

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin

**Untersuchungen  
zur Struktur und Funktion von  
CIC-K und Barttin**

Institut für Molekulare Neuropathobiologie  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch)  
Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Dem Fachbereich Medizin der  
Universität Hamburg  
vorgelegt von

**Tim Marnitz**  
aus Hamburg

**Hamburg  
2005**

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 6.6.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. J. Schwarz

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Ionentransport durch biologische Membranen                | 1         |
| 1.2. Ionenkanäle   | 3         |
| 1.3. Chloridkanäle   | 4         |
| 1.3.1. Die Familie der spannungsgesteuerten Chloridkanäle      | 4         |
| 1.3.2. Die Struktur der ClC-Kanäle                             | 7         |
| 1.3.3. Die ClC-K-Kanäle und Barttin                            | 10        |
| 1.3.4. Das Bartter-Syndrom                                     | 15        |
| 1.4. Transport von Membranproteinen                            | 19        |
| 1.5. Sortierungssignale von Plasmamembranproteinen             | 19        |
| 1.5.1. Das YXX $\Phi$ -Motiv                                   | 21        |
| 1.5.2. Das [DE]XXXL[LI]-Motiv                                  | 22        |
| 1.5.3. PY-Motive   | 23        |
| <b>2. Aufgabenstellung</b>                                     | <b>26</b> |
| <b>3. Material</b>   | <b>27</b> |
| 3.1. Chemikalien und Enzyme                                    | 27        |
| 3.2. Filmmaterialien   | 27        |
| 3.3. Puffer, Lösungen und Medien                               | 28        |
| 3.4. Bakterienstämme   | 29        |
| 3.5. Plasmidvektoren   | 30        |
| 3.6. Antikörper  | 30        |
| <b>4. Methoden</b>   | <b>31</b> |
| 4.1. Mikrobiologische Methoden                                 | 31        |
| 4.1.1. Präparation elektrokompetenter Bakterien                | 31        |
| 4.1.2. Transformation von Bakterien                            | 31        |
| 4.1.3. Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien | 32        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2. Molekularbiologische Methoden   | 32        |
| 4.2.1. Präparation von Plasmid-DNA   | 32        |
| 4.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA aus 2 ml Kulturen («Miniprep»)                        | 32        |
| 4.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA aus 50 ml Kulturen («Midiprep»)                       | 32        |
| 4.2.2. Enzymatische DNA-Modifikation   | 32        |
| 4.2.2.1. DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen  | 32        |
| 4.2.2.2. Ligation von DNA-Fragmenten   | 33        |
| 4.2.3. RNA-Synthese durch in-vitro-Transkription   | 33        |
| 4.2.4. Agarosegelelektrophorese der Nukleinsäuren  | 34        |
| 4.2.5. Isolierung der DNA aus Agarosegelen   | 34        |
| 4.2.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren  | 34        |
| 4.2.7. Polymerasekettenreaktion  | 35        |
| 4.2.8. Rekombinante Polymerasekettenreaktion   | 36        |
| 4.2.9. Erzeugung von Fusionsproteinen  | 37        |
| 4.2.10. DNA-Sequenzierung  | 38        |
| 4.3. Biochemische Methoden   | 38        |
| 4.3.1. Proteinpräparation aus <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten                               | 38        |
| 4.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)                                       | 39        |
| 4.3.3. Western-Blot  | 39        |
| 4.4. Zellbiologische Methoden  | 40        |
| 4.4.1. Gewinnung von <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten  | 40        |
| 4.4.1.1. Präparation von <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten                                    | 40        |
| 4.4.1.2. Mikroinjektion der in-vitro-transkribierten RNA in <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten | 40        |
| 4.4.1.3. Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen                           | 41        |
| 4.5. Elektrophysiologische Methoden  | 42        |
| 4.5.1. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp   | 42        |
| 4.5.1.1. Messung der Ionenselektivität   | 43        |
| 4.5.1.2. Pulsprotokoll und elektrophysiologische Berechnungen                              | 44        |
| 4.6. Elektronische Datenverarbeitung   | 44        |
| <b>5. Ergebnisse</b>   | <b>46</b> |
| 5.1. Funktionsanalyse von CIC-K/Barttin-Konstrukten  | 47        |
| 5.1.1. Eigenschaften von CIC-Ka/Barttin  | 49        |
| 5.1.2. Eigenschaften der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte   | 50        |
| 5.1.3. Extrazelluläre HA-Epitop-Markierung von CIC-K1                                      | 52        |
| 5.1.4. Eigenschaften der CIC-K1/Barttin-Konstrukte   | 53        |
| 5.1.4.1. Elektrophysiologische Eigenschaften   | 54        |
| 5.1.4.2. Oberflächenexpression   | 56        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 5.1.4.3. Koexpression nicht Epitop-markierter Konstrukte mit HA-markiertem CIC-K1 | 57        |
| 5.1.4.4. Western-Blot-Analyse   | 59        |
| 5.2. <i>Untersuchungen zur Regulation von CIC-K/Barttin</i>                       | 61        |
| 5.2.1. Mutationsanalyse der Barttin-Region um Y98                                 | 61        |
| 5.2.2. Untersuchung verschiedener potentieller Ubiquitin-Ligasen (E3s)            | 63        |
| 5.2.3. Koexpression von CIC-Ka/Barttin mit der $\mu$ 2-Untereinheit von AP-2      | 66        |
| 5.2.4. Untersuchung weiterer Signalmotive von Barttin                             | 66        |
| <b>6. Diskussion</b>  | <b>69</b> |
| 6.1. <i>Untersuchungen an CIC-K/Barttin-Konstrukten</i>                           | 70        |
| 6.1.1. Messung der Oberflächenexpression  | 73        |
| 6.2. <i>Untersuchungen zur Regulation von CIC-K/Barttin</i>                       | 75        |
| 6.3. <i>Ausblick</i>  | 81        |
| <b>7. Zusammenfassung</b>   | <b>83</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis</b>  | <b>85</b> |
| <b>9. Anhang</b>  | <b>97</b> |
| 9.1. <i>Abkürzungen</i>   | 98        |
| 9.2. <i>Abbildungsverzeichnis</i>   | 100       |
| 9.3. <i>Curriculum vitae</i>  | 101       |
| 9.4. <i>Danksagung</i>  | 102       |
| 9.5. <i>Erklärung</i>   | 103       |

# 1. Einleitung

## 1.1. Ionentransport durch biologische Membranen

Alle Zellen sind von biologischen Membranen umgeben. Eukaryontische Zellen besitzen zusätzlich Bereiche im Inneren der Zelle, die durch Membranen begrenzt sind: die so genannten Kompartimente.

Die biologische Membran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht und eingelagerten Proteinen. Da eine reine Phospholipiddoppelschicht nur für lipophile Substanzen durchlässig ist und das Durchtreten von Ionen und hydrophilen Substanzen nahezu unmöglich macht, übernehmen eingelagerte Proteine den Transport von Ionen und hydrophilen Substanzen durch die Membran.

Durch die Arbeit der Zelle (aktiver Transport, Transport gegen einen Konzentrationsgradienten) und die selektiven Transportvorgänge der Membran kommt es zu einer asymmetrischen Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellularraum, wobei für die Summe der Ladungen auf beiden Seiten der Membran das Elektroneutralitätsprinzip gilt. Der wichtigste aktive Transporter und zugleich Generator der Konzentrationsgradienten ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die elektrogen drei Natriumionen aus der Zelle heraus- und zwei Kaliumionen in die Zelle hineinpumpt. Zur Gewährleistung der Elektroneutralität muss zusätzlich ein negativ geladenes Ion wie z.B. Chlorid die Zelle verlassen (Ladungsausgleich). Dadurch wird gleichzeitig der osmotische Druck der Zelle verringert (vier Ionen verlassen die Zelle, zwei Ionen werden in die Zelle aufgenommen).

Wenn für ein Ion im Intra- und Extrazellularraum unterschiedliche Konzentrationen vorliegen und die Plasmamembran für dieses Ion den selektiven Durchtritt erlaubt, wird es entlang seines Konzentrationsgradienten durch die Membran diffundieren («Diffusionsdruck») und dabei einen Ladungsgradienten aufbauen (elektrochemisches Potential). Der Netto-Ionenstrom kommt zum Erliegen, wenn die Anziehung des aufgebauten elektrischen Feldes den vom Konzentrationsgradienten erzeugten Diffusionsdruck kompensiert (Gleichgewichtspotential). Die entscheidenden Voraussetzungen für den Aufbau eines elektrochemischen Potentials sind

somit der Konzentrationsgradient und die selektive Permeabilität. Deshalb ändert sich das Potential einer Zelle sowohl bei Veränderung des Ionenkonzentrationsverhältnisses von Intra- zu Extrazellularraum als auch bei Veränderung der Ionenpermeabilitäten der Membran (z.B. Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen).

Mit Hilfe der Nernst-Gleichung kann das Gleichgewichtspotential für ein Ion bei bekannter Intra- und Extrazellularkonzentration berechnet werden. Da für die meisten ruhenden Säugetierzellen gilt, dass die Permeabilität der Plasmamembran für Kalium am größten ist (relativ viele offene Kaliumkanäle), wird das Ruhemembranpotential hauptsächlich durch das Gleichgewichtspotential von Kalium bestimmt und beträgt ca. -90 mV.

| Ion     | Konzentration extrazellulär (mM) | Konzentration intrazellulär (mM) | Gleichgewichtspotential (mV) |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Natrium | 135-145                          | 12                               | +66                          |
| Kalium  | 3,5-5                            | 140                              | -93                          |
| Kalzium | 2,25-2,52                        | $10^{-4}$                        | +135                         |
| Chlorid | 115                              | 2,5-50                           | -90 bis -30                  |
| pH      | 7,4                              | 7,1-7,2                          | -15                          |

**Tab. 1.1. Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale der physiologisch wichtigsten Ionen in der Säugertierzelle bzw. im menschlichen Blut**

Modifiziert nach Ashcroft [Ashcroft, 2000].

Die durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erzeugten Konzentrationsgradienten werden für andere sekundär aktive Transportprozesse genutzt. Beispielsweise wird die Chloridkonzentration durch  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter und die Kalziumkonzentration durch  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter beeinflusst. Hier wird der große elektrochemische Gradient einer Ionenart für den elektrochemisch ungünstigen Transport einer anderen genutzt.

Neben den primär aktiven Pumpen (ATPasen) und den sekundär aktiven Transportern gibt es weiterhin Proteine, die Moleküle passiv entlang ihres Konzentrationsgradienten durch die Membran schleusen. Hierzu gehören auf der einen Seite die Permeasen für Glucose und Aminosäuren und auf der anderen Seite die Kanäle, Proteinporen für den Transport von Wasser (Aquaporine) und Ionen (Ionenkanäle).

## 1.2. Ionenkanäle

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die einen hydrophilen Tunnel durch die Membran bilden. Diese Poren ermöglichen den passiven Ionentransport entlang eines Konzentrationsgradienten [Hille, 1992]. Der Kanal kann dabei für Anionen oder Kationen selektiv sein oder sogar hochspezifisch nur eine einzige Ionensorte passieren lassen (selektive Kalium-, Natrium-, Kalzium- und Chloridkanäle).

Das Öffnen oder Schließen eines Ionenkanals wird durch eine Konformationsänderung des Kanalproteins bzw. der Kanaluntereinheiten erreicht und kann durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor beispielsweise wird durch die extrazelluläre Bindung von Acetylcholin aktiviert und erlaubt dann den Durchtritt von Kationen (ligandengesteuerter Ionenkanal). Die Ionenkanalfunktion kann aber auch von der zytosolmatischen Seite aus durch intrazelluläre Botenstoffe wie ATP, cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  oder durch kovalente Modifikation (Phosphorylierung) moduliert werden. Wiederum andere Ionenkanalklassen werden durch Änderung des Zellvolumens oder der Temperatur (physikalische Stimuli) reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurden Kanäle untersucht, die sich in Abhängigkeit vom Membranpotential öffnen und schließen (spannungsgesteuerte Ionenkanäle).

Die Untersuchung von Ionenkanälen erfolgt sowohl biochemisch und molekularbiologisch als auch biophysikalisch, insbesondere mit elektrophysiologischen Methoden und mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse.

Grundlegende Arbeiten zur Struktur der Ionenkanäle erfolgten durch die Arbeitsgruppe um R. MacKinnon (Nobelpreis für Chemie 2003). Die Strukturaufklärung eines Kaliumkanals gelang ihr erstmals 1998 [Doyle et al., 1998]. Erst kürzlich wurde die Struktur der ersten bakteriellen ClC-Proteine röntgenkristallographisch aufgeklärt [Dutzler et al., 2002].

Mit der *Voltage-Clamp*-Technik ist es möglich, den Strom zu messen, der über die Plasmamembran einer Zelle fließt («*whole cell current*»). Die Grundlage dieser Methode schufen K. S. Cole, A. L. Hodgkin und G. Marmont [Cole, 1949] [Hodgkin et al., 1949] [Marmont, 1949] [Hodgkin und Huxley, 1952]. Sie wurde seitdem fortlaufend weiterentwickelt.

Die Entwicklung der *Patch-Clamp*-Technik durch E. Neher und B. Sakmann 1976 [Neher und Sakmann, 1976] ermöglichte erstmals die Messung von Einzelkanalströmen (Nobelpreis für Medizin 1991).

## 1.3. Chloridkanäle

Chlorid ist - vor Bikarbonat - das häufigste anorganische Anion in Organismen. Chloridleitende Ionenkanäle wurden in den meisten Zelltypen gefunden, wo sie ihre Funktion sowohl in der Plasmamembran als auch in den Membranen der intrazellulären Kompartimente ausüben können.

Plasmamembranständige Chloridkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Erregbarkeit von Muskel- und Nervenzellen, beim transepithelialen Transport sowie bei der Volumenregulation der Zelle.

