Anfälle auftraten, denen einige generalisierte tonisch-klonische Anfällen folgten (JAE) (Haug et al., 2003). Bei der Genmutation handelt es sich um eine Punktmutation im C-Terminus des Kanals, die den Austausch einer neutralen Aminosäure (Glycin) durch eine negativ geladene (Glutamat) nach sich zieht.

hCIC-2 G715E Kanäle sind im Gegensatz zu den beiden anderen Mutationen funktionell. Ihr Expressionslevel ist vergleichbar mit dem der Wildtyp-Isoform, und auch viele funktionale Eigenschaften des CIC-2 Stromes wie die Lage der Aktivierungskurve und die

Aktivierungskinetik sind unverändert. Die Kopplung des Schaltverhaltens des mutierten Kanals an die intrazelluläre Chloridkonzentration ist jedoch gegenüber der des CIC-2 Wildtyps quantitativ geändert: durch niedrigeren $[Cl^-]_i$ wird die Aktivierungskurve von G715E Homodimeren nicht so weit in negativer Richtung verschoben wie die des Wildtyps (Abb. 3.13 C und D). Diese veränderte Beziehung zwischen der Lage der Aktivierungskurve und intrazellulärer Chloridkonzentration deutet auf eine steilere Spannungsabhängigkeit der Chloridbindung und einen höheren $K_D(0)$ -Wert für den mutierten Kanal hin (Cui et al., 1997). Für die Funktionsweise von CIC-2 bedeutet dies, daß bei physiologischen Chloridkonzentrationen hCIC-2 G715E schon bei weniger negativen Potentialen öffnet als hCIC-2 WT.

Der Mechanismus, durch den G715E eine neuronale Übererregbarkeit verursacht, ist von dem der beiden anderen Mutationen verschieden. Der Ausstrom negativ geladener Cl^- -Ionen aus der Zelle kann eine Depolarisation der Membran verursachen und deshalb die neuronale Erregbarkeit verändern. Durch die charakteristische Verknüpfung der Öffnung von CIC-2 Kanälen mit der intrazellulären Cl^- -Konzentration wird der Chlorid-Ausstrom unter normalen physiologischen Bedingungen relativ gering gehalten, und eine Membrandepolarisation wird so verhindert. Nach intensiver synaptischer Aktivität kann jedoch eine Depolarisierung der Membran durch die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren gleichzeitig mit einer erhöhten intrazellulären Cl^- -Konzentration auftreten, die durch einen $GABA_A$ -Rezeptor vermittelten Cl^- -Einstrom verursacht wurde (Abb. 4.2).

Bei der Repolarisation nach einem Aktionspotential, wenn das Membranpotential wieder unterhalb des Cl^- -Gleichgewichtspotentials liegt, würden hCIC-2 G715E Kanäle aufgrund ihrer geänderten Eigenschaften früher öffnen als der hCIC-2 Wildtyp und einen gesteigerten Ausstrom von Cl^- ermöglichen. Analog zu Schrittmacherkanälen im Herzen und im Gehirn (Pape, 1996) könnte diese unnormale Chlorid-Leitfähigkeit zu einer erneuten Depolarisation führen, die auch über die Schwelle für Aktionspotentiale hinausgehen könnte. Wildtyp-hCIC-2 Kanäle würden im Gegensatz dazu erst später aktivieren und einen geringeren Cl^- -Ausstrom vermitteln, was eine substantielle Membrandepolarisation verhindert. Dieses Modell erklärt, warum die geänderte Funktion von G715E zu neuronaler Übererregbarkeit der postsynaptischen Membran von GABAergen Synapsen führen und so epileptische Anfälle auslösen kann.

Auch im Fall von G715E waren die betroffenen Patienten heterozygot. In nativen Zellen bestehen also bei einer vergleichbaren Expression der beiden Allele 25 % der CIC-2 Kanäle mutmaßlich aus G715E Homodimeren, die aufgrund ihrer geänderten Funktion eine verfrühte Chlorid-Leitfähigkeit vermitteln. Das Verhalten der Heterodimere aus einer Wildtyp- und einer mutierten Untereinheit, die bei heterozygoten Patienten 50 % ausmachen, ist bei dieser Mutation irrelevant, da der Anteil der homodimeren Kanäle bereits ausreicht, um einen im Vergleich zum Wildtyp vermehrten Ausstrom von Chlorid zu verursachen. Aus diesem Grund wurde das Schaltverhalten der Heterodimere aus hCIC-2 WT und hCIC-2 G715E in dieser Arbeit nicht untersucht.

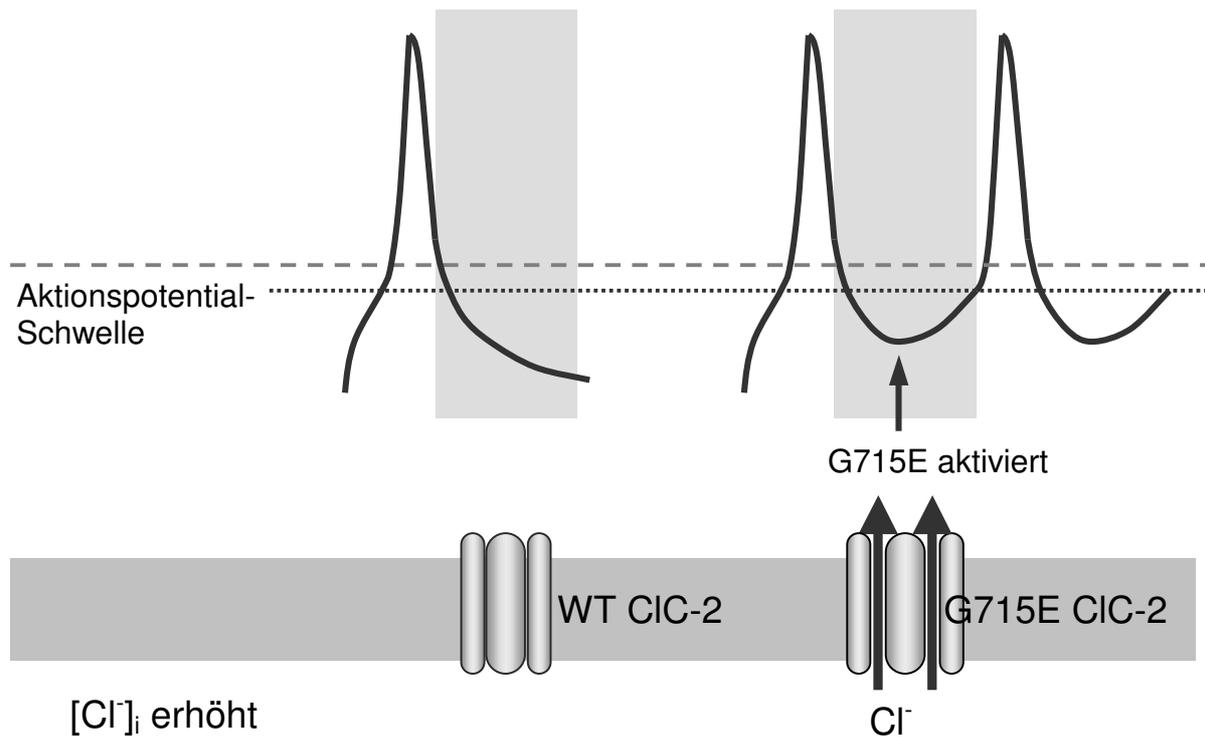


Abbildung 4.2: Möglicher Mechanismus der Epileptogenese durch hCIC-2 G715E. Nach intensiver synaptischer Aktivität ist die Membran durch die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren depolarisiert und gleichzeitig die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration durch GABA_A-Rezeptor vermittelten Cl⁻-Einstrom erhöht. Während der Repolarisationsphase nach einem Aktionspotential (hellgrau unterlegter Bereich) aktivieren CIC-2 G715E Kanäle schon früher als der CIC-2 Wildtyp und vermitteln deshalb einen größeren Cl⁻-Ausstrom. Dies kann zu einer erneuten Depolarisation über die Aktionspotential-Schwelle hinaus führen und so eine neuronale Übererregbarkeit verursachen.

4.4.3 *CLCN2* als krankheitsverursachendes Gen in idiopathischer Epilepsie

Den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zufolge kann sowohl ein Funktionsverlust als auch ein Funktionszugewinn von CIC-2 Epilepsie in Menschen verursachen. Im Gegensatz dazu zeigte eine kürzlich beschriebene CIC-2 *knock-out* Maus (Bösl et al., 2001; Nehrke et al., 2002) keine epileptischen Anfälle. Es existieren jedoch weitere Beispiele, in denen sich der Phänotyp eines Mausmodells von der menschlichen Krankheit unterscheidet. Von transgenen Mäusen mit einer Punktmutation in der α_4 -Untereinheit bzw. ausgeschalteten α_4 - oder β_2 -Untereinheiten des neuronalen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors (Labarca et al., 2001; Marubio et al., 1999; Ross et al., 2000; Picciotto et al., 1995) war erwartet worden, daß sie als Tiermodell für die menschliche Epilepsie-Form ADNFLE dienen könnten, die durch Mutationen in *CHRNA4* und *CHRNB2* verursacht wird. Diese Tiere besaßen jedoch keinen epileptischen Phänotyp. Die *adr* Maus, bei der mehrere Transmembrandomänen von CIC-1 deletiert sind, was zu einem Funktionsverlust des Kanals führt (Steinmeyer et al., 1991b), zeigte viel stärkere Myotonie-Symptome als Menschen mit nicht-funktionellen CIC-1 Kanälen (Heine et al., 1994). Charakteristische anatomische und physiologische Eigenschaften sowie verschiedene kompensatorische Mechanismen in Mensch und Maus

könnten für diese artspezifischen Unterschiede verantwortlich sein. Der fehlende epileptische Phänotyp von *Clcn2*^{-/-} Mäusen spricht also nicht notgedrungen gegen die hier vorgeschlagene Rolle von *CLCN2* als Epilepsie-Gen.

CLCN2 konnte mit vier verschiedenen IGE-Subtypen assoziiert werden (JME, EGMA, JAE und CAE), die alle komplexe Merkmale aufweisen (Scheffer & Berkovic, 2003). Verschiedene Gene für neuronale Ionenkanäle wurden bereits in monogenen Subtypen idiopathischer Epilepsie identifiziert. *CLCN2* ist jedoch das erste Epilepsie-Gen, in dem Mutationen das ganze Spektrum üblicher IGE-Subtypen verursachen können. Obwohl es den Anschein hat, daß die Mutationen in *CLC-2* für den Haupteffekt verantwortlich sind und somit eine monogene Ursache für die Krankheiten darstellen, muß es einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund oder weitere modifizierende Gene geben, die zu der phänotypischen Heterogenität in den betroffenen Familien führen und mit dem komplexen Vererbungsgang (Haug et al., 2003) vereinbar sind.

Obwohl die mutmaßlichen Mechanismen, durch die epileptische Anfälle ausgelöst werden, in den hier charakterisierten *CLCN2* Mutationen unterschiedlich sind, können sie alle eine Übererregbarkeit der postsynaptischen Membran von GABAergen Synapsen verursachen. Diese Ergebnisse demonstrieren die große Bedeutung einer genetisch verursachten Fehlfunktion der GABAergen Inhibition bei der Entstehung von Epilepsie. Der Einfluß von GABA beim Mechanismus und der Behandlung von Epilepsie wurde bereits durch die Existenz verschiedener Tiermodelle mit mutierten GABA-Rezeptoren sowie durch die pharmakologische Wirkung von GABA-Agonisten und -Antagonisten verdeutlicht (Treiman, 2001). Die kürzliche Identifikation von Mutationen in verschiedenen Untereinheiten des neuronalen GABA_A-Rezeptors in mehreren Familien mit CAE, GEFS⁺ und JME (Cossette et al., 2002; Kananura et al., 2002) stellen einen weiteren Beweis für die wichtige Rolle von GABA bei der Epileptogenese dar. Eine Störung der GABAergen synaptischen Inhibition könnte sich folglich als eine grundlegende pathophysiologische Ursache bei einem großen Teil der idiopathischen Epilepsien erweisen. Daß auch eine beeinträchtigte oder fehlende Funktion des Chloridkanals *CLC-2* eine Rolle dabei spielen kann, wurde durch die Ergebnisse der Untersuchungen in dieser Arbeit belegt.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte eine große Ähnlichkeit zwischen der menschlichen und der Ratten-Isoform von CIC-2 bezüglich ihrer biophysikalischen Eigenschaften nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede gibt es lediglich in ihren Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken. Die beiden Kanäle sind auf Aminosäure-Ebene zu 94 % homolog (Cid et al., 1995). Die meisten Abweichungen in der Sequenz befinden sich im N-Terminus und im C-Terminus zwischen den beiden CBS-Domänen. Es liegt deshalb nahe, daß die kinetischen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen auf Divergenzen in diesen Bereichen zurückzuführen sind. Eine detaillierte Mutationsanalyse würde die Identifikation der verantwortlichen Sequenzabschnitte erlauben.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte belegt werden, daß der Block des CIC-2 Stromes durch extrazelluläre Iodid-Ionen sowohl vom Konformationszustand des Kanals als auch vom Membranpotential abhängt. Des weiteren wurde eine Verschiebung der Aktivierungskurve von CIC-2 durch Iodid im externen Medium nachgewiesen, was darauf hindeutet, daß Iodid den Strom nicht nur blockiert, sondern auch einen Einfluß auf das Schaltverhalten des Kanals hat. Um die Ursache für diese Veränderung des Schaltverhaltens herauszufinden, wären weiterführende Versuche erforderlich, die eine genauere Analyse der Auswirkungen von Iodid auf die Kinetik des Stromes von CIC-2 ermöglichen. Mit Hilfe von verschiedenen extrazellulären Iodidkonzentrationen könnte die Dissoziationskonstante K_D für Iodid ermittelt werden. Durch zusätzliche Untersuchungen zur Wirkung von intrazellulärem Iodid und zur Permeation anderer Anionen könnten schließlich - in Analogie zu bereits durchgeführten Experimenten an CIC-1 und CIC-4 (Fahlke et al., 1997c; Rychkov et al., 1998; Hebeisen et al., 2003) - genauere Aussagen zur Lage und Affinität der Anionen-Bindungsstellen in der Pore von CIC-2 sowie zur Beziehung von Schaltverhalten und Ionenpermeation in dieser Isoform getroffen werden.