Chloridkanäle intrazellulärer Membranen sind u. a. für den Ladungsausgleich bei der Ansäuerung durch die  $H^+$ -ATPase von Bedeutung.

Bisher wurden vor allem die folgenden drei Genfamilien mit Chloridkanalfunktion gut charakterisiert:

- Die ligandengesteuerten Chloridkanäle mit Funktionen als Glycin-Rezeptoren und  $\gamma$ -Aminobuttersäure(GABA)-Rezeptoren
- Der nukleotidabhängige CFTR (*C*ystic *F*ibrosis *T*ransmembrane *C*onductance *R*egulator)
- Die spannungsgesteuerten Chloridkanäle der CLC-Familie

Im Folgenden wird nur die Familie der spannungsgesteuerten Chloridkanäle besprochen und dabei besonders auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten ClC-K-Kanäle, die dieser Familie angehören, eingegangen.

### 1.3.1. Die Familie der spannungsgesteuerten Chloridkanäle

Im Jahre 1990 wurde ClC-0, das erste Mitglied der CLC-Familie, aus Gewebe des Rochens *Torpedo marmorata* durch Expressionsklonierung identifiziert [Jentsch et al., 1990]. ClC-Kanäle wurden sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten beschrieben [Maduke et al., 2000] [Jentsch et al., 2002].

Eine wesentliche Eigenschaft der ClC-Kanäle und damit auch ein Unterscheidungsmerkmal zu anderen Anionenkanälen ist, dass sie Chlorid besser leiten als Iodid [Jentsch et al., 1999] [Jentsch et al., 2002].

In Säugetieren wurden bislang 9 verschiedene CLC-Gene entdeckt, die aufgrund ihrer Homologie in drei Untergruppen unterteilt werden.

|  | <u>Expression</u> | <u>Funktion</u> | <u>Krankheit</u>   | <u>Mausmodell</u>   |   |
|--|-------------------|-----------------|--|---------------------|---|
|  | CIC-1             | Skelettmuskel   | Stabilisierung des Membranpotentials                               | Myotonia congenita  | Myotonia congenita                          |
|  | CIC-2             | ubiquitär       | transepithelialer Transport, pH-/Volumenregulation?                | ?                   | Degeneration: Retina und Testes             |
|  | CIC-Ka            | Niere, Innenohr | transepithelialer Cl-Transport                                     | ?                   | Nephrogener Diabetes insipidus              |
|  | CIC-Kb            | Niere, Innenohr | transepithelialer Cl-Transport                                     | Barter-Syndrom III  | ---   |
|  | CIC-3             | ubiquitär       | Azidifizierung synaptischer Vesikel                                | ?                   | Degeneration Retina/Hippocampus             |
|  | CIC-4             | ubiquitär       | ?  | ?                   | ?   |
|  | CIC-5             | Niere, Darm     | Azidifizierung von Endosomen                                       | Dent'sche Krankheit | Renaler Endozytose-defekt                   |
|  | CIC-6             | ubiquitär       | ?  | ?                   | ?   |
|  | CIC-7             | ubiquitär       | Azidifizierung von Lysosomen / Resorption der Osteoclasten-Lakunen | Osteopetrose        | Osteopetrose, Retina- und Neurodegeneration |

**Tab. 1.2. Dendrogramm der Mitglieder der CLC-Familie in Säugetieren**

Die drei Untergruppen zeigen eine Sequenzhomologie von weniger als 30%. Expressionsmuster, bekannte Funktionen, humane Erbkrankheiten und Phänotyp des Knock-out-Mausmodells sind angegeben. Modifiziert nach Jentsch [Jentsch et al., 2002].

Die Mitglieder der ersten Untergruppe (CIC-1, CIC-2 und die beiden CIC-K-Kanäle) sind hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert.

**CIC-1** wurde als erstes Säugetiermitglied der CLC-Familie aus dem Skelettmuskel isoliert [Steinmeyer et al., 1991]. Sein Chloridstrom stabilisiert das Membranpotential und hilft bei der Repolarisation der Skelettmuskelzelle. Der Anteil an der Gesamtmembranleitfähigkeit der ruhenden Muskelzelle beträgt 70-80% [Jentsch et al., 2002]. In den meisten anderen ruhenden Säugetierzellen dominiert dagegen, wie bereits erwähnt, die Kaliumleitfähigkeit. Deletionen und Mutationen im CIC-1-Gen (*CLCN1*) führen je nach Lokalisation der Mutation im Protein zur autosomal dominant vererbaren Myotonie Thomsen oder zur autosomal rezessiv vererbaren Myotonie Becker [Koch et al., 1992].

**CIC-2** ist ein ubiquitär exprimierter Chloridkanal [Thiemann et al., 1992]. Er wird durch Hyperpolarisation, Zellschwellung und extrazelluläre Ansäuerung aktiviert [Thiemann et al.,

1992] [Gründer et al., 1992] [Jordt und Jentsch, 1997]. Im Knock-out-Mausmodell findet man eine Degeneration der Retina und der Testes [Bösl et al., 2001]. Kürzlich wurde gezeigt, dass CIC-2 in mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten aktiviert wird und zu der veränderten Permeabilität der Erythrozytenmembran beiträgt. Die Entwicklung der Plasmodien scheint aber nicht von CIC-2 abhängig zu sein, da die CIC-2 defiziente Maus ebenso von *Plasmodium falciparum* befallen wird und nach Infektion auch keinen Unterschied in der Mortalität gegenüber WT-Mäusen zeigt [Huber et al., 2004].

**CIC-Ka und CIC-Kb** (von engl. *kidney* wegen der Expression in der Niere) bzw. die korrespondierenden Chloridkanäle der Ratte/Maus – benannt als CIC-K1 und CIC-K2 - nehmen eine Sonderstellung in dieser CIC-Untergruppe ein. Sie benötigen die  $\beta$ -Untereinheit Barttin für eine physiologisch funktionelle Expression. Ihre Besprechung erfolgt weiter unten.

Die Mitglieder der zweiten und dritten Untergruppe (CIC-3 bis CIC-7) sind vornehmlich intrazellulär lokalisiert.

**CIC-3** bildet zusammen mit CIC-4 und CIC-5 die zweite Untergruppe. Ihre Mitglieder sind zu 80% homolog. Das CIC-3-Gen wurde zuerst von Kawasaki et al. [Kawasaki et al., 1994] und Borsani et al. [Borsani et al., 1995] kloniert. CIC-3 wird in fast allen Geweben exprimiert, besonders im Gehirn. Es konnte gezeigt werden, dass CIC-3 in intrazellulären Vesikeln vorkommt und eine Rolle bei der Ansäuerung synaptischer Vesikel spielt. Im Knock-out-Mausmodell wurde eine langsamere Ansäuerung synaptischer Vesikel im Vergleich zur Wildtypmaus festgestellt, was vermuten lässt, dass CIC-3 für den Ladungsausgleich der  $H^+$ -ATPase der Vesikel verantwortlich ist. Die *Clcn3*<sup>-/-</sup> Maus zeigte eine Degeneration des Hippocampus und der Retina [Stobrawa et al., 2001].

**CIC-4** scheint ähnlich wie CIC-3 und CIC-5 exprimiert zu sein. Über seine Funktion ist allerdings sehr wenig bekannt. Eine Besonderheit zeigt das CIC-4-Gen bei der chromosomalen Lokalisation in der Maus. In *Mus spretus* befindet es sich auf dem X-Chromosom, bei dem Laborstamm C57BL/6J dagegen auf Chromosom 7. Die Erzeugung einer Knock-out-Maus durch einfache Kreuzung der beiden Stämme ergab jedoch keinen Phänotyp abgesehen von einer bei derartigen F1-Hybriden häufigen Infertilität [Rugarli et al., 1995]. Möglicherweise trägt CIC-4 wie CIC-5 zur endosomalen Ansäuerung bei [Mohammad-Panah, 2003].

**CIC-5** wird überwiegend in der Niere exprimiert. Dieser Kanal wurde als potentieller Genort für die Dent'sche Krankheit kloniert [Fischer et al., 1994]. Kurz darauf wurden bei Patienten mit Dent'scher Krankheit Mutationen im CIC-5-Gen gefunden [Lloyd, 1996]. Patienten mit dieser

Erkrankung entwickeln eine Kalzi- und Proteinurie mit gleichzeitiger Bildung von Nierensteinen. Es konnte gezeigt werden, dass bei CIC-5 defizienten Mäusen die Endozytose und die Ansäuerung der frühen Endosomen im proximalen Tubulus gestört sind. Dieses führt bei der Maus zum renaltubulären Verlust von Proteinen geringer Größe. Die verringerte Endozytose von Parathormon resultiert in einer höheren Konzentration weiter distal mit verstärkter Bindung an apikale Parathormonrezeptoren. Daraufhin werden in den distalen Tubulusabschnitten vermehrt Natriumphosphat-Kotransporter endozytiert, was eine Phosphaturie zur Folge hat [Piwon et al., 2000].

**CIC-6 und CIC-7** gehören einer eigenen Untergruppe der CIC-Familie an. Sie zeigen weniger als 50% Homologie. Beide werden ubiquitär exprimiert [Brandt und Jentsch, 1995].

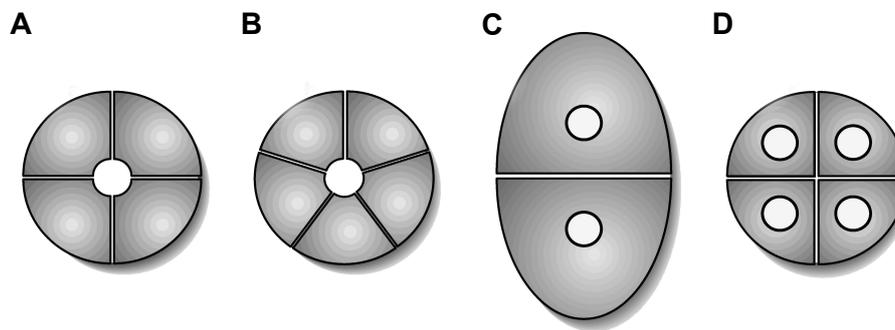
Über die Funktion von CIC-6 ist bisher wenig bekannt.

Die Funktion von CIC-7 konnte anhand der CIC-7-defizienten Maus aufgeklärt werden. Diese Mäuse leiden an Osteopetrose und Retinadegeneration [Kornak et al., 2001]. Die Osteopetrose beruht auf einer Funktionsstörung der Osteoklasten, die für den Knochenabbau zuständig sind. Die Resorptionslakunen der Osteoklasten werden normalerweise von einer  $H^+$ -ATPase angesäuert, die mit CIC-7 kolokalisiert ist. CIC-7 bewerkstelligt hier den Ladungsausgleich für diese  $H^+$ -ATPase. So führen sowohl Defekte der  $H^+$ -ATPase als auch von CIC-7 zu einer Störung der Ansäuerung dieser Resorptionslakunen und somit zum Krankheitsbild der Osteopetrose [Frattoni et al., 2000] [Kornak et al., 2000] [Kornak et al., 2001].

Aktuelle funktionelle Studien am bakteriellen «Chloridkanal» ecCIC zeigen, dass dieser nicht nur Chlorid sondern gleichzeitig auch Protonen transportiert. ecCIC wird hier als sekundär aktiver Antiporter, der ein Proton für zwei Chloridionen austauscht, beschrieben [Accardi und Miller, 2004]. Auf der Basis dieser Untersuchung wurde jetzt gezeigt, dass es sich bei den endosomalen «Chloridkanälen» CIC-4 und CIC-5 ebenfalls um  $H^+/Cl^-$ -Antiporter handelt [Scheel et al., 2005] [Picollo und Pusch, 2005].

### 1.3.2. Die Struktur der CIC-Kanäle

Die Struktur von Membrankanälen ist vielfältig. Die meisten Kanäle sind aus mehreren, einzelnen Polypeptidketten (Untereinheiten) zusammengesetzt. Die Poren der Kanäle können dabei entweder von einer Untereinheit allein oder von mehreren Untereinheiten gemeinsam gebildet werden.

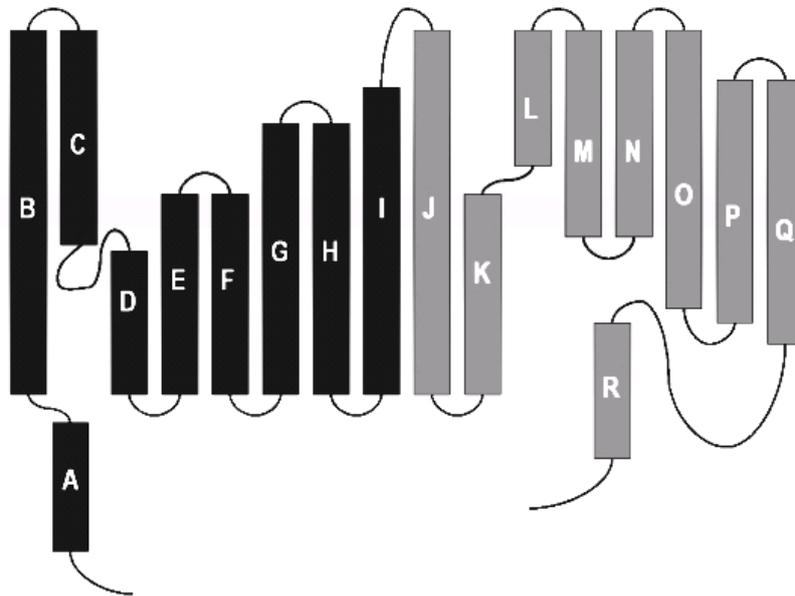


**Abb. 1.1. Möglichkeiten der Porenformation von Membrankanälen**

A. Tetramere Kaliumkanäle bilden eine einzige Pore aus vier identischen bzw. strukturell sehr ähnlichen Untereinheiten. B. Ligandengesteuerte Ionenkanäle wie beispielsweise der nikotinische Acetylcholinrezeptor und der  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor bilden die Pore aus fünf Untereinheiten. C. Chloridkanäle der CLC-Familie sind Dimere bestehend aus zwei identischen Untereinheiten, wobei jede Untereinheit eine eigene Pore bildet. D. Aquaporine besitzen vier Untereinheiten mit jeweils einer Pore. [Jentsch, 2002]

Die Chloridkanäle der CLC-Familie bestehen aus zwei identischen Untereinheiten (Dimer), wobei jede Untereinheit ihre eigene Pore bildet. Eine derartige Struktur von spannungsabhängigen Chloridkanälen wurde bereits in den 1980er Jahren nach Patch-Clamp-Untersuchungen an einem Chloridkanal von *Torpedo electroplax* vermutet [Miller, 1982] [Miller und White, 1984]. Diese Vermutung konnte mit Mutagenese-Experimenten [Ludewig et al., 1996] [Middleton et al., 1996] und anhand von gemischten Dimeren gestützt werden [Weinreich und Jentsch, 2001]. Erst kürzlich wurde schließlich die dreidimensionale Kristallstruktur der homologen ClC-Kanäle aus *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* beschrieben [Dutzler et al., 2002].