Eine Kopplung des Schaltverhaltens von CIC-2 an den transmembranen Chlorid-Gradienten wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse und basierend auf verschiedenen Untersuchungen anderer Membranproteine, die den intrazellulären Chloridgehalt von Neuronen beeinflussen, wurde ein Modell zur Rolle von CIC-2 bei der neuronalen Cl^- -Homöostase entwickelt. Dieses Modell erfordert eine Überprüfung *in vivo*, was aufgrund seiner Komplexität und der großen Anzahl beteiligter Ionenkanäle und Transporter in nativen Zellen jedoch problematisch ist. Eine mögliche Lösung wäre eine stabile Zelllinie, die sowohl einen K^+ - Cl^- -Kotransporter als auch einen einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanal enthält. Der Effekt einer transienten Transfektion dieser Zelllinie mit CIC-2 könnte durch Messungen der intrazellulären Chloridkonzentration analysiert und so die Haltbarkeit des Modells zur Funktion des CIC-2 Kanals überprüft werden.

Zwei der drei in dieser Arbeit untersuchten IGE-Mutationen von CIC-2 erwiesen sich als nicht-funktionell. Künstlich erzeugte Heterodimere aus einer Wildtyp- und einer mutierten

Untereinheit ergaben ebenfalls keinen Strom. Ein korrekter Transport der Proteine in die Zellmembran konnte durch fluorometrische Messungen belegt werden. Der nicht vorhandene Strom könnte also in einer fehlenden Funktionalität der Heterodimere oder in einer mangelnden Interaktionsfähigkeit der Untereinheiten *in vivo* begründet sein. Durch FRET-Messungen ließ sich eine spezifische Interaktion jedoch nicht eindeutig nachweisen. Als Alternative für eine Überprüfung der Interaktionsfähigkeit käme „Blue Native PAGE“ in Frage, eine Methode zur Isolierung intakter Protein-Komplexe. Durch den Nachweis, daß die mutierten CIC-2 Untereinheiten tatsächlich in der Lage sind, mit dem Wildtyp zu interagieren, könnte der genaue Grund für die dominant-negativen Eigenschaften dieser Mutationen geklärt werden.

Hinsichtlich der dritten IGE-Mutation wäre eine detailliertere Untersuchung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen der mit der transmembranen Chloridkonzentration verknüpften relativen Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und der Lage der Mutation interessant. In CIC-0 und CIC-1 konnte ein ausgeprägter Effekt von Mutationen im C-Terminus auf das Schaltverhalten der Kanäle nachgewiesen werden (Beck et al., 1996; Maduke et al., 1998; Hebeisen et al., 2004). Daß auch bei CIC-2 der C-Terminus eine Rolle für die Lage der Aktivierungskurve spielt, wird durch die hier erzielten Ergebnisse mit der G715E Mutation angedeutet. Inwieweit dies auch für andere Veränderungen der Aminosäuresequenz in derselben Region gilt, könnte durch weitere Mutationsanalysen genauer untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

CIC-2 gehört zur CIC-Familie spannungsabhängiger Chlorid-Kanäle. Innerhalb dieser Kanalfamilie zeigt er eine einzigartige Aktivierung durch Hyperpolarisation, niedrigen pH-Wert und hypotones Medium.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene biophysikalische Eigenschaften des humanen CIC-2 Kanals erstmals funktional charakterisiert und mit denen der Ratten-Isoform verglichen. Dazu wurden beide Proteine heterolog in tsA201-Zellen exprimiert und mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik in der *whole-cell* Konfiguration elektrophysiologisch untersucht.

hCIC-2 und rCIC-2 unterscheiden sich in ihren Aktivierungseigenschaften kaum. Beide Kanäle sind bei positiven Spannungen weitgehend geschlossen und aktivieren langsam bei Hyperpolarisation. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung ist in den beiden Isoformen nicht signifikant unterschiedlich. Der humane CIC-2 besitzt jedoch eine langsamere Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik als der Ratten-Kanal, die sich sowohl in größeren Zeitkonstanten als auch in einer veränderten Zusammensetzung des Gesamtstromes aus verschiedenen schnell aktivierenden bzw. deaktivierenden Stromkomponenten äußert.

Für den zytoplasmatischen N-Terminus von CIC-2 konnte eine früher hypothetisierte Funktion als Inaktivierungsdomäne nicht bestätigt werden. Das nahezu unveränderte Schaltverhalten einer entsprechenden Deletionsmutante spricht gegen das von anderen Autoren vorgeschlagene Modell zur Inaktivierung dieses Kanals. Dennoch wird durch die hier nachgewiesene geänderte Kinetik der Mutante eine wichtige Rolle des N-Terminus beim Schaltverhalten von CIC-2 impliziert.

Eine Untersuchung der Auswirkungen von extrazellulärem Iodid auf den Strom von CIC-2 konnte eine Abhängigkeit des Blocks durch Iodid-Ionen sowohl vom Membranpotential als auch vom Konformationszustand des Kanals belegen, was ebenfalls gegen die Existenz einer zytoplasmatischen Inaktivierungsdomäne spricht.

In Versuchen mit einer verringerten intrazellulären Chloridkonzentration konnte eine Abhängigkeit des Aktivierungsverhaltens von CIC-2 vom transmembranen Chlorid-Gradienten nachgewiesen werden: der Kanal aktiviert nur bei Spannungen negativ des Chlorid-Umkehrpotentials und vermittelt deshalb ausschließlich einen Cl^- -Ausstrom. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde ein Modell zur Funktion von CIC-2 bei der neuronalen Chlorid-Homöostase entwickelt, das dem Kanal eine große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung eines niedrigen intrazellulären Chloridgehalts zuschreibt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden drei Mutationen von CIC-2 untersucht, die kürzlich in Patienten mit idiopathischer generalisierter Epilepsie (IGE) identifiziert wurden. Zwei dieser

Mutationen, M200fsX231 und del74-117, erwiesen sich sowohl in homo- als auch in heterodimerer Form mit einer Wildtyp-Untereinheit als nicht-funktionell. Ein korrekter Transport der mutierten Proteine zur Zellmembran wurde durch fluorometrische Messungen belegt und konnte deshalb als Grund für den dominant-negativen Effekt dieser Mutationen ausgeschlossen werden. Ob die fehlende Funktionalität durch eine mangelnde Interaktionsfähigkeit der mutierten mit CIC-2 Wildtyp-Untereinheiten verursacht wird, war durch FRET-Messungen nicht eindeutig nachweisbar. Der durch die Mutationen verursachte Funktionsverlust von CIC-2 Kanälen führt in betroffenen Patienten mutmaßlich zu einer intrazellulären Chlorid-Akkumulation, was in einer exzitatorischen GABA-Antwort und neuronaler Übererregbarkeit resultieren kann und somit eine Erklärung für den epileptischen Phänotyp darstellt.

Die dritte IGE-Mutation, G715E, beeinträchtigt zwar nicht die Funktionalität von CIC-2, hat jedoch eine Veränderung des Aktivierungsverhaltens zur Folge: mutierte Kanäle öffnen bereits bei weniger negativen Membranpotentialen als die Wildtyp-Isoform. Unter bestimmten Bedingungen, z.B. während der Repolarisation nach intensiver synaptischer Aktivität, können sie so einen vermehrten Chlorid-Ausstrom vermitteln, was zu einer wiederholten Depolarisation der Zelle und zum erneuten Auftreten von Aktionspotentialen führen könnte. Das Auftreten epileptischer Anfälle wird hier folglich durch einen anderen Mechanismus verursacht, der einen Funktionszugewinn von CIC-2 beinhaltet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit heben die Bedeutung des Schaltverhaltens von CIC-2 für seine Funktion hervor und etablieren *CLCN2* als krankheitsverursachendes Gen in idiopathischen Epilepsien.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Cl ⁻] _i	intrazelluläre Chlorid-Konzentration
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BFNC	<i>benign familiar neonatal convulsions</i>
bp	Basenpaare
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCC	<i>Calcium-activated chloride channel</i>
CAE	<i>childhood absence epilepsy</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis conductance regulator</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CIC	<i>chloride channel</i>
CLCA	<i>Calcium-activated chloride channel</i>
CLIC	<i>chloride intracellular channel</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAAT	Glutamatttransporter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGMA	<i>epilepsy grand-mal on awakening</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
eR	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fötales Rinderserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GABA	γ-amino-Buttersäure
GEFS ⁺	<i>generalized epilepsy with febrile seizures plus</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney-Zellen</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HiFi	<i>high fidelity</i>

IGE	idiopathische generalisierte Epilepsie
JAE	<i>juvenile absence epilepsy</i>
JME	<i>juvenile myoclonic epilepsy</i>
KCC	Kalium-Chlorid-Kotransporter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
OPV	Operationsverstärker
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ROI	<i>region of interest</i>
S4	viertes Transmembransegment
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SV40	Simian Virus 40
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
U	<i>unit</i>
U/m	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

7 LITERATURVERZEICHNIS

Accardi, A., Pusch, M. (2003) Conformational changes in the pore of ClC-0. *J. Gen. Physiol.* 122, 277-293.

Adrian, R.H., Bryant, S.H. (1974) On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J. Physiol.* 240, 505-515.

Ahmed, N., Ramjeesingh, M., Wong, S., Varga, A., Garami, E., Bear, C.E. (2000) Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton. *Biochem. J.* 352, 789-794.

Andermann, F., Berkovic, S.F. (2001) Idiopathic generalized epilepsy with generalized and other seizures in adolescence. *Epilepsia* 42, 317-320.

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

Arreola, J., Begenisich, T., Melvin, J.E. (2002) Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J. Physiol.* 541, 103-112.

Bali, M., Lipecka, J., Edelmann, A., Fritsch, J. (2001) Regulation of ClC-2 chloride channels in T84 cells by TGF- α . *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C1588-C1598.

Bastiaens, P.I., Squire, A. (1999) Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol.* 9, 48-52.

Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J.F., Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R., LeGuern, E. (2001) First genetic evidence of GABA_A receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the γ 2-subunit gene. *Nat. Genet.* 28, 46-48.

Beck, C.L., Fahlke, Ch., George, A.L. Jr. (1996) Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11248-11252.

Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J., Harvey, R.J. (1999) Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 667-676.

- Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80, 555-592.
- Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M.J., Vollmer, M., Ruf, E.M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., Milford, D.V., Jeck, N., Konrad, M., Landau, D., Knoers, N.V.A.M., Antignac, C., Sudbrack, R., Kispert, A., Hildebrandt, F. (2001) Mutations of *BSND* causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat. Genet.* 29, 310-314.
- Bond, T.D., Ambikapathy, S., Mohammad, S., Valverde, M.A. (1998) Osmosensitive Cl^- currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J. Physiol.* 15, 45-54.
- Bormann, J., (2000) The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 16-19.
- Borsani, G., Rugarli, E.I., Tagliatalata, M., Wong, C., 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.
- Bösl, M.R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S.E., Mukhopadhyay, A.K., Davidoff, M.S., Holstein, A.F., Jentsch, T.J. (2001) Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon *CIC-2* Cl^- channel disruption. *EMBO J.* 20, 1289-1299.
- Brandt, S., Jentsch, T.J., (1995) *CIC-6* and *CIC-7* are two novel broadly expressed members of the *CIC* chloride channel family. *FEBS Lett.* 377, 15-20.
- Carew, M.A., Thorn, P. (1996) Identification of *CIC-2*-like chloride currents in pig pancreatic acinar cells. *Pflügers Arch.* 433, 84-90.
- Chebib, M., Johnston, G.A. (1999) The “ABC” of GABA receptors: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 937-940.
- Chen, T.Y., Miller, C. (1996) Nonequilibrium gating and voltage dependence of the *CIC-0* Cl^- channel. *J. Gen. Physiol.* 108, 237-250.
- Chen, T.Y. (2003) Coupling gating with ion permeation in *CIC* channels. *Sci. STKE* 188, pe23.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J.L., Ben-Ari, Y. (1991) GABA: an excitatory neurotransmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 14, 515-519.