Aufgrund von aktuellen Forschungsergebnissen nehmen die «Chloridkanäle» ecClC, ClC-4 und ClC-5 jetzt eine Sonderrolle ein (s.o.) [Accardi und Miller, 2004] [Scheel et al., 2005] [Picollo und Pusch, 2005], da sie neben Chlorid auch Protonen transportieren ( $H^+/Cl^-$ -Antiporter).



**Abb. 1.2. Topologiemodell einer bakteriellen CIC-Untereinheit nach Dutzler et al., 2002**

Die  $\alpha$ -Helices sind mit A bis R bezeichnet. Die meisten  $\alpha$ -Helices durchspannen die Membran nicht vollständig. Die Helix A liegt nicht in der Membran, Helix R teilweise. Die unterschiedliche Graustufung zeigt die Symmetrie innerhalb der Untereinheit («antiparallele Symmetrie») [Dutzler et al., 2002].

Sowohl der C- als auch der N-Terminus der CLC-Kanäle liegen intrazellulär [Gründer et al., 1992] [Schmidt-Rose und Jentsch, 1997b].

Das auf der Röntgenstrukturanalyse basierende Topologiemodell der bakteriellen CIC-Untereinheit zeigt 17 membranständige Domänen (Helix A liegt im Zytosol), von denen viele die Phospholipiddoppelschicht nicht vollständig durchdringen. Die Transmembrandomänen stehen dabei auch nicht senkrecht zur Membranoberfläche, sondern sind mehr oder weniger stark geneigt (siehe auch Abb. 6.1.). Zudem zeigen die Domänen des Monomers innerhalb der Membranebene eine Strukturwiederholung, wobei sich die N- und C-terminalen Hälften - B bis I und J bis Q - in entgegengesetzter Orientierung befinden. Zwei Untereinheiten bilden als Dimer eine funktionelle Kanaleinheit [Dutzler et al., 2002].

Der C-terminale Abschnitt von eukaryontischen CLC-Kanälen enthält zusätzlich zwei CBS-Domänen (benannt nach der Cystathionin-Beta-Synthase, das erste Protein, in dem diese Domäne beschrieben wurde). Die genaue Funktion der CBS-Domänen ist noch nicht endgültig geklärt. Mutationen von konservierten Aminosäureresten in diesen Domänen verursachen so unterschiedliche Krankheiten wie beispielsweise ein familiäres *Wolff-Parkinson-White*-Syndrom (Mutation in der  $\gamma$ -2 Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase) und *Retinopathia pigmentosa* (Mutation in der IMP-Dehydrogenase-1) [Gollob et al., 2001a] [Gollob et al., 2001b] [Blair et al., 2001] [Bowne et al., 2002] [Kennan et al., 2002]. Die AMP-aktivierte Proteinkinase ist ein zellulärer Energiesensor, der durch AMP aktiviert wird und

durch hohe Konzentrationen von ATP inhibiert wird [Hardie und Hawley, 2001]. Es wurde gezeigt, dass die CBS-Domänen der AMP-aktivierten Proteinkinase, der IMP-Dehydrogenase-2, der Cystathionin-Beta-Synthase ebenso wie die CBS-Domänen von CIC-2 AMP, ATP und S-Adenosyl-Methionin binden und dass krankheitsursachende Mutationen diese Bindung verhindern. Folglich scheinen die CBS-Domänen als Sensoren des zellulären Energiestatus zu dienen [Scott et al., 2004]. Zwischen den Mitgliedern der CLC-Familie sind die CBS-Domänen hochkonserviert und scheinen eine Rolle beim Öffnen und Schließen der Kanäle zu spielen - die Mutation einiger Aminosäurereste in den CBS-Domänen von CIC-1 verändert das Öffnen und Schließen des Kanals [Estevez et al., 2004].

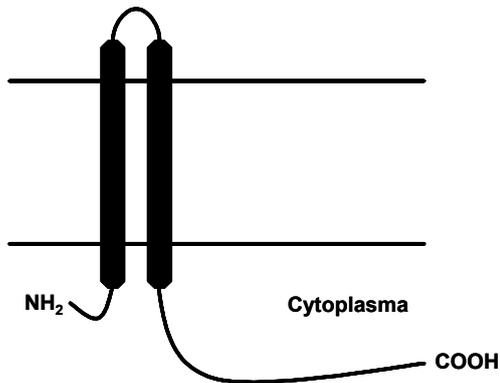
### 1.3.3. Die CIC-K-Kanäle und Barttin

Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte und der Maus wurden jeweils zwei zueinander hochhomologe CIC-K-Kanäle identifiziert, die spezifisch in der Niere und im Innenohr exprimiert werden. Die Homologie ist dabei zwischen den beiden CIC-K-Kanälen derselben Spezies größer als zwischen den orthologen CIC-K-Kanälen der unterschiedlichen Spezies. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Kanäle beim Menschen mit CIC-Ka und CIC-Kb benannt (zueinander 90% Homologie), bei der Ratte und der Maus mit CIC-K1 und CIC-K2 (zueinander 80% Homologie) [Adachi et al., 1994] [Kieferle et al., 1994]. Die humanen Gene liegen dabei auf Chromosom 1p36 dicht nebeneinander, was eine Duplikation wahrscheinlich macht [Brandt und Jentsch, 1995] [Simon et al., 1997].

Die Funktion von CIC-Ka beim Menschen entspricht weitgehend der Funktion von CIC-K1 bei der Ratte/Maus. Das gleiche gilt für CIC-Kb und CIC-K2.

Immunhistochemische Untersuchungen, der menschliche Phänotyp von Mutationen im Gen für CIC-Kb (Bartter-Syndrom Typ III, s.u.) sowie der Phänotyp von CIC-K1 defizienten Mäusen (*Diabetes insipidus*) weisen darauf hin, dass CIC-Kb-Kanäle beim Menschen im dicken aufsteigenden Schenkel und CIC-K1-Kanäle bei Nagern etwas weiter proximal im dünnen aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife arbeiten [Uchida et al., 1995] [Simon et al., 1997] [Vandewalle et al., 1997] [Matsumura et al., 1999] [Kobayashi et al., 2001]. Interessanterweise konnten bei heterologer Expression in *Xenopus-laevis*-Oozyten (Eizellen von afrikanischen Krallenfröschen) weder für CIC-Ka und CIC-Kb noch für CIC-K2 eindeutige Ionenleitfähigkeiten nachgewiesen werden [Kieferle et al., 1994] [Waldegger und Jentsch, 2000]. Nur CIC-K1 zeigte allein eine geringe, aber signifikante Leitfähigkeit [Uchida et al., 1993 und 1994] [Waldegger und Jentsch, 2000].

Durch die Entdeckung des Gens BSND wurde das 320 Aminosäuren umfassende Protein Barttin identifiziert. Mutationen in BSND führen zum Bartter-Syndrom Typ IV (s.u.) [Birkenhäger et al., 2001].

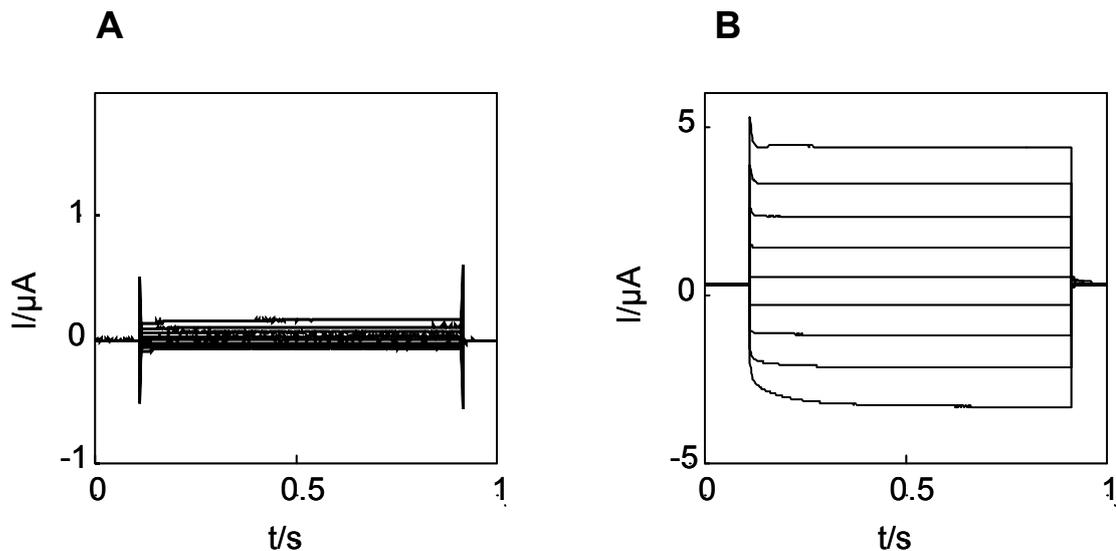


**Abb. 1.3. Topologie des Barttins**

Die Abbildung zeigt die mutmaßliche Topologie von Barttin. Barttin besitzt demnach zwei Transmembrandomänen, die über eine kurze Aminosäuresequenz extrazellulär verbunden sind. Sowohl der mit acht Aminosäuren kurze N- als auch der mit 260 Aminosäuren relativ lange C-terminale Abschnitt liegen intrazellulär. [Birkenhäger et al., 2001] [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002].

Barttin besitzt wahrscheinlich zwei membrandurchspannende  $\alpha$ -Helices. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär [Birkenhäger et al., 2001] [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002]. Der C-terminale Bereich zeigt dabei zwischen den Spezies eine nur geringe Konservierung. Bis heute beschriebene Mutationen im BSND-Gen liegen alle im Bereich der Transmembrandomänen [Birkenhäger et al., 2001].

Die Aufklärung der Funktion von Barttin gelang Estevez et al. 2001. Heterologe Koexpression von Barttin mit ClC-Ka oder mit ClC-Kb in *Xenopus-laevis*-Oozyten resultierte in Chloridleitfähigkeiten. Dieser Effekt war spezifisch für die ClC-K-Kanäle; ClC-1-, ClC-2- und ClC-5-Ströme wurden durch Barttin nicht verändert. Zudem zeigte der beobachtete Ionenkanalstrom die ClC-typische Eigenschaft, dass Iodidionen schlechter geleitet werden als Chlorid.



#### Abb. 1.4. CIC-Ka/Barttin-Voltage-Clamp-Messung

A. Die Expression von CIC-Ka allein ergibt keinen signifikanten Strom. B. Die Koexpression von CIC-Ka mit Barttin resultiert in einem Chloridstrom. Der CIC-Ka/Barttin-Strom zeigt hier seine typische Aktivierung bei negativen Membranpotentialen sowie die geringe Deaktivierung bei positiven Membranpotentialen [Estevez et al., 2001].

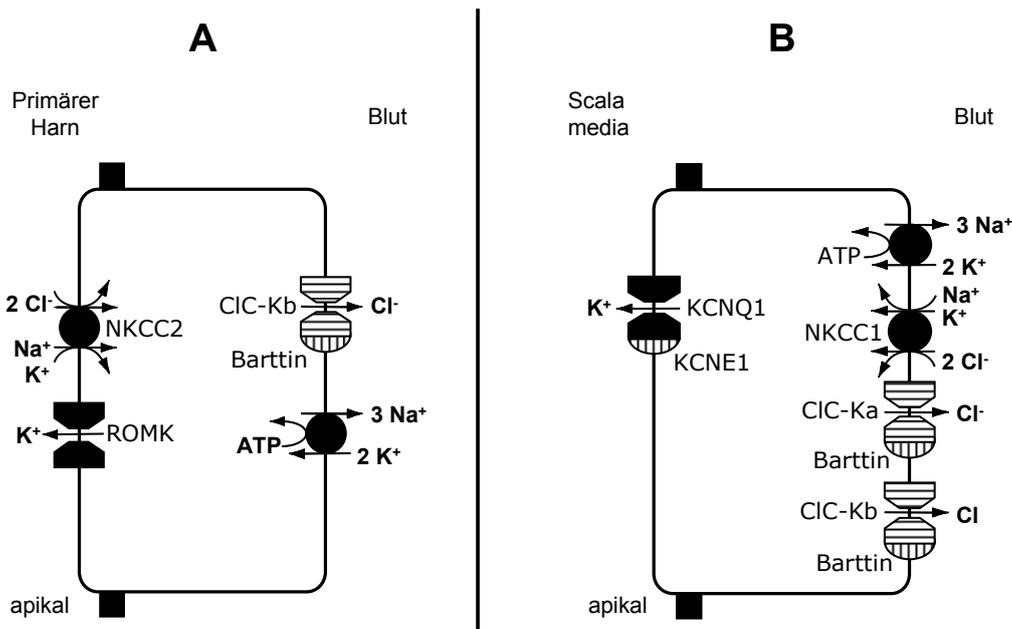
Estevez konnte nachweisen, dass Barttin die Oberflächenexpression von CIC-K erhöht, wobei die Barttin-Mutation Y98A die Oberflächenexpression und den Strom noch mehr steigerte.