- Chu, S., Murray, C.B., Liu, M.M., Zeitlin, P.L. (1996) A short CIC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping. *Nucleic Acids Res.* 24, 3453-3457.
- Chu, S., Zeitlin, P.L. (1997) Alternative mRNA splice variants of the rat CIC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of CIC-2. *Nucleic Acids Res.* 25, 4153-4159.
- Cid, L.P., Montrose-Rafizadeh, C., Smith, D.I., Guggino, W.B., Cutting, G.R. (1995) Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (CIC-2) cDNA widely expressed in human tissues. *Hum. Mol. Genet.* 4, 407-413.
- Cid, L.P., Niemeyer, M.I., Ramírez, A., S epulveda, F.V. (2000) Splice variants of a CIC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *Am. J. Physiol.* 279, C1198-C1210.
- Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J., Mathie, A. (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 506, 665-678.
- Clayton, G.H., Staley, K.J., Wilcox, C.L., Owens, G.C., Smith, R.L. (1998) Developmental expression of CIC-2 in the rat nervous system. *Brain Res.* 108, 307-318.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30, 389-399.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., Wang, Y.T., Rouleau, G.A. (2002) Mutation of *GABRA1* in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* 31, 184-189.
- Cromer, B.A., Morton, C.J., Board, P.G., Parker, M.W. (2002) From glutathione transferase to pore in a CLIC. *Eur. Biophys. J.* 31, 356-364.
- Cui, J., Cox, D.H., Aldrich, R.W. (1997) Intrinsic voltage dependence and Ca^{2+} regulation of *mslo* large conductance Ca-activated K^+ channels. *J. Gen. Physiol.* 109, 647-673.
- DeFazio, R.A., Keros, S., Quick, M.W., Hablitz, J.J. (2000) Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 20, 8069-8076.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J.R., Horowitz, B. (1997) Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390, 417-421.

- Duan, D., Ye, L., Britton, F., Horowitz, B., Hume, J.R. (2000) A novel anionic inward rectifier in native cardiac myocytes. *Circ. Res.* 86, E62-E71.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R. (2002) X-ray structure of a Cl⁻ channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287-294.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., MacKinnon, R. (2003) Gating the selectivity filter in Cl⁻ channels. *Science* 300, 108-112.
- Estévez, R., Boettger T., Stein V., Birkenhäger R., Otto E., Hildebrandt F., Jentsch T.J. (2001) Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* 414, 558-561.
- Estévez, R., Schröder, B.C., Accardi, A., Jentsch, T.J., Pusch, M. (2003) Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in Cl⁻ channel 1. *Neuron* 38, 47-59.
- Fahlke, Ch., Rüdell, R., Mitrovic, N., Zhou, M., George, A.L. Jr. (1995) An aspartic acid residue important for voltage-dependent gating of human muscle chloride channels. *Neuron* 15, 463-472.
- Fahlke, Ch., Rosenbohm, A., Mitrovic, N., George, A.L. Jr., Rüdell, R. (1996) Mechanism of voltage-dependent gating in skeletal muscle chloride channels. *Biophys. J.* 71, 695-706.
- Fahlke, Ch., Knittle, T., Gurnett, C.A., Campbell, K.P., George, A.L. Jr. (1997a) Subunit stoichiometry of human muscle chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 109, 93-104.
- Fahlke, Ch., Yu, H.T., Beck, C.L., Rhodes, T.H., George, A.L. Jr. (1997b) Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels. *Nature* 390, 529-532.
- Fahlke, Ch., Dürr, C., George, A.L. Jr. (1997c) Mechanism of ion permeation in skeletal muscle chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 110, 551-564.
- Fahlke, Ch., Beck, C.L., George, A.L. Jr. (1997d) A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2729-2734.
- Fahlke, Ch. (2000) Molecular mechanisms of ion conduction in Cl⁻ channels: lessons from disease-causing mutations. *Kidney Int.* 57, 780-786.
- Fahlke, Ch. (2001) Ion permeation and selectivity in Cl⁻ channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280, F748-F757.

- Fisher, S.E., Black, G.C., Lloyd, S.E., Hatchwell, E., Wrong, O., Thakker, R.V., Craig, I.W. (1994) Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum. Mol. Genet.* 3, 2053-2059.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T., Jentsch, T.J. (1999) Mutational analysis demonstrates that CIC-4 and CIC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J. Biol. Chem.* 274, 896-902.
- Fritsch, J., Edelman, A. (1996) Modulation of the hyperpolarization-activated Cl⁻ current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. *J. Physiol.* 490, 115-128.
- Fritsch, J., Edelman, A. (1997) Osmosensitivity of the hyperpolarization-activated chloride current in human intestinal T84 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 272, C778-C786.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., Hiraoka, M. (1998) Characteristics of rabbit CIC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 274, C500-C512.
- Furukawa, T., Ogura, T., Zheng, Y.J., Tsuchiya, H., Nakaya, H., Katayama, Y., Inagaki, N. (2002) Phosphorylation and functional regulation of CIC-2 chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes by M cyclin-dependent protein kinase. *J. Physiol.* 540, 883-893.
- Ganguly, K., Schinder, A.F., Wong, S.F., Poo, M. (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105, 521-532.
- Gardiner, R.M. (1999) Genetic basis of the human epilepsies. *Epilepsy Res.* 36, 91-95.
- George, A.L. Jr., Crackower, M.A., Abdalla, J.A., Hudson, A.J., Ebers, G.C. (1993) Molecular basis of Thomsen's disease (autosomal dominant myotonia congenita). *Nat. Genet.* 3, 305-310.
- Graham, R.L., van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., Jentsch, T.J. (1992) Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and volume. *Nature* 360, 759-762.
- Gulyas, A.I., Sik, A., Payne, J.A., Kaila, K., Freund, T.F. (2001) The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2205-2217.

- Gyömörey, K., Yeager, H., Ackerley, C., Garami, E., Bear, C.E. (2000) Expression of the chloride channel ClC-2 in the murine small intestine epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1787-C1794.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.
- Hanke, W., Miller, C. (1983) Single chloride channels from *Torpedo* electroplax. Activation by protons. *J. Gen. Physiol.* 82, 25-45.
- Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A.K., Sander, T., Ramirez, A., Poser, B., Maljevic, S., Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J., Horvath, S., Hallmann, K., Dullinger, J.S., Rau, B., Haverkamp, F., Beyenburg, S., Schulz, H., Janz, D., Giese, B., Müller-Newen, G., Propping, P., Elger, C.E., Fahlke, Ch., Lerche, H., Heils, A. (2003) Mutations in *CLCN2* encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat. Genet.* 33, 527-532.
- Hebeisen, S., Heidtmann, H., Cosmelli, D., Gonzalez, C., Poser, B., Latorre, R., Alvarez, O., Fahlke, Ch. (2003) Anion permeation in human ClC-4 channels. *Biophys. J.* 84, 2306-2318.
- Hebeisen, S., Biela, A., Giese, B., Müller-Newen, G., Hidalgo, P., Fahlke, Ch. (2004) The role of the carboxy-terminus in ClC chloride channel function. *J. Biol. Chem.* Epub ahead of print.
- Heine, R., George, A.L. Jr., Pika, U., Deymeer, F., Rüdell, R., Lehmann-Horn, F. (1994) Proof of a non-functional muscle chloride channel in recessive myotonia congenita (Becker) by detection of a 4 base pair deletion. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1123-1128.
- Hille, B. (1992) Ionic channels of excitable membranes. 2. Auflage. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.
- Horn, R., Marty, A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* 92, 145-159.
- Hübner, C.A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., Jentsch, T.J. (2001) Disruption of *KCC2* reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30, 515-524.
- Iyer, R., Iverson, T.M., Accardi, A., Miller, C. (2002) A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* 419, 715-718.

- Jentsch, T.J., Steinmeyer, K., Schwarz, G. (1990) Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348, 510-514.
- Jentsch, T.J., Günther, W., Pusch, M., Schwappach, B. (1995) Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J. Physiol.* 19S-25S.
- Jentsch, T.J. (2000) Neuronal *KCNQ* potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 21-30.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A.A. (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 82, 503-568.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., MacKinnon, R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 42-48.
- Jordt, S.E., Jentsch, T.J. (1997) Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16, 1582-1592.
- Jurman, M.E., Boland, L.M., Liu, Y., Yellen, G. (1994) Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *BioTechniques* 17, 876-881.
- Kaila, K., Lamsa, K., Smirnov, S., Taira, T., Voipio, J. (1997) Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *J. Neurosci.* 17, 7662-7672.
- Kananura, C., Haug, K., Sander, T., Runge, U., Gu, W., Hallmann, K., Rebstock, J., Heils, A., Steinlein, O. (2002) A splice-site mutation in *GABRG2* associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch. Neurol.* 59, 1137-1141.
- Karpova, T.S., Baumann, C.T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G.L., McNally, J.G. (2003) Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J. Microsc.* 209, 56-70.
- Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Marumo, F., Sasaki, S. (1994) Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* 12, 597-604.

- Kawasaki, M., Fukuwa, T., Yamauchi, K., Sakamoto, H., Marumo, F., Sasaki, S. (1999) Identification of an acid-activated Cl⁻ channel from human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 277, F948-F954.
- Kenworthy, A.K. (2001) Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* 24, 289-296.
- Kirk, K.L. (2000) Chloride channels and tight junctions. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279, C1675-C1676.
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.H., Jentsch, T.J. (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257, 797-800.
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., Jentsch, T.J. (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104, 205-215.
- Kubisch, C., Schmidt-Rose, R., Fontaine, B., Bretag, A.H., Jentsch, T.J. (1998) ClC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Hum. Mol. Gen.* 7, 1753-1760.
- Kullmann, D.M. (2002) The neuronal channelopathies. *Brain* 125, 1177-1195.
- Labarca, C., Schwarz, J., Desphande, P., Schwarz, S., Nowak, M.W., Fonck, C., Nashmi, R., Kofuji, P., Dang, H., Shi, W., Fidan, M., Khakh, B.S., Chen, Z., Bowers, B.J., Boulter, J., Wehner, J.M., Lester, H.A. (2001) Point mutant mice with hypersensitive $\alpha 4$ nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2786-2791.
- Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K. (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79, 1317-1372.
- Lin, C.W., Chen, T.Y. (2003) Probing the pore of ClC-0 by substituted cysteine accessibility method using methane thiosulfonate reagents. *J. Gen. Physiol.* 122, 147-159.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H.S., Fisher, S.E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S.J., Harding, B., Alessandra, B., Devota, M., Goodyear, P., Rigden, S.P.A., Wrong, O., Jentsch, T.J., Craig, I.W., Thakker, R.V. (1996) A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379, 445-449.

- Loewen, M.E., MacDonald, D.W., Gaspar, K.J., Forsyth, G.W. (2000) Isoform-specific exon skipping in a variant form of ClC-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 284-288.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2001) Role of eR export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291, 316-319.
- Maduke, M., Williams, C., Miller, C. (1998) Formation of ClC-0 chloride channels from separated transmembrane and cytoplasmic domains. *Biochemistry* 37, 1315-1321.
- Maduke, M., Pheasant, D.J., Miller, C. (1999) High-level expression, functional reconstitution and quaternary structure of a prokaryotic ClC-type Cl⁻ channel. *J. Gen. Physiol.* 114, 713-722.
- Marubio, L.M., del Mar Arroyo-Jimenez, M., Cordero-Erausquin, M., Lena, C., LeNovere, N., de Kerchove d'Exaerde, A., Huchet, M., Damaj, M.I., Changeux, J.P. (1999) Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 398, 805-810.
- Matsumara, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S.B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S., Marumo, F. (1999) Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the ClC-K1 chloride channel. *Nat. Genet.* 21, 95-98.
- Middleton, R.E., Pheasant, D.J., Miller, C. (1994) Purification, reconstitution and subunit composition of a voltage-gated chloride channel from *Torpedo* electroplax. *Biochemistry* 33, 13189-13198.
- Middleton, R.E., Pheasant, D.J., Miller, C. (1996) Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature* 383, 337-340.
- Miles, R. (1999) A homeostatic switch. *Nature* 397, 215-216.
- Miller, C., (1982) Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 299, 401-411.
- Miller C., White, M.M. (1982) Probes of the conduction pathway of a voltage-gated Cl⁻ channel from *Torpedo*. *J. Gen. Physiol.* 78, 1-18.
- Miller, C., White, M.M. (1984) Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2772-2775.
- Miller, C. (2003) ClC-channels: reading eukaryotic function through prokaryotic spectacles. *J. Gen. Physiol.* 122, 129-131.