Möglicherweise - so wird von Estevez et al. spekuliert - ist der mutierte Tyrosinrest Bestandteil eines so genannten PY-Motivs. Diese Motive interagieren mit den WW-Domänen von Ubiquitinligasen (s.u.). Eine inaktivierende Mutation dieses Motivs hätte demnach eine verringerte Ubiquitinierung und eine geringere Internalisierung des CIC-K/Barttin-Komplex' zur Folge, was zu einem größeren Strom führen würde. Ähnliche Beobachtungen wurden beim epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) und bei CIC-5 gemacht (s.u.) [Staub et al., 1996] [Schild et al., 1996] [Staub et al., 1997] [Schwake et al., 2001].

Waldegger et al. bestätigten die erhöhte CIC-K-Oberflächenexpression durch Barttin und fanden einen Unterschied in den Stromeigenschaften von CIC-K1 und CIC-K1/Barttin. Die Aktivierung von CIC-K1 durch Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration (Kalziumsensitivität) wird durch Barttin aufgehoben; sie wird also beim CIC-K1/Barttin-Komplex nicht beobachtet [Waldegger et al., 2002]. Möglicherweise nimmt Barttin also auch direkt Einfluß auf die Kanaleigenschaften und nicht nur auf die Oberflächenexpression. Da CIC-K allerdings wahrscheinlich mit Barttin im Komplex vorliegt, dürfte eine Kalziumsensitivität von untergeordneter Bedeutung sein.

*In-situ*-Hybridisierungs-Untersuchungen zeigten eine Barttinexpression im Tubulusepithel der Niere und in der *Stria vascularis* des Innenohrs [Birkenhäger et al., 2001]. Wenn Barttin als  $\beta$ -Untereinheit der CIC-K-Kanäle fungiert, müsste Barttin mit ihnen kolokalisieren. Dieses

konnte ebenfalls von Estevez et al. im Innenohr der Maus gezeigt werden. Mit spezifischen Antikörpern konnten CIC-K und Barttin basolateral in den Tubulusepithelien der Niere und ebenfalls basolateral in den Marginalzellen der *Stria vascularis* im Innenohr nachgewiesen werden [Estevez et al., 2001].



**Abb. 1.5. Modell zur Funktion von CIC-K/Barttin**

A. In der Niere ermöglicht der Komplex aus CIC-Kb/Barttin die Chloridreabsorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. B. In der *Stria vascularis* des Innenohrs sind die Komplexe aus CIC-Ka bzw. CIC-Kb und Barttin parallel geschaltet. Sie sind wie KCNQ1 und KCNE1 von entscheidender Bedeutung bei der K<sup>+</sup>-Sekretion in die *Scala media*. Modifiziert nach Estevez et al. [Estevez et al., 2001].

**In der Niere** findet sich der Komplex aus CIC-K1 (CIC-Ka) und Barttin besonders im dünnen aufsteigenden Schenkel, CIC-K2 (CIC-Kb) und Barttin dagegen hauptsächlich im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife und weiter distal. Beide Komplexe liegen in der basolateralen Membran.

Im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife wird NaCl apikal mittels des Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporters NKCC2 in die Zelle aufgenommen. Kalium rezirkuliert in Richtung Tubuluslumen durch den Kaliumkanal ROMK (Renal-Outer-Medulla-K<sup>+</sup>-Kanal). Das aufgenommene Chlorid verlässt die Zelle über CIC-Kb/Barttin, während die Natriumionen über die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase oder andere Transporter in Richtung Blut geleitet werden. CIC-Kb/Barttin spielt so eine entscheidende Rolle bei der Chloridreabsorption in der Niere [Estevez et al., 2001].

**Im Innenohr** werden CIC-Ka und CIC-Kb sowie Barttin basolateral in den Marginalzellen der *Stria vascularis* exprimiert. Hier sind also beide Komplexe gemeinsam lokalisiert. Die *Stria vascularis* erzeugt die hohe Kaliumionenkonzentration in der *Scala media* des Innenohrs, die für die Funktion der inneren Haarzellen und damit für den Hörvorgang essentiell ist. Für die Kaliumionensekretion durch den Kanalkomplex KCNQ1/KCNE1 muss eine große Menge an Kaliumionen basolateral in die Marginalzelle aufgenommen werden. Das geschieht mittels des Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporters NKCC1, wobei die Chloridionen durch die beiden CIC-K/Barttin-Komplexe rezirkulieren. Die Komplexe CIC-K/Barttin spielen deswegen ebenso wie der Komplex KCNQ1/KCNE1 und der NKCC1 eine entscheidende Rolle bei der Kaliumsekretion im Innenohr und damit für den Hörvorgang [Estevez et al., 2001].

Kürzlich wurde eine häufig vorkommende Sequenzvariante im CIC-Kb-Gen entdeckt (20% der untersuchten Population trugen die Mutation), die zur CIC-Kb-Variation T481S führt und nach heterologer Koexpression mit Barttin in *Xenopus-laevis*-Oozyten gegenüber dem Wildtyp einen wesentlich höheren Strom ergibt [Jeck et al., 2004a]. Die Einführung der entsprechenden Mutation in CIC-Ka und CIC-K1 führte ebenso zu einer Aktivierung dieser CIC-K/Barttin-Komplexe. Es wurde dabei keine erhöhte Oberflächenexpression festgestellt [Jeck et al., 2004a]. Untersuchungen an Personen, die ein Allel tragen, das für diesen T481S-Polymorphismus kodiert, ergaben, dass sie einen signifikant höheren Blutdruck (systolisch und diastolisch) bei höherer Prävalenz eines Bluthochdrucks (>140/90 mmHG) aufwiesen [Jeck et al., 2004b]. Die Patienten zeigten außerdem höhere Plasmaspiegel für Na<sup>+</sup> bei verminderter glomerulärer Filtrationsrate [Jeck et al., 2004b]. Zwei daraufhin durchgeführte Studien an größeren Populationen in Japan und Australien konnten die Assoziation dieses T481S-Polymorphismus' mit arterieller Hypertension allerdings nicht reproduzieren [Kokubo et al., 2005] [Speirs et al., 2005].

Die Tatsache, dass die CIC-K-Kanäle entscheidend an der Chloridreabsorption in der Niere beteiligt sind, d.h. Einfluss auf den Salztransport in der Niere nehmen und Mutationen außerdem möglicherweise für den «essentiellen» Hypertonus prädisponieren, macht sie zu interessanten Zielen für neue Diuretika. Die Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften der CIC-K-Kanäle hat erste kanalblockierende Substanzen hervorgebracht [Liantonio et al., 2004] [Picollo et al., 2004].

Veränderungen in den Genen, die für Ionenkanalkomplexe ( $\alpha$ -Untereinheiten, regulatorische  $\beta$ -Untereinheiten) kodieren, sind oft der Grund für Funktionsstörungen der Kanäle und können sich dann auch als Krankheit äußern. Auf die humane Erbkrankheit, die in Zusammenhang mit CIC-K und Barttin steht, soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### 1.3.4. Das Bartter-Syndrom

Das Bartter-Syndrom (BS) umfasst eine Gruppe von seltenen, autosomal-rezessiv vererbaren Krankheiten. Die typischen Befunde bei Patienten mit dieser Erkrankung sind renaler Salzverlust und hypokaliämische metabolische Alkalose bei erhöhten Renin- und Aldosteronspiegeln und Steigerung der Prostaglandinsynthese. Der Blutdruck ist normal oder erniedrigt.

Die Ausprägung der Krankheitszeichen ist dabei durchaus variabel [Bettinelli et al., 2000]. Viele Patienten mit BS haben eine erhöhte Kalziumausscheidung über die Niere und entwickeln zum Teil im Verlauf eine sekundäre Nephrokalzinose. Sekundär sind ebenfalls Krämpfe und Muskelschwäche (Hypokaliämie) von Bedeutung. [Asplin und Coe, 2001] [Herbert, 2003].

**Die klinische, phänotypische Einteilung des BS** unterscheidet das antenatale BS vom klassischen (adulten) BS sowie vom Gitelman-Syndrom.

**Das Gitelman-Syndrom** («Gitelman-Variante des BS») steht als ein eigenes Krankheitsbild neben dem BS – mit den z.T. unterschiedlichen Befunden Hypokaliämie, Hypokalzurie, Hypomagnesiämie mit Hypermagnesiurie [Gitelman et al., 1966]. Als eine Ursache für das Gitelman-Syndrom wurde der Defekt des thiazid-sensitiven Natrium-Chlorid-Cotransporters im distalen Konvolut der Niere ausgemacht [Simon et al., 1996a]. Das Gitelman-Syndrom tritt im Jugend- und Erwachsenenalter auf und hat im Allgemeinen einen deutlich milderen Verlauf als das BS. Die «Leitsymptome» sind Müdigkeit und Muskelschwäche [Asplin und Coe, 2001].

**Das antenatale BS** zeichnet sich durch ein Polyhydramnion in der Schwangerschaft und teils vorzeitige Geburt aus [Asplin und Coe, 2001]. Man findet eine schwere Polyurie und stark erhöhte Prostaglandin-E-Spiegel sowohl im Blut als auch im Urin, weswegen das antenatale BS auch als Hyperprostaglandin-E-Syndrom bezeichnet wird [Seybert et al., 1985] [Herbert, 2003]. In der Kindheit treten häufig Fieber und Dehydratation auf, Gedeihstörungen kommen vor. Eine sekundäre Nephrokalzinose ist häufig. Betroffene Kinder zeigen einen charakteristischen Gesichtsausdruck mit verschiedenen Dysmorphiezeichen [Asplin und Coe, 2001]. Dem hohen Prostaglandin-E-Spiegel kann durch Behandlung mit dem nicht-selektiven Cyclooxygenasehemmer Indomethacin begegnet werden, was sich positiv auf die Entwicklung des Kindes auswirkt und die Salz- und Volumensubstitution erleichtert [Herbert, 2003].

**Das klassische BS** wird normalerweise schon in der Kindheit diagnostiziert. Die Hypokaliämie ist Ursache für Krämpfe und allgemeine Schwäche. Der vermehrte Salzverlust über die Nieren führt bei diesen Patienten gleichzeitig zu Poly- und Nykturie.

|                  | Antenatales BS | Klassisches BS | Gitelman-S. |
|------------------|----------------|----------------|-------------|
| Polyhydramnion   | +              | -              | -           |
| Gedeihstörung    | +              | -              | -           |
| Wachstumsstörung | +              | -              | -           |
| Polyurie         | +              | +              | -           |
| Polydipsie       | +              | +              | -           |

**Tab. 1.3. Klinische Differenzen bei Bartter- und Gitelman-Syndrom**

Modifiziert nach Kurtz [Kurtz, 1998].

**Die Behandlung des BS** besteht in enteraler Zufuhr von Natrium und Kalium. Der Kaliumersatz muss, wenn nötig, auch intravenös erfolgen (Gefahr der Hypokaliämie). Spironolacton reduziert als Aldosteron-Antagonist den Kaliumverlust über die Niere. ACE-Hemmer können nützlich sein, um das aktivierte Renin-Angiotensin-System zu antagonisieren. Cyclooxygenasehemmer (Prostaglandinsynthesehemmer) sind sowohl beim antenatalen als auch beim klassischen BS eine Therapieoption. Sie zeigen sich jedoch bei Patienten mit Gitelman-Syndrom als unwirksam. Diese benötigen vor allem Magnesium. [Asplin und Coe, 2001] [Herbert, 2003].

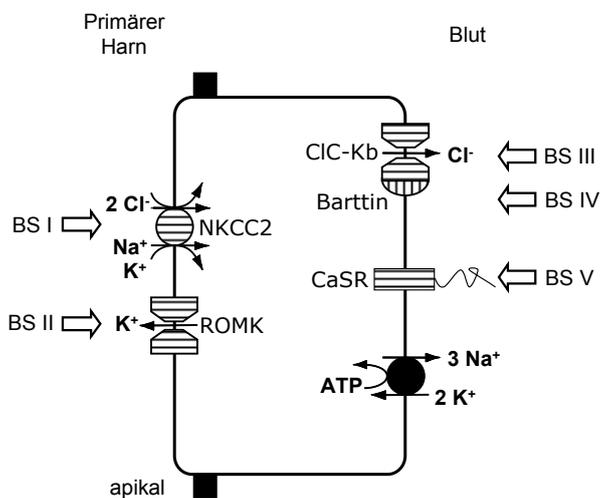
Die früher vorgenommene strikte Zuordnung von Phänotyp zu Genotyp – so wurden Mutationen in den Genen für NKCC2 und ROMK mit dem antenatalen BS in Verbindung gebracht und Mutationen in CIC-Kb mit dem klassischen BS – hat sich als nicht zutreffend erwiesen. So tritt z.B. bei Patienten mit Mutationen in CIC-Kb ein «gemischter» Bartter- und Gitelman-Phänotyp auf [Jeck et al., 2000] [Zelikovic et al., 2003]. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die Einteilung nach den betroffenen Genen favorisiert und im Folgenden kurz beschrieben.

**Die genotypische Einteilung des BS** unterscheidet zurzeit fünf Typen aufgrund von entdeckten Mutationen in fünf verschiedenen Genen (BS Typ I-V).

Alle fünf Gene werden im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife exprimiert. Sie kodieren für Membranproteine, die den transepithelialen Salztransport direkt oder seine Regulation in diesem Abschnitt des Nephrons vermitteln, was die ähnliche Pathophysiologie der BS-Typen erklärt [Herbert, 2003].

Im Folgenden sind die Genprodukte mit dem bei Funktionsverlust dazugehörigen Typ des BS angegeben:

- Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter NKCC2: BS Typ I
- Kaliumkanal ROMK: BS Typ II
- Chloridkanal ClC-Kb: BS Typ III
- Barttin: BS Typ IV
- Kalziumsensor CaSR: BS Typ V



**Abb. 1.6. Modell der beim Bartter-Syndrom betroffenen Genprodukte in der Tubuluszelle**

Die Abbildung zeigt die am Salztransport und seiner Regulation beteiligten Membranproteine mit dem dazugehörigen Typ des Bartter-Syndroms bei Funktionsstörung. Modifiziert nach Estevez et al., 2001.

**Das BS Typ I** wird durch Mutationen im furosemidsensitiven Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter NKCC2 hervorgerufen [Simon und Lifton, 1998]. NKCC2 ist in der apikalen Membran im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife lokalisiert. Die NKCC2 defiziente Maus erwies sich als Mausmodell für das BS [Takahashi et al., 2000]. Die Mäuse starben wenige Tage nach der Geburt aufgrund der starken Polyurie. Durch Indomethacingabe konnte eine Überlebensrate von 10% erreicht werden. Diese überlebenden Tiere zeigten ein dem humanen BS sehr ähnliches Krankheitsbild.

**Das BS Typ II** entsteht bei Funktionsverlust des apikalen einwärts rektifizierenden Kaliumkanals ROMK. Dieser bewerkstelligt – wie auch schon weiter oben beschrieben – das Kalium-Recycling für NKCC2 und bildet mit ihm funktionell eine Einheit. Krankheitsverursachende Mutationen im ROMK-Gen *KCNJ1* wurden beschrieben [Simon et al., 1996b] [Jeck et al., 2001]. Die ROMK-defiziente Maus zeigt eine Abnahme der Kaliumleitfähigkeit in den Tubulusepithelien der Niere. 25% der Mäuse erreichen die Geschlechtsreife und dienen als

ROMK-BS-Modell. Die anderen 75% sterben innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt [Lu et al., 2002].

**Das BS Typ III** beruht auf Mutationen im CLCNKB-Gen, dem Gen für den basolateralen Chloridkanal ClC-Kb [Simon et al., 1997]. Der Phänotyp dieser Mutationen ist sehr variabel, insgesamt aber eher milde ausgeprägt. Er kann sich als antenatales oder klassisches BS manifestieren, zum Teil zeigt der Phänotyp dabei auch eine Überschneidung mit dem Gitelman-Syndrom [Jeck et al., 2000] [Herbert, 2003].

**Das BS Typ IV** nimmt eine Sonderstellung ein. Bei dieser Variante des BS ist neben der Niere auch das Innenohr betroffen. Ursache ist ein Defekt in der oben beschriebenen  $\beta$ -Untereinheit Barttin (siehe Abb. 1.5). Mutationen im Barttin-Gen *BSND* führen zu einem schwerwiegenden BS mit sensorineuraler Taubheit (deafness) [Birkenhäger et al., 2001].

Das schwerwiegende BS sowie die Taubheit lassen sich dadurch erklären, dass ein Funktionsverlust bzw. eine Funktionseinschränkung von Barttin sowohl ClC-Ka als auch ClC-Kb betrifft. In der Niere führt die doppelte Funktionsstörung von ClC-Ka/Barttin und ClC-Kb/Barttin zu einem besonders schweren BS – auch wenn die Funktion von ClC-Ka/Barttin in der Niere noch nicht eindeutig geklärt ist und bis heute keine krankheitsverursachenden Mutationen allein in ClC-Ka beschrieben worden sind.

Im Innenohr kann ein alleiniger Funktionsverlust von ClC-Kb durch ClC-Ka kompensiert werden, denn Patienten mit Mutationen in ClC-Kb (BS Typ 3) leiden nicht an Hörverlust. Auch die ClC-K1 (ClC-Ka Ortholog) defiziente Maus zeigt keine Taubheit [Matsumura et al., 1999]. Dagegen führt ein Funktionsverlust von Barttin im Innenohr zum kompletten Zusammenbruch des Chlorid-Recyclings mit Störung der Kaliumsekretion in die *Scala media* und dadurch zur Taubheit [Estevez et al., 2001].

**Das BS Typ V** wurde als weitere Variante beschrieben, zeigt aber in der Vererbung und in der Pathophysiologie gewisse Besonderheiten. Es wird nämlich autosomal dominant vererbt und ist in der Überfunktion eines Proteins begründet – im Gegensatz zu allen anderen Typen des BS. Betroffen ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-sensitive Rezeptor CaSR [Vargas-Poussou et al., 2002] [Watanabe et al., 2002]. Der CaSR ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und entscheidend an der Homöostase von divalenten Kationen beteiligt [Brown et al., 1998]. Seine Überfunktion führt zur Hypokalziämie durch verstärkte Inhibition der Salzreabsorption («Furosemid-ähnlicher Effekt») und zu einem Bartter-Phänotyp. Seine Unterfunktion hat den gegenteiligen Effekt [Brown et al., 1998] [Herbert, 2003].

Kürzlich wurden in einer Familie Mutationen in den Genen für CIC-Ka *und* CIC-Kb entdeckt. Ihre Mitglieder leiden genau wie Patienten mit Mutationen in *BSND* (BS Typ 4) an schwerem renalem Salzverlust und Taubheit [Schlingmann et al., 2004]. Diese Beobachtung weist auf die entscheidende kompensatorische Funktion von CIC-Ka bei CIC-Kb-Mutationen hin und stützen die Aussagen von Estevez et al. zum Salztransport in Innenohr und Niere [Estevez et al., 2001].

## 1.4. Transport von Membranproteinen

Der Transport von Membranproteinen zu den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle einschließlich der Plasmamembran spielt ebenso wie die Endozytose und der Abbau der Membranproteine eine bedeutende Rolle für die Funktion der Zelle. Dabei werden die Membranproteine sowohl gezielt in das Kompartiment sortiert, in dem sie ihre Funktion ausführen sollen, als auch reguliert endozytiert bzw. in andere Kompartimente verlagert, abgebaut oder recycelt (engl. «*sorting*»). Die Plasmamembran der meisten Zellen hoch entwickelter Organismen kann in dieser Hinsicht nicht als ein «einheitliches» Kompartiment gelten, da die Zellen in der Lage sind die Plasmamembran an verschiedenen Stellen mit unterschiedlichen Membranproteinen auszustatten (z.B. Epithel: basolateral/apikal).

Eine Fehlfunktion beim Membranproteintransport kann sich im Organismus und für die Zelle auf unterschiedliche Weise auswirken. Wie bereits beschrieben, zeigt z.B. die CIC-5 defiziente Maus eine stark verminderte Endozytose im proximalen Tubulus der Niere, was zur Dent'schen Erkrankung führt (hier ist neben der rezeptorvermittelten Endozytose und der Endozytose der Flüssigkeitsphase auch die Endozytose der Plasmamembrantransporter betroffen) [Piwon et al., 2000].

## 1.5. Sortierungssignale von Plasmamembranproteinen

Mit Hilfe der Endozytose ist die Zelle zum einen in der Lage, Stoffe aus ihrer Umgebung aufzunehmen, zum anderen kann sie Plasmamembranproteine auf diese Weise aus der Plasmamembran entfernen (Internalisierung) und z.B. dem Abbau im Lysosom zuführen. Die Endozytose verschafft der Zelle neben der Synthesesteuerung der Plasmamembranproteine eine weitere Möglichkeit, die Oberflächenexpression von Membranproteinen zu regulieren.

Auf die Endozytose zur Stoffaufnahme (rezeptorvermittelte Endozytose sowie Endozytose der Flüssigkeitsphase) wird hier nicht näher eingegangen.

Die Internalisierung von Plasmamembranproteinen, ihre Sortierung zu den Endosomen und Lysosomen aber auch der Transport in Richtung der basolateralen Membran in Epithelzellen wird durch Signale in den zytosolischen Domänen der Proteine vermittelt. Die meisten Signale bestehen aus kurzen, linearen Aminosäuresequenzen (Motive) und sind in vielen zytosolischen Bereichen von Membranproteinen gefunden worden und z.T. gut charakterisiert. Sie sind im Allgemeinen nur 4-7 Aminosäuren lang [Bonifacino und Traub, 2003].

Die «klassischen» endo- und lysosomalen Sortierungssignale werden in zwei Signalpeptidklassen eingeteilt, die Tyrosin-basierten und die Dileucin-basierten Motive [Bonifacino und Traub, 2003]. Neben diesen kurzen, linearen Peptidmotiven kann auch eine kovalente Bindung des 76 Aminosäuren umfassenden Proteins Ubiquitin an die zytoplasmatischen Domänen der Membranproteine als endo- bzw. lysosomales Sortierungssignal dienen [Hicke, 2001a]. Für die Ubiquitinierung sind in diesem Fall E3-Ubiquitinligasen verantwortlich, die mit Prolin-reichen und oft ebenfalls Tyrosin-enthaltenden Peptidmotiven («PY-Motive») des Membranproteins interagieren. Diese Motive vermitteln also zunächst die Ubiquitinierung, was dann sekundär zur Endozytose führt. Die für diese Arbeit wichtigen Signalmotive sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Vorab wird hier darauf hingewiesen, dass Signalmotiv-konforme Peptidsequenzen nicht zwingend eine Funktion haben müssen. Allein aufgrund der Zufallswahrscheinlichkeit für eine Peptidsequenz werden Signalmotivsequenzen vielfach in Proteinen gefunden. Viele sind jedoch keine «aktiven» Signalmotive, da sie strukturell nicht zugänglich sind und dadurch eine Interaktion des Motivs mit anderen Proteinen verhindert wird.

| Signalmotiv         | Protein              | Interaktionspartner                          | Funktion  |
|---------------------|----------------------|--|---|
| <b>YXXΦ</b>         | Transferrin-Rezeptor | μ-Untereinheiten<br>der<br>AP-Komplexe 1-4   | Internalisation<br>Transport zu den Lysosomen<br>Transport zur basolateralen<br>Membran |
| <b>[DE]XXXL[LI]</b> | AQP4                 | μ/β-Untereinheiten<br>der<br>AP-Komplexe 1-3 | Internalisation<br>Transport zu den Lysosomen<br>Transport zur basolateralen<br>Membran |
| <b>PY-Motive</b>    | ENaC                 | E3-Ubiquitinligase<br>(ENaC: Nedd4)          | Internalisation<br>Transport zu den Lysosomen<br>(ubiquitiniertes Protein)              |

**Tab. 1.4. Signalmotive**

Die Tabelle zeigt die für diese Arbeit wichtigen endo- und lysosomalen Sortierungssignale. Es ist jeweils beispielhaft ein Protein, das das Signal enthält, der Interaktionspartner sowie die Funktion angegeben. In eckigen Klammern aufgeführte Aminosäuren bezeichnen die an dieser Position möglichen Aminosäuren, Bsp. [DE]: D oder E ist an dieser Position möglich. Modifiziert nach Bonifacino und Traub, 2003.

### 1.5.1. Das YXXΦ-Motiv

Das YXXΦ-Motiv ist ein typischer Vertreter der Tyrosin-basierten Sortierungssignale. Es wurde u. a. im plasmamembranständigen Transferrin-Rezeptor gefunden. Aber auch lysosomale Membranproteine wie LAMP-1 und LAMP-2 und andere Membranproteine enthalten dieses Motiv. Obwohl jedes dieser Proteine im Fließgleichgewicht («*steady state*») eine bestimmte Verteilung innerhalb einer Zelle hat, teilen die meisten dieser Proteine die Eigenschaft, dass sie in gewissem - wenn auch teilweise nur geringem - Ausmaß auch die Plasmamembran erreichen [Bonifacino und Traub, 2003].

Das YXXΦ-Motiv ist für die schnelle Internalisierung dieser Proteine von der Plasmamembran verantwortlich und scheint auch den Transport von Plasmamembranproteinen zu den Lysosomen und verwandten Organellen (z.B. MHC-Klasse-II-Kompartimente) zu vermitteln [Williams und Fukuda, 1990] [Harter und Mellmann, 1992] [Marks et al., 1995] [Gough et al., 1999]. Interessanterweise konnte dem Signalpeptid auch eine Bedeutung bei der Sortierung in Richtung der basolateralen Membran von polarisierten Zellen zugeschrieben werden [Hunziker et al., 1991] [Rajasekaran et al., 1994]. Diese verschiedenen Rollen des YXXΦ-Motivs sprechen

dafür, dass es nicht nur die Proteinsortierung an der Plasmamembran lenkt, sondern auch in anderen Kompartimenten wie dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und den Endosomen die Sortierung beeinflusst. Die Stärke und Spezifität des Sortierungssignals hängt dabei anscheinend von der tatsächlichen Aminosäuresequenz des Motivs, den flankierenden Aminosäureresten und von der Position des Motivs innerhalb der zytosolischen Domäne des Proteins ab [Harter und Mellmann, 1992] [Boll et al., 1996] [Ohno et al., 1996] [Bonifacino und Traub, 2003].

YXX $\Phi$ -Motive interagieren mit den  $\mu$ -Untereinheiten der AP-Komplexe 1 bis 4. Die AP-Komplexe bestehen jeweils aus vier Untereinheiten: einer  $\beta$ -, einer  $\mu$ -, einer  $\sigma$ - und einer vierten Untereinheit ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$ ). Sie sind Komponenten der Vesikelhülle. AP-1, AP-2 und AP-3 sind mit Clathrin assoziiert. Dagegen kommt AP-4 in der Hülle der nicht mit Clathrin umschlossenen Vesikel des TGN vor. [Ohno et al., 1995] [Boll et al., 1996] [Ohno et al., 1996] [Hirst et al., 1999] [Collins et al., 2002] [Bonifacino und Traub, 2003]. Jeder AP-Komplex bindet mit seiner  $\mu$ -Untereinheit eine Reihe bestimmter YXX $\Phi$ -Motive [Ohno et al., 1998] [Aguilar et al., 2001]. AP-2 ist an der Bildung der Clathrinvesikelhülle bei der Internalisation und am Transport zu den Lysosomen beteiligt, spielt also für YXX $\Phi$  als Endozytosesignal die entscheidende Rolle. Die Komplexe AP-1, AP-3 und AP-4 sind vermutlich insbesondere für die intrazelluläre Sortierung mitverantwortlich [Bonifacino und Traub, 2003].