- Mindell, J.A., Maduke, M., Miller, C., Grigorieff, N. (2001) Projection structure of a ClC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature* 409, 219-223.
- Misgeld, U., Deisz, R.A., Dodt, H.U., Lux, H.D. (1986) The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science* 232, 1413-1415.
- Mladinic, M., Becchetti, A., Didelon, F., Bradbury, A., Cherubini, E. (1999) Low expression of the ClC-2 chloride channel during postnatal development: a mechanism for the paradoxical depolarizing action of GABA and glycine in the hippocampus. *Proc. R. Soc. Lond.* 266, 1207-1213.
- Mohammad-Panah, R., Gyömörey, K., Rommens, J., Choudhury, M., Li, C., Wang, Y., Bear, C.E. (2001) ClC-2 contributes to native chloride secretion by a human intestinal cell line, Caco-2. *J. Biol. Chem.* 276, 8306-8313.
- Mohammad-Panah, R., Harrison, R., Dhani, S., Ackerley, C., Huan, L.J., Wang, Y., Bear, C.E. (2003) The chloride channel ClC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking. *J. Biol. Chem.* 278, 29267-29277.
- Murray, C.B., Morales, M.M., Flotter, T.R., McGrath-Morrow, S.A., Guggino, W.B., Zeitlin, P.L. (1995) ClC-2: a developmentally dependent chloride-channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12, 597-604.
- Murray, C.B., Chu, S., Zeitlin, P.L. (1996) Gestational and tissue-specific regulation of ClC-2 chloride channel expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 271, L829-L837.
- Nascimento, D.S., Reis, C.U., Goldenberg, R.C., Ortiga-Carvalho, T.M., Pazos-Moura, C.C., Guggino, S.E., Guggino, W.B., Morales, M.M. (2003) Estrogen modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflügers Arch.* 446, 593-599.
- Neher, E., Sakmann, B. (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Neher, E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol.* 207, 123-131.
- Nehrke, K., Arreola, J., Nguyen, H.V., Pilato, J., Richardson, L., Okunade, G., Baggs, R., Shull, G.E., Melvin, J.E. (2002) Loss of hyperpolarization-activated Cl⁻ current in salivary acinar cells from *Cln2* knockout mice. *J. Biol. Chem.* 277, 23604-23611.
- Numberger, M., Draguhn, A. (1996) Patch-Clamp-Technik. Spektrum, Akad. Verlag.

- Okabe, A., Yokokura, M., Toyoda, H., Shimizu-Okabe, C., Ohno, K., Sato, K., Fukuda, A., (2003) Changes in chloride homeostasis-regulating gene expressions in the rat hippocampus following amygdala kindling. *Brain Res.* 990, 221-226.
- Ornellas, D.S., Nascimento, D.S., Christoph, D.H., Guggino, W.B., Morales, M.M. (2002) Aldosterone and high-NaCl diet modulate ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflügers Arch.* 444, 193-201.
- Ornellas, D.S., Grozovsky, R., Goldenberg, R.C., Carvalho, D.P., Fong, P., Guggino, W.B., Morales, M.M. (2003) Thyroid hormone modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat renal proximal tubules. *J. Endocrinol.* 178, 503-511.
- Owens, D.F., Boyce, L.H., Davis, M.B.E., Kriegstein, A.R. (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J. Neurosci.* 16, 6414-6423.
- Pannabecker, T.L., Dahlmann, A., Brokl, O.H., Dantzler, W.H. (2000) Mixed descending- and ascending-type thin limbs of Henle's loop in mammalian renal inner medulla. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278, F202-F208.
- Pape, H.C. (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 299-327.
- Park, K., Arreola, J., Begenisich, T., Melvin, J.E. (1998) Comparison of voltage-activated Cl⁻ channels in rat parotid acinar cells with ClC-2 in a mammalian expression system. *J. Membrane Biol.* 163, 87-95.
- Payne, J.A., Stevenson, T.J., Donaldson, L.F. (1996) Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain: a neuronal-specific isoform. *J. Biol. Chem.* 271, 16245-16252.
- Payne, J.A. (1997) Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 273, C1516-C1525.
- Picciotto, M.R., Zoli, M., Lena, C., Bessis, A., Lallemand, Y., LeNovere, N., Vincent, P., Pich, E.M., Brulet, P., Changeux, J.P. (1995) Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotinic receptor in the brain. *Nature* 374, 65-67.
- Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M.R., Jentsch, T.J. (2000) ClC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408, 369-373.

- Protopopov, A.I., Gizatullin, R.Z., Vorobieva, N.V., Protopopova, M.V., Kiss, C., Kashuba, V.I., Klein, G., Kisselev, L.L., Graphodatsky, A.S., Zabarovsky, E.R. (1996) Human chromosome 3: high-resolution fluorescence in situ hybridization mapping of 40 unique NotI linking clones homologous to genes and cDNAs. *Chromosome Res.* 4, 443-447.
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A., Jentsch, T.J. (1995) Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature* 373, 527-531.
- Pusch, M., Jordt, S.E., Stein, V., Jentsch, T.J. (1999) Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J. Physiol.* 515, 341-353.
- Pusch, M., Accardi, A., Liantonio, A., Guida, P., Traverso, S., Camerino, D.C., Conti, F. (2002) Mechanisms of block of muscle type ClC chloride channels. *Mol. Membrane Biol.* 19, 285-292.
- Ramjeesingh, M., Li, C., Huan, L.J., Garami, E., Wang, Y., Bear, C. (2000) Quaternary structure of the chloride channel ClC-2. *Biochemistry* 39, 13838-13847.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., Kaila, K. (1999) The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- Ross, S.A., Wong, J.Y., Clifford, J.J., Kinsella, A., Massalas, J.S., Horne, M.K., Scheffer, I., Kola, I., Waddington, J.L., Berkovic, S.F., Drago, J. (2000) Phenotypic characterization of an α_4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *J. Neurosci.* 20, 6431-6441.
- Rüdel, R., Lehmann-Horn, F. (1985) Membrane changes in cells from myotonia patients. *Physiol. Rev.* 65, 310-356.
- Rugarli, E.I., Adler, D.A., Borsani, G., Tsuchiya, K., Franco, B., Hauge, X., Distechi, C., Chapman, V., Ballabio, A. (1995) Different chromosomal localization of the *Clcn-4* gene in *Mus spretus* and C57BL/6J mice. *Nat. Genet.* 10, 466-471.
- Rutledge, E., Bianchi, L., Christensen, M., Boehmer, C., Morrison, R., Broslat, A., Beld, A.M., George, A.L. Jr., Greenstein, D., Strange, K. (2001) CLH-3, a ClC-2 anion channel ortholog activated during meiotic maturation in *C. elegans* oocytes. *Curr. Biol.* 11, 161-170.
- Rychkov, G.Y., Pusch, M., Astill, D.StJ., Roberts, M.L., Jentsch, T.J., Bretag, A.H. (1996) Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *J. Physiol.* 497, 423-435.