### 1.5.2. Das [DE]XXXL[LI]-Motiv

Das [DE]XXXL[LI]-Motiv ist ein Vertreter der Dileucin-basierten Sortierungssignale. Letourneur und Klausner fanden dieses Signal in der zytosolischen Domäne der CD3- $\gamma$ -Kette des T-Zell-Rezeptors und beschrieben, dass es für die schnelle Internalisierung und den Transport zu den Lysosomen verantwortlich ist [Letourneur und Klausner, 1992]. Die Domäne enthielt eine DKQTLL-Sequenz und die Mutageneseanalyse ergab, dass die beiden Leucinreste essentiell für das Motiv waren [Letourneur und Klausner, 1992].

Die [DE]XXXL[LI]-Motive wurden daraufhin in vielen anderen Membranproteinen gefunden und haben dabei eine sehr ähnliche Bedeutung und Verbreitung wie die YXX $\Phi$ -Signale. Beide Signale vermitteln die schnelle Internalisation von der Plasmamembran und Transportvorgänge zu endo- und lysosomalen Kompartimenten. Ebenso wie YXX $\Phi$  scheint auch [DE]XXXL[LI] am Transport von Membranproteinen in Richtung der basolateralen Membran beteiligt zu sein [Matter et al., 1994] [Miranda et al., 2001]. Die ähnlichen Eigenschaften der beiden Motive zeigen sich ebenfalls anhand ihrer Interaktionspartner, auch [DE]XXXL[LI] interagiert mit den AP-Komplexen 1-3 (nicht aber mit AP-4) [Honing et al., 1998] [Hofmann et al., 1999]. Interessanterweise konkurrieren die beiden Motive nicht bei der Bindung an die AP-Komplexe

[Marks et al., 1996]. Die Ursache dafür sind wahrscheinlich verschiedene Bindungsstellen am AP-Komplex. Die Bindungsstelle von [DE]XXXL[LI] am AP-Komplex ist im Gegensatz zu der von YXX $\Phi$  nicht eindeutig aufgeklärt. Sie wurde sowohl an der  $\mu$ -Untereinheit als auch an der  $\beta$ -Untereinheit der AP-Komplexe vermutet [Rodionov et al., 1998] [Bremnes et al., 1998] [Rapoport et al., 1998] [Craig et al., 2000]. Möglicherweise ist – wie bei anderen Dileucinmotiven auch – ein weiteres, bisher nicht entdecktes Protein an der Interaktion der [DE]XXXL[LI]-Motive mit den AP-Komplexen beteiligt [Bonifacino und Traub, 2003].

### 1.5.3. PY-Motive

Die Prolin-Tyrosin-(PY)-Motive als Grundlage der Ubiquitin-basierten Sortierung werden hier hauptsächlich beispielhaft anhand des epithelialen Natriumkanals ENaC beschrieben. Zunächst soll kurz der Prozess der Ubiquitinierung dargestellt werden.

Das 76 Aminosäuren umfassende Protein Ubiquitin ist innerhalb der Eukaryonten hoch konserviert. Der C-terminale Aminosäurerest Glycin kann mit seiner Carboxylgruppe über eine Isopeptidbindung mit Lysinseitenketten (K) des Zielproteins reagieren, was zur Bindung von Ubiquitin an das Zielprotein führt. Diese Reaktion ist der letzte Schritt einer Serie von Ubiquitinübertragungsvorgängen, bei denen Ubiquitin von E1-Ubiquitin-Aktivierungs-Enzymen über E2-Ubiquitin-Konjugations-Enzyme an E3-Ubiquitinligasen «übergeben» wird und dabei intermediär als Thioester gebunden vorliegt [Pickart, 2001]. Für die Spezifität der Ubiquitinierung der Zielproteine sind dabei die E3-Ubiquitinligasen verantwortlich; denn sie «erkennen» das PY-Motiv des Proteins.

Ist Ubiquitin mit dem Zielprotein verbunden, können endogene Lysinreste dieses gebundenen Ubiquitins wiederum ubiquitiniert werden, was zu Polyubiquitinseitenketten führt. Das Ausmaß der Ubiquitinierung spielt für den intrazellulären Proteinabbau eine wichtige Rolle. So werden beispielsweise polyubiquitinierte Proteine durch das 26S-Proteasom abgebaut [Thrower et al., 2000]. Für die reine Internalisierung von Plasmamembranproteinen, wie sie weiter unten beschrieben wird, scheint ein oder wenige Ubiquitinmoleküle ausreichend zu sein [Terrel et al., 1998] [Strous und Govers, 1999] [Shih et al., 2000]. Das Ausmaß der Ubiquitinierung bzw. die Anzahl der gebundenen Ubiquitinmoleküle ist für die Zelle vermutlich das Unterscheidungsmerkmal, ob ein ubiquitiniertes Protein ins Lysosom endozytiert oder im Proteasom degradiert werden soll [Hicke, 2001b].

Hinweise darauf, dass das Ubiquitin-System auch als Regulationsmechanismus der Oberflächenexpression fungiert, lieferten Experimente in Hefen. Es konnte gezeigt werden, dass ein G-Protein-gekoppelter Plasmamembranrezeptor aufgrund von Ubiquitinierung internalisiert wird [Hicke und Riezmann, 1996] [Roth und Davis, 1996]. Daraufhin wurden in Hefen viele

Plasmamembranproteine beschrieben (darunter auch Transporter), die mit Hilfe von Ubiquitin als Endozytosesignal aus der Plasmamembran entfernt werden [Bonifacino und Weissman, 1998] [Hicke, 1999] [Rotin et al., 2000].

Auch bei höheren Organismen scheint die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen bei der Internalisation und beim Transport zu den Lysosomen von entscheidender Bedeutung zu sein. Dieses wurde für den GH-Rezeptor, den EGF-Rezeptor und einige andere Membranproteine gezeigt [van Kerkhof et al., 2001] [Levkowitz et al., 1999] [Joazeiro et al., 1999] [Waterman et al., 2002].

ENaC wird ebenfalls durch Ubiquitinierung reguliert [Staub et al., 1996][Staub et al., 1997]. Dieser Amilorid-sensitive Natriumkanal ist am Salztransport in der Niere und in anderen Epithelien beteiligt und gleichzeitig bei der Blutdruckregulation von Bedeutung. Er besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), die jeweils zwei Prolin-reiche Peptidsequenzabschnitte enthalten. Deletionen in zwei dieser sechs Sequenzabschnitte - jeweils eine in der  $\beta$ - und eine in der  $\gamma$ -Untereinheit – wurden bei Patienten mit Liddle-Syndrom gefunden, einer hereditären Form des Bluthochdrucks. Die Deletionen führen dabei zu einer Hyperaktivierung des Kanals [Staub et al., 1996]. Staub et al. konnten zeigen, dass diese Sequenzabschnitte (PPPNY der  $\beta$ -Untereinheit und PPPRY der  $\gamma$ -Untereinheit) die WW-Domänen der E3-Ubiquitinligase rNedd4 binden. rNedd4 besteht aus einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Lipid-Bindungsdomäne (CaLB oder auch C2 genannt), drei WW-Domänen (benannt nach einem in der Domäne vorhandenen Paar konservierter Tryptophane) und einer Ubiquitinligasedomäne (HECT, Homologous To E6AP Carboxy-Terminus). Mutationen des Motivs PPPNY zu PPANY bzw. PPPNA, wie sie bei Patienten mit Liddle-Syndrom gefunden wurden, führen zu einer Aufhebung der Bindung an die WW-Domänen von rNedd4. Die Internalisierung von ENaC ist bei diesen Patienten somit beeinträchtigt, was zu einer höheren Anzahl von Natriumkanälen mit erhöhter Natriumrückresorption in der Niere führt und die Ursache des Hypertonus beim Liddle-Syndrom darstellt.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ENaC *in vivo* ubiquitiniert und auf diese Weise die Oberflächenexpression des Kanals gesteuert wird [Staub et al., 1997]. Später stellte sich heraus, dass weder rNedd4 noch die homologe E3-Ubiquitinligase der Maus mNedd4-1, sondern eine andere Isoform (mNedd4-2) für die Regulation von ENaC verantwortlich ist [Kamynina et al., 2001]. mNedd4-2 besitzt vier WW-Domänen und eine HECT-Domäne, eine C2-Domäne fehlt.

Ähnliche Beobachtungen, wie Staub et al. für ENaC, machten auch Schwake et al. für CIC-5 [Schwake et al., 2001]. Wie bereits beschrieben, ist CIC-5 hauptsächlich in Endosomen lokalisiert, erreicht aber in geringem Ausmaß auch die Plasmamembran. Schwake et al. identifizierten ein Internalisierungssignal (Sequenz: PPLPPYTP) im C-terminalen Abschnitt von CIC-5, das dem PY-Motiv von ENaC sehr ähnlich ist. Sie zeigten, dass Mutationen des Motivs die Oberflächenexpression und den Strom von CIC-5 in *Xenopus-laevis*-Oozyten um

den Faktor 2 erhöhen. Die Koexpression von ClC-5 mit einer nicht funktionellen Mutante von WWP2 - einer Ubiquitinligase - führte nur dann zur Erhöhung des Stroms und der Oberflächenexpression, wenn das Motiv intakt war, was auf eine Interaktion von WWP2 mit diesem PY-Motiv hindeutet [Schwake et al., 2001].

Alle drei beschriebenen Signaltypen können also bei der Regulation der Plasmamembranexpression von Proteinen beteiligt sein. Möglicherweise enthält - wie bereits oben erwähnt - Barttin als regulatorische Untereinheit der ClC-K-Kanäle derartige Signale in seinem C-terminalen Abschnitt.

## 2. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten CIC-K-Kanäle in ihrer Funktionseinheit mit Barttin untersucht werden. Barttin ist die erste  $\beta$ -Untereinheit, die für Chloridkanäle der CIC-Familie beschrieben wurde [Estevez et al., 2001]. Eine direkte Interaktion von CIC-K und Barttin ist aufgrund der bisherigen Untersuchungen [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002] zwar wahrscheinlich, aber noch nicht abschließend bewiesen. Es ist nicht geklärt, ob Barttin lediglich ein indirekter Regulator der CIC-K-Kanäle ist oder ob eine direkte Interaktion der beiden Partner auch an der Zelloberfläche stattfindet. Die Stöchiometrie des potentiellen CIC-K/Barttin-Komplex' ist bislang unbekannt.

Die Interaktion zwischen CIC-K und Barttin sollte mit Hilfe von Fusionsproteinen untersucht werden. Deletionen dieser Fusionsproteine sollten zur Aufklärung funktionell wichtiger Einheiten beitragen. Die Analyse erfolgte im heterologen *Xenopus-laevis*-Oozyten-Expressionssystem durch Messung der Chloridströme. Mittels eines Oberflächenassays wurde zusätzlich die Menge des an der Oberfläche exprimierten Fusionsproteins bestimmt.

In einem zweiten Abschnitt der Arbeit sollte eine Analyse der Barttin-Region um den Tyrosinrest an Position 98 erfolgen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation dieser Aminosäure zu einer gesteigerten Oberflächenexpression der CIC-K-Kanäle führt [Estevez et al., 2001]. Y98 kann aufgrund der umliegenden Aminosäurereste sowohl Teil eines Bindungsmotivs für Ubiquitinligasen (PY-Motiv) als auch Teil eines Tyrosin-basierten Sortierungsmotivs der Form YXX $\Phi$  sein. Über beide Mechanismen ließe sich ein Einfluss auf die Oberflächenexpression erklären. Deshalb sollte nach Mutagenese der Aminosäuren in der Umgebung des Y98 eine Analyse der mutierten Untereinheiten nach Koexpression mit CIC-K erfolgen.

An PY-Motive bindende Ubiquitinligasen sollten in Analogie zu Versuchen mit dem Natriumkanal ENaC, der durch Ubiquitinierung reguliert wird, untersucht werden [Staub et al., 1996][Staub et al., 1997].

Abschließend wurden weitere Barttin-Regionen untersucht, die ebenfalls an der Regulation der Oberflächenexpression von CIC-K/Barttin beteiligt sein könnten. Hierzu erfolgte eine Analyse mutmaßlicher Tyrosin- und Dileucin-Motive im C-terminalen Abschnitt von Barttin.

## 3. Material

### 3.1. Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien der Firmen CARL ROTH (Karlsruhe), FLUKA (Neu-Ulm), MERCK (Darmstadt), SERVA (Heidelberg) und SIGMA (Deisenhofen) in der Qualität «p.a.» bzw. «reinst» verwendet. Enzyme, Nukleinsäuren und Nukleosidtriphosphate wurden von den Firmen AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (Freiburg), MBI FERMENTAS (St. Leon-Rot), NEW ENGLAND BIOLABS (Schwalbach), PROMEGA (Mannheim), ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS (Mannheim) und STRATAGENE (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Oligonukleotide wurden von MWG-BIOTECH (Ebersberg) und METABION (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

### 3.2. Filmmaterialien

Agarosegele wurden mit einem digitalen Videosystem der Firma INTAS (Göttingen) dokumentiert. Zur Detektion der *Western-Blots* wurden X-OMAT AR Röntgenfilme von KODAK (Stuttgart) und ein CURIX Entwickler von AGFA (Köln) verwendet.

Agarosegelfotos und Röntgenfilme wurden mit einem UMAX 2000 Scanner (UMAX, Willich) digitalisiert.

### 3.3. Puffer, Lösungen und Medien

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| Blocklösung (Oozyten)              | 1% BSA in ND96   |
| BARTHS Lösung, modifiziert         | 88 mM NaCl; 2,4 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 1 mM KCl;<br>410 µM CaCl <sub>2</sub> ; 330 µM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 820 µM MgSO <sub>4</sub> ;<br>10 mM HEPES; 50 mg/l Tetracyclin;<br>20 mg/l Gentamycin; pH 7,6 |
| DEPC-H <sub>2</sub> O              | 0,2% (v/v) Diethylpyrocarbonat   |
| DNA-Ladepuffer 10x                 | 30% (v/v) Glycerol; 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA;<br>1 g/l Xylencyanol; 1 g/l Bromphenolblau; pH 8,0   |
| LB-Medium                          | 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl; pH 7,5  |
| LB-Amp-Medium                      | LB-Medium mit 150 mg/l Ampicillin  |
| LB-Amp-Platten                     | 1 l LB-Amp-Medium, 15 g Agar   |
| Lysispuffer (Oozyten)              | 5 mM Pefabloc; 1% (v/v) Triton X-100 in PBS  |
| ND96-Lösung                        | 96 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> ;<br>1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM HEPES, pH 7,4  |
| OR2-Medium, Ca <sup>2+</sup> -frei | 82,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 5 mM HEPES; pH 7.4   |
| PBS-Puffer                         | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ;<br>1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4  |
| Sammelgelpuffer                    | 500 mM Tris-HCl; 0,4% SDS; pH 6,8  |
| SDS-Elektrophorese-Puffer          | 25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1% SDS  |
| SDS-Probenpuffer 2x                | 2% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau;<br>20% (v/v) Glycerol; 1% (v/v) β-Mercaptoethanol;<br>25 % (v/v) Sammelgelpuffer; pH 6,8  |
| SOC-Medium                         | 20 g/l Bacto Pepton; 5 g/l Bacto Hefeextrakt;<br>500 mg/l NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>20 mM Glucose; pH 7,0 mit NaOH  |
| TAE 20x                            | 800 mM Tris; 200 mM NaAcetat; 20 mM NaEDTA;<br>Essigsäure ad pH 7,8  |
| TBS 10x                            | 30 g/l Tris-HCl; 90 g/l NaCl; 2 g/l KCl, pH 7,4  |
| TE-Puffer 10x                      | 100 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA ; pH 7,5   |

---

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Transferpuffer                   | 192 mM Tris; 25 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,3 |
| Trenngelbuffer                   | 1,5 M Tris-HCl; 0,4% SDS; pH 8,8                      |
| <i>Western-Blot</i> -Blocklösung | 5% (w/v) Magermilchpulver; 0,1% (v/v) NP-40 in TBS    |
| <i>Western-Blot</i> -Waschlösung | 0,1% (v/v) NP-40 in TBS                               |

### 3.4. Bakterienstämme

Folgende Abkömmlinge des *Escherichia coli* Sicherheitsstammes K12 wurden zur Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet:

|              |  |
|--------------|--|
| DH5 $\alpha$ | F <sup>-</sup> , $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , $\lambda^-$ , <i>hsdR12</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> [Hanahan, 1983]   |
| XL1-Blue     | <i>endA1</i> , <i>hsdR12</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>gyrA46</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac^-</i> , F <sup>-</sup> , <i>proAB</i> , <i>lac1<sup>d</sup></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>tet<sup>r</sup></i> , <i>recA1</i> [Bullock et al., 1987] |

### 3.5. Plasmidvektoren

|        |   |
|--------|---|
| p-TLN  | Dieser Vektor ist ein Abkömmling des Vektors p-SP64T [Krieg und Melton, 1984].<br>Zur Steigerung der Expression in <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten enthält p-TLN die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des $\beta$ -Globingens von <i>Xenopus laevis</i> . Er besitzt neben einem veränderten Polyrestriktionsbereich und weiteren Restriktionsstellen zur Linearisierung hinter dem 3'-untranslatierten Bereich [Lorenz et al.,1996] einen SP6-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen. |
| p-TLB  | Hierbei handelt es sich um eine Variante von p-TLN, bei der die Polyrestriktionsregion die umgekehrte Orientierung hat.   |
| p-T7T3 | p-T7T3 ist als Abkömmling des Vektors p-BR322 ein typischer Allzweck-Transkriptionsvektor. Er besitzt ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen.<br>Der Polyrestriktionsbereich wird von zwei Promotoren flankiert (T3 und T7).   |

### 3.6. Antikörper

|   |  |
|---|--|
| Anti-HA 3F10  | ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS (Mannheim)<br>Monoklonaler Antikörper der Ratte gegen das HA-Epitop,<br>Klon 3F10                         |
| Anti-HA HA.11   | BABCO (Richmond, USA)<br>Monoklonaler Antikörper der Maus gegen das HA-Epitop,<br>Klon 16B12   |
| Goat Anti-Rat<br>F(ab) <sub>2</sub><br>HRP-conjugated | JACKSON IMMUNORESEARCH LABORATORIES (West Grove,<br>USA)<br>HRP-gekoppeltes Antikörperfragment der Ziege gegen<br>Antikörper der Ratte |
| Sheep Anti-Mouse<br>IgG (H+L)<br>HRP-conjugated       | JACKSON IMMUNORESEARCH LABORATORIES (West Grove,<br>USA)<br>HRP-gekoppelter Antikörper des Schafs gegen Antikörper<br>der Maus         |

## 4. Methoden

Soweit nicht näher beschrieben, wurden Standardvorschriften nach Sambrook und Russel [Sambrook und Russel, 2000] angewandt.

### 4.1. Mikrobiologische Methoden

Transformationskompetente Bakterien (XL1-Blue und DH5 $\alpha$ ) wurden nach Ausubel et al. [Ausubel et al., 1993] hergestellt.

#### 4.1.1. Präparation elektrokompetenter Bakterien

Eine stationäre Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes (XL1-Blue oder DH5 $\alpha$ ) wurde 1:60 in LB-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5–0,6 (log-Phase) inkubiert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt, bei 3000\*g zentrifugiert und das Bakterienpellet jeweils zweimal mit sterilem, entionisiertem Wasser und zweimal mit 10% (v/v) Glycerol gewaschen. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Anschließend wurde das Bakterienpellet im Vierfachen des jeweiligen Ausgangsvolumens mit 10% (v/v) Glycerol aufgenommen. 50  $\mu$ l Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.1.2. Transformation von Bakterien

Das Transformieren von Bakterien erfolgte nach dem Elektroporationsverfahren.

50  $\mu$ l der frisch aufgetauten Bakteriensuspension wurden mit 1  $\mu$ l des Ligationsansatzes, d.h. der Plasmid-DNA, versetzt und im GENE PULSER (BIORAD, Hercules, USA) bei 2,5 kV, 400  $\Omega$  und 25  $\mu$ F elektroporiert. Die Bakterien wurden sofort in 500  $\mu$ l SOC-Medium aufgenommen und für 30 min. bei 37°C inkubiert.

Danach wurde ein Teil der Bakteriensuspension (50-250  $\mu$ l) auf LB/Amp-Agarplatten aufgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 4.1.3. Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien

Ampicillinresistente und somit das Plasmid tragende Kolonien wurden am nächsten Tag mit keimfreien Zahnstochern von der Agarplatte in 2 ml («Miniprep») oder 50 ml («Midiprep») LB/Amp-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler vermehrt.

Agarplatten und Bakteriensuspensionen wurden bis zu zwei Wochen auf 4°C, Bakterienpellets zur DNA-Gewinnung bis zu mehreren Wochen auf -20°C gelagert.

Zur dauerhaften Lagerung wurde 1 ml der Übernachtskultur mit 1 ml Glycerollösung versetzt, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 4.2. Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Bakterien mittels alkalischer Lyse [Birnboim und Doly, 1979] aufgeschlossen und die DNA anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Hierfür kamen folgende kommerzielle Systeme zum Einsatz.

#### 4.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA aus 2 ml Kulturen («Miniprep»)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 2 ml Kulturen erfolgte mit dem E.Z.N.A. PLASMID MINIPREP KIT I der Firma PEQLAB (Erlangen) nach Herstellerangaben.

#### 4.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA aus 50 ml Kulturen («Midiprep»)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 50 ml Kulturen erfolgte mit dem JETSTAR 2 MIDI PREP KIT der Firma GENOMED (Löhne) nach Herstellerangaben.

### 4.2.2. Enzymatische DNA-Modifikation

#### 4.2.2.1. DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Das «Schneiden» von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Standardvorschriften [Sambrook und Russel, 2000].

Enzymmengen (10-20 U), Puffer, BSA-Zusatz und Reaktionsbedingungen (Temperatur, Restriktionszeit und Salzkonzentration) wurden den Herstellerangaben entsprechend berücksichtigt.

Bei Verdau mit mehr als einem Enzym wurde ein Puffer gewählt, bei dem alle Enzyme eine ausreichend hohe Aktivität besaßen. War ein gleichzeitiger Verdau mit mehreren Enzymen aufgrund der Puffer- bzw. Reaktionsbedingungen nicht möglich, wurde nacheinander mit jeweils optimalen Reaktionsbedingungen verdaut. Der Puffer wurde dabei schrittweise aufkonzentriert.

Um die Religation eines geschnittenen Vektors zu vermeiden, wurde zum Ende des Verdaus 1 µl (1 U/µl) alkalische Phosphatase hinzugefügt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase zeigte in den verwendeten Restriktionsenzymuffern eine gute Aktivität. Der Restriktionsverdau wurde entweder durch Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 75°C für 20 min. oder durch sofortige Agarosegelelektrophorese beendet.

#### 4.2.2.2. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit der T4-DNA-Ligase (INVITROGEN, Eggenstein) nach Herstellerangaben ligiert. Es wurden 20-50 ng Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu einzufügendem DNA-Fragment betrug mindestens 1:3. Die Inkubation erfolgte 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 17°C.

#### 4.2.3. RNA-Synthese durch in-vitro-Transkription

Für die Mikroinjektion von *Xenopus-laevis*-Oozyten wurde die plasmidische cDNA in komplementäre cRNA transkribiert.

Die kodierenden Sequenzen befanden sich in den klassischen *Xenopus-laevis*-Expressionsvektoren p-TLN und p-TLB sowie in p-T7T3, die zunächst mit Mlu I bzw. Not I 3'wärts der Poly-A-Sequenz linearisiert wurden.

Es wurden 3-6 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach Überprüfung der Linearisierung durch Agarosegelelektrophorese wurde die DNA mit dem HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS, Mannheim) RNAase-frei aus dem Gel gelöst und in 50 µl H<sub>2</sub>O/DEPC aufgenommen.

Die RNA-Synthese erfolgte mit dem AMBION mMESSAGE MACHINE KIT (AMS BIOTECHNOLOGY, Wiesbaden) unter Verwendung der SP6- oder T7-Polymerase gemäß Herstellerangaben. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Integrität der RNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

#### 4.2.4. Agarosegelelektrophorese der Nukleinsäuren

Die Nukleinsäureelektrophoresen erfolgten in Flachbettgelkammern mit TAE als Laufpuffer bei einer Spannung von 5-15 V/cm.

Es wurden Agarosegele in einer Konzentration von 0,7-2,0% (w/v) verwendet. Hierzu wurde die Agarose in TAE gelöst und Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert, zu einer Endkonzentration von 0,5-1,0 µg/ml versetzt.

Den zu analysierenden Nukleinsäurelösungen wurde DNA-Ladepuffer bzw. RNA-Ladepuffer aus dem AMBION MMESSAGE MACHINE KIT (AMS BIOTECHNOLOGY, Wiesbaden) zugesetzt.

Als Größenstandard diente die 1Kb-DNA-Leiter von INVITROGEN (Eggenstein).

Schließlich wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator (312 nm) mit einem Videodokumentationssystem fotografiert.

Bei der durch *in-vitro*-Transkription synthetisierten RNA entstehen aufgrund von variablen Sekundärstrukturen z.T. mehrere diffuse Banden mit - im Vergleich zur 1Kb-DNA-Leiter - ca. halber Größe.

#### 4.2.5. Isolierung der DNA aus Agarosegelen

Die Herauslösung von DNA-Fragmenten aus den ausgeschnittenen Agarosegelstückchen erfolgte mit dem HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS, Mannheim) nach Herstellerangaben. Dabei wird die spezifische Bindung der DNA an eine Matrix aus Quarz genutzt.

#### 4.2.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt (Photometer PHARMACIA GENEQUANT II von AMPHOTEC LTD., Beverly, USA). Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren.

Eine Extinktion von  $A_{260}=1$  entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA sowie 20 µg/ml für einzelsträngige DNA und 40 µg/ml für einzelsträngige RNA.

Da das Absorptionsmaximum von gelösten Proteinen bei 280 nm liegt, kann an Hand des Verhältnisses der Extinktion von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  (Ratio) die Reinheit der Nukleinsäurelösung abgeschätzt werden. Ab einer Ratio von 1,7 wurde die Reinheit als ausreichend bewertet.

### 4.2.7. Polymerasekettenreaktion

Für Polymerasekettenreaktionen kam die thermostabile Pfu-Polymerase (STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande) aus *Pyrococcus furiosus* zur Anwendung. Sie besitzt aufgrund der 3' Exonukleaseaktivität bei niedriger Prozessivität («*proofreading*») eine sehr geringe Fehlerrate.

Die Länge der Primer betrug in der Regel 20-24 Nukleotide. Für das Einführen von Epitopen und Punktmutationen wurden auch längere Primer verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden in 0,5 ml EPPENDORF-Gefäßen im TRIO THERMOBLOCK (BIOMETRA, Göttingen) durchgeführt.