- Rychkov, G.Y., Pusch, M., Roberts, M.L., Jentsch, T.J., Bretag, A.H. (1998) Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, ClC-1, by foreign anions. *J. Gen. Physiol.* 111, 653-665.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. Laboratory Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, T., Schulz, H., Saar, K., Gennaro, E., Concetta Riggio, M., Bianchi, A., Zara, F., Luna, D., Bulteau, C., Kaminska, A., Ville, D., Cieuta, C., Picard, F., Prud'homme, J.F., Bate, L., Sundquist, A., Gardiner, R.M., Janssen, G.A.M.A.J., de Haan, G.J., Kastelejn-Nolst-Trenité, D.G.A., Bader, A., Lindhout, D., Riess, O., Wienker, T.F., Janz, D., Reis, A. (2000) Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum. Mol. Gen.* 9, 1465-1472.
- Scheffer, I.E., Berkovic, S.F. (2000) Genetics of the epilepsies. *Curr. Opin. Pediatr.* 12, 536-542.
- Scheffer, I.E., Berkovic, S.F. (2003) The genetics of human epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 428-433.
- Schmid, J.A., Scholze, P., Kudlacek, O., Freissmuth, M., Singer, E.A., Sitte, H.H. (2001) Oligomerization of the human serotonin transporter and of the rat GABA transporter 1 visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living cells. *J. Biol. Chem.* 276, 3805-3810.
- Schwiebert, E.M., Cid-Soto, L.P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C.J., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B., Cutting, G.R. (1998) Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3879-3884.
- Selvin, P.R. (2000) The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Struct. Biol.* 7, 730-734.
- Sheppard, D.N., Welsh, M.J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* 79, S23-S45.
- Shimada, K., Li, X., Xu, G., Nowak, D.E., Showalter, L.A., Weinman, S.A. (2000) Expression and canalicular localization of two isoforms of the ClC-3 chloride channel from rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G268-G276.
- Sigworth, F.J. (1995) Electronic design of the patch-clamp. In: Sakmann, B., Neher, E. (Hrsg.) *Single-Channel Recording. 2. Auflage.* Plenum, New York. S.95-127.

- Simon, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nilson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J.M., Sanjad, S.A., Taylor, C.M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G.A., John, E., Lifton, R.P. (1997) Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* 17, 171-178.
- Smith, R.L., Clayton, G.H., Wilcox, C.L., Escudero, K.W., Staley, K.J. (1995) Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 15, 4057-4067.
- Song, L., Mercado, A., Vázquez, N., Xie, Q., Desai, R., George, A.L. Jr., Gamba, G., Mount, D.B. (2002) Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Mol. Brain Res.* 103, 91-105.
- Staley, K.J. (1994) The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 72, 273-284.
- Staley, K.J., Soldo, B.L., Proctor, W.R. (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 269, 977-981.
- Staley, K.J., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., Jentsch, T.J. (1996) Alteration of GABA_A receptor function following the gene transfer of the ClC-2 chloride channel. *Neuron* 17, 543-551.
- Steinmeyer, K., Ortland, C., Jentsch, T.J. (1991a) Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354, 301-304.
- Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jokusch, H., Gründer, S., Jentsch, T.J. (1991b) Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* 354, 304-308.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A., 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.
- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bösl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R., Jentsch, T.J. (2001) Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29, 185-196.
- Strange, K. (2002) Of mice and worms: novel insights into ClC-2 anion channel physiology. *News Physiol. Sci.* 17, 11-16.

- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., Numa, S. (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603.
- Tewari, K.P., Malinowska, D.H., Sherry, A.M., Cuppoletti, J. (2000) PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C40-C50.
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., Jentsch, T.J. (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57-60.
- Thompson, S.M., Gähwiler, B.H. (1989) Activity-dependent disinhibition. II. Effects of extracellular potassium, furosemide, and membrane potential of E_{Cl^-} in hippocampal CA3 neurons. *J. Neurophysiol.* 61, 512-523.
- Treiman, D.M. (2001) GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42, 8-12.
- Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y., Marumo, F. (1993) Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J. Biol. Chem.* 268, 3821-3824.
- Ueno, T., Okabe, A., Akaike, N., Fukuda, A., Nabekura, J. (2002) Diversity of neuron-specific K^+ -Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory postsynaptic potential depression in rat motoneurons. *J. Biol. Chem.* 277, 4945-4950.
- 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., Ballabio, A. (1994) A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels. *Hum. Mol. Genet.* 3, 547-552.
- Varela, D., Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Sepúlveda, F.V. (2002) Effect of an N-terminus deletion on voltage-dependent gating of the ClC-2 chloride channel. *J. Physiol.* 544, 363-372.
- Waguespack, S.G., Koller, D.L., White, K.E., Fishburn, T., Carn, G., Buckwalter, K.A., Johnson, M., Kocisko, M., Evans, W.E., Foroud, T., Econs, M.J. (2003) Chloride channel 7 (*CLCN7*) gene mutations and autosomal dominant osteopetrosis, type II. *J. Bone Miner Res.* 18, 1513-1518.
- Wallace, R.H., Marini, C., Petrou, S., Harkin, L.A., Bowser, D.N., Panchal, R.G., Williams, D.A., Sutherland, G.R., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F. (2001) Mutant GABA_A receptor γ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat. Genet.* 28, 49-52.

- Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E., McKinnon, D. (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890-1893.
- Wang, G.X., Hatton, W.J., Wang, G.L., Zhong, J., Yamboliev, I., Duan, D., Hume, J.R. (2003) Functional effects of novel anti-ClC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H1453-H1463.
- Warnstedt, M., Sun, C., Poser, B., Escriva, M.J., Tranebjærg, L., Torbergesen, T., van Ghelue, M., Fahlke, Ch. (2002) The myotonia congenita mutation A331T confers a novel hyperpolarization-activated gate to the muscle chloride channel ClC-1. *J. Neurosci.* 22, 7462-7470.
- Westbrook, G.L. (2000) Seizures and epilepsy. In: Kandel, E.R., Schwarz, J.H., Jessell, T.M. *Principles of neural science*. 4. Auflage. McGraw-Hill/Appleton & Lange. S. 910-935.
- Woodhull, A.M. (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61, 687-708.
- Wu, F.F., Ryan, A., Devaney, J., Warnstedt, M., Korade-Mirnic, Z., Poser, B., Escriva, M.J., Pegoraro, E., Yee, A.S., Felice, K.J., Giuliani, M.J., Mayer, R.F., Mongini, T., Palmucci, L., Marino, M., Rüdell, R., Hoffman, E.P., Fahlke, Ch. (2002) Novel *CLCN1* mutations with unique clinical and electrophysiological consequences. *Brain* 125, 2393-2407.
- Xiong, H., Li, C., Garami, E., Wang, Y., Ramjeesingh, M., Galley, K., Bear, C.E. (1999) ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J. Membrane Biol.* 167, 215-221.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T., Aldrich, R.W. (1990) Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250, 568-571.
- Zhang, J., George, A.L. Jr., Griggs, R.C., Fouad, G.T., Roberts, J., Kwiecinski, H., Connolly, A.M., Ptacek, L.J. (1996) Mutations in the human skeletal muscle chloride channel gene (*CLCN1*) associated with dominant and recessive myotonia congenita. *Neurology* 47, 993-998.
- Zhang, J., Campbell, R., Ting, A.Y., Tsien, R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Mol. Cell Biol.* 3, 906-918.
- Zhiqiang, Q., Wei, R.W., Mann, W., Hartzell, H.C. (2003) Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca²⁺-activated Cl⁻ currents. *J. Biol. Chem.* 278, 49563-49572.