Es wurde folgender Standardansatz verwendet:

|          |                                |
|----------|--------------------------------|
| 5 µl     | 10x Pfu-Puffer                 |
| 1 µl     | Pfu-Polymerase                 |
| 5 µl     | dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid) |
| 2 µl     | Primer A (10 µM)               |
| 2 µl     | Primer B (10 µM)               |
| 100 ng   | DNA-Matrize (Template)         |
| Ad 50 µl | H <sub>2</sub> O               |

Das Temperaturprogramm war standardmäßig:

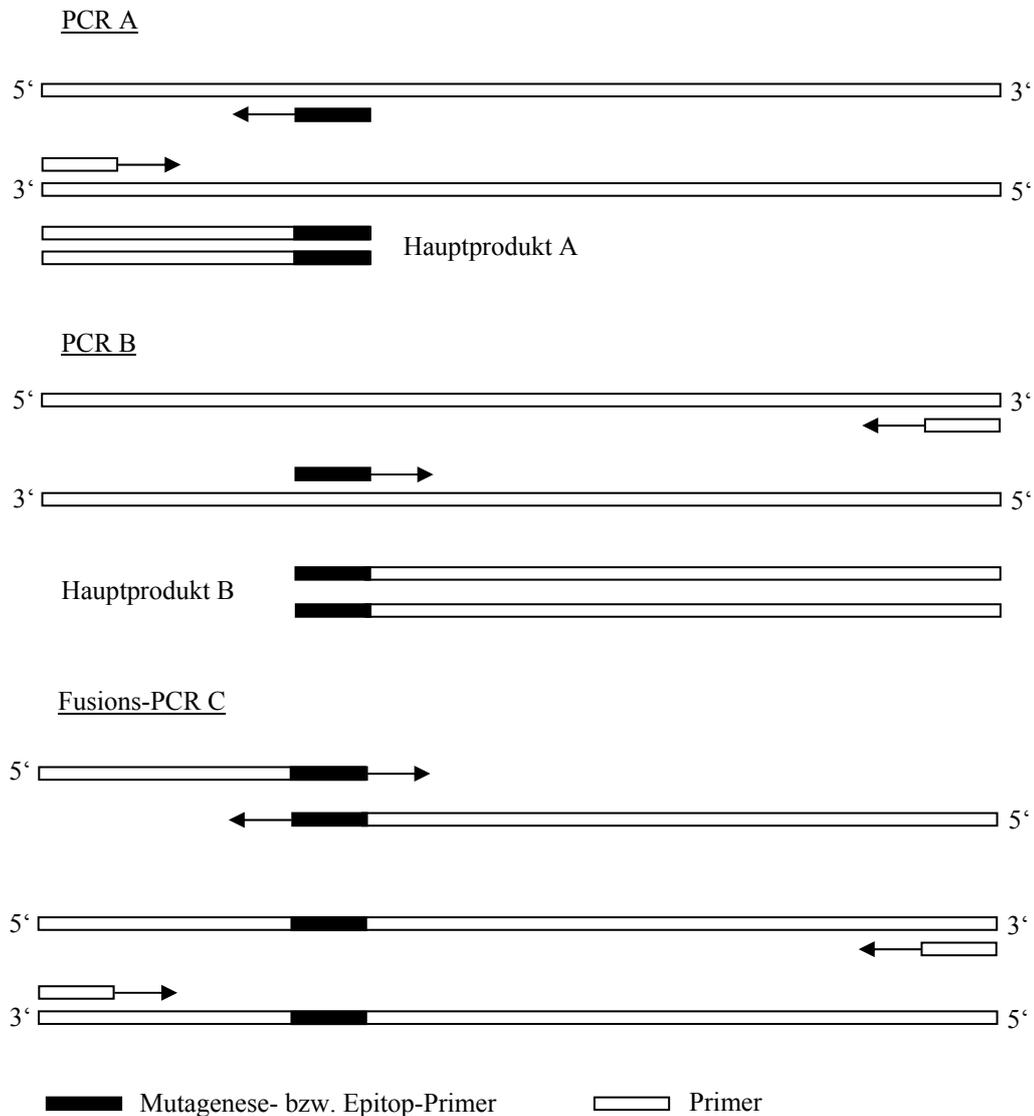
| Schritt              | Temperatur | Zeit     | Schleife            |
|----------------------|------------|----------|---------------------|
| 1. Denaturierung     | 94°C       | 5 min.   |                     |
| 2. Denaturierung     | 94°C       | 1 min.   |                     |
| 3. Primerbindung     | 52-60°C    | 30 s     |                     |
| 4. Extension         | 72°C       | 60 s/kB  | 25 mal zu Schritt 2 |
| 5. Extension (final) | 72°C       | 5 min.   |                     |
| Aufbewahrung         | 4°C        | beliebig |                     |

Die Temperatur der Primerbindung wurde wenn nötig entsprechend der Länge der miteinander bindenden Nukleotide angepasst.

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze mit DNA-Ladepuffer versetzt, über ein Agarosegel auf Erfolg überprüft und gereinigt und das PCR-Produkt aus dem Gel isoliert.

## 4.2.8. Rekombinante Polymerasekettenreaktion

Punktmutations- und Epitopsequenzen wurden mittels rekombinanter PCR in die betreffenden DNA-Abschnitte eingefügt [Higuchi, 1990].



**Abb. 4.1. Rekombinante PCR**

Näheres im Text.

In zwei getrennten Standard-PCR-Ansätzen (PCR A und B) wurden die beiden Sequenzabschnitte neben der einzufügenden Punktmutation bzw. dem einzufügenden Epitop amplifiziert (Hauptprodukte A und B). Für Punktmutationen enthielten die zueinander komplementären Mutageneseprimer die entsprechenden Veränderungen der Basentriplets. Für die Einführung eines Epitops wurden die Primer so entworfen, dass sie am 5'Ende die das Epitop kodierende Sequenz enthielten und zueinander komplementär waren. Am 3'Ende enthielten die Primer die

DNA-Matrizensequenz links und rechts jeweils 3'wärts der Position, an der die Epitopsequenz eingefügt werden sollte. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese isoliert und gereinigt und dann in einer neuen Reaktion (Fusions-PCR) mit Primern amplifiziert, die beidseits weiter von der zu verändernden Position entfernt lagen. Aufgrund der Möglichkeit der Hybridisierung untereinander werden die Matrizenstränge zunächst verlängert. Da die kurzen, nicht-rekombinanten Matrizenstränge nur eine Primerbindungsstelle pro Strang enthalten (die Vermehrung somit nur linear ansteigen kann), wird nur der DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert, der sich über den gesamten Bereich zwischen den äußeren Primern erstreckt und die einzuführende Mutation bzw. das einzuführende Epitop an der gewünschten Position enthält.

Das Fusionsprodukt wurde wiederum mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt und anschließend über geeignete Restriktionsschnittstellen für den korrespondierenden Sequenzabschnitt in das plasmidkodierte Zielgen eingefügt. Ein modularer Austausch von Sequenzabschnitten setzt dabei das Vorhandensein von singulären Restriktionsschnittstellen voraus.

Nach Ligation, Transformation und Kultivierung der Bakterien sowie Präparation der Plasmid-DNA wurden sämtliche durch Polymerasekettenreaktion generierte Sequenzabschnitte grundsätzlich sequenziert, um Fehlerfreiheit zu gewährleisten.

#### 4.2.9. Erzeugung von Fusionsproteinen

Das Verbinden von DNA-Abschnitten wurde auf zwei unterschiedliche Arten erreicht.

Das direkte Aneinanderfügen von DNA-Teilen erfolgte durch rekombinante PCR, wobei die Primer an der Fusionsstelle mit 18-24 Nukleotiden überlappten.

Für das Aneinanderfügen von DNA-Abschnitten mit zwischen den Abschnitten eingefügten Restriktionsschnittstellen wurden diese ebenfalls einzeln amplifiziert. Bei der PCR kamen aber Primer zum Einsatz, die jeweils am 5'Ende verschiedene und für das Gesamtkonstrukt singuläre Restriktionsschnittstellen enthielten. Die so erzeugten PCR-Produkte und der Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend in einer Mehrfragmentligation in das Plasmid ligiert. Auf diese Weise hergestellte, modulare Genkonstrukte hatten den Vorteil, dass die jeweiligen DNA-Abschnitte schnell wieder ausgeschnitten und in andere Konstrukte eingefügt werden konnten bzw. DNA-Abschnitte relativ einfach zwischen den Konstrukten ausgetauscht werden konnten, um z.B. ungewollte Mutationen zu beseitigen.

## 4.2.10. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren [Sanger et al., 1977]. Hierbei wird die DNA-Matrize ausgehend von nur einem Primer amplifiziert. Es kam das Thermozyklusverfahren unter Verwendung der thermostabilen TAQ-Polymerase (PERKIN ELMER, Wellesley, USA) zum Einsatz. Als Primer dienten Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 18 Nukleotiden.

Durch Verwendung von 2'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) zusammen mit 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP) kommt es an statistisch über die Sequenzlänge verteilten Positionen zum Kettenabbruch, da die zur Verlängerung der Kette notwendige 3'-OH-Gruppe bei einem Teil der DNA-Bausteine fehlt. Die so entstehenden PCR-Produkte unterschiedlicher Länge werden aufgetrennt. Da die ddNTP für die unterschiedlichen Basen verschieden fluoreszenzfarbstoffmarkiert sind (BIGDYE, PERKIN ELMER, Wellesley, USA), identifiziert jede Farbe die jeweilig letzte Base der Abbruchprodukte eindeutig.

Die Analyse von Länge und Farbe der Abbruchprodukte erfolgte auf den Geräten ABI PRISM 377 UND ABI PRISM 310 der Firma PERKIN ELMER (Wellesley, USA).

Die Sequenzierungs-PCRs und Analysen der Abbruchprodukte wurden z.T. von der Servicegruppe des ZMNH (Leitung: W. Kullmann) durchgeführt.

Die Auswertung der Fluoreszenzmessungsergebnisse erfolgte am PC mit der Software LASERGENE von DNASTAR (Madison, USA).

## 4.3. Biochemische Methoden

### 4.3.1. Proteinpräparation aus *Xenopus-laevis*-Oozyten

Mit *in-viro*-transkribierter RNA injizierte Oozyten wurden nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen bei 17°C dreimal mit BARTHS Lösung gewaschen. Danach wurden sie in 10 µl/Oozyte Lysispuffer suspendiert und für 30 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugieren (10 min. bei 20.000\*g und 4°C) und Waschen in Lysispuffer entfernt. Von der klaren Proteinlösung wurde das Volumenäquivalent einer Oozyten der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zugeführt.

### 4.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molmasse erfolgte mit der Methode von Laemmli [Laemmli, 1970]. Die Proteinlösungen wurden hierzu in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min. auf 55°C erwärmt. Da Membranproteine aufgrund ihrer lipophilen Transmembrandomänen zur Aggregation neigen, wurde nicht wie sonst üblich auf 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Minigelkammern (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) mit Gelen unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentration bei einer Stromstärke von 15-30 mA. Abhängig von der zu erwartenden Proteingröße und der gewünschten Auflösung betrug die Polyacrylamidkonzentration der Trenngele 7-15%. Gefärbter Proteingewichtsstandard (BENCHMARK von INVITROGEN, Eggenstein) wurde zur Größenabschätzung mit aufgetrennt.

### 4.3.3. Western-Blot

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese auf eine mit Methanol befeuchtete PVDF-Membran (POLYSCREEN von NEN, Köln) gelegt. Anschließend wurden Gel und Membran zwischen jeweils drei mit Transferpuffer befeuchtete WHATMANN 3MM Filterpapiere (BIOMETRA, Göttingen) positioniert. Der Transfer erfolgte in einer Tank-Blot-Kammer (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) bei 30 V und 4°C über Nacht.

Für die Immundetektion wurde die Membran 30 min. bei Raumtemperatur in *Western-Blot*-Blocklösung inkubiert, um eine direkte Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde mit dem jeweiligen Primärantikörper verdünnt in Blocklösung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit *Western-Blot*-Waschlösung wurde die Membran erneut für 30 min. geblockt und schließlich mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch erneutes fünfmaliges Waschen mit *Western-Blot*-Waschlösung wurden alle ungebundenen Antikörperreste entfernt.

Die Detektion des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mittels Chemolumineszenzreaktion (RENAISSANCE KIT von NEN, Köln) nach Angaben des Herstellers. Das Kit enthält Luminol als Substrat für die HRP. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und für unterschiedliche Zeitspannen (10 s bis 5 h) auf einen Röntgenfilm gelegt, welcher anschließend im CURIX von AGFA (Köln) entwickelt wurde.

## 4.4. Zellbiologische Methoden

### 4.4.1. Gewinnung von *Xenopus-laevis*-Oozyten

#### 4.4.1.1. Präparation von *Xenopus-laevis*-Oozyten

Weibliche Krallenfrösche der Spezies *Xenopus laevis* wurden in 0,17%iger Tricainlösung (SIGMA, Deisenhofen) anästhesiert und Teile des Ovars operativ entnommen. Das Ovar wurde in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem OR2-Medium gelagert.

Zur Entfernung von Bindegewebe wurden die Ovarteile mit 3 g/l Kollagenase A (SIGMA, Deisenhofen) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem OR2-Medium inkubiert (Horizontalschüttler Stufe 1, 17°C, 2-3 h). Nach mehrmaligem Waschen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem OR2-Medium wurden die Oozyten in BARTHS Lösung überführt und optisch selektioniert (lebende Oozyten mit einem Durchmesser von 0,8-1,2 mm). Die Oozyten wurden über Nacht bei 17°C in BARTHS Lösung gelagert und am nächsten Tag erneut selektioniert bevor die Injektion von RNA stattfand.

#### 4.4.1.2. Mikroinjektion der in-vitro-transkribierten RNA in *Xenopus-laevis*-Oozyten

Die Beobachtung, dass fremde RNA, die man in *Xenopus-laevis*-Oozyten injiziert, in Proteine translatiert wird, wurde 1971 gemacht [Gurdon et al., 1971]. Daraufhin wurden Oozyten für die Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen benutzt [Gundersen et al., 1983] [Mildedt et al., 1983]. *Xenopus-laevis*-Oozyten haben sich seitdem als Expressionssystem für Ionenkanäle, Transporter und andere Plasmamembranproteine etabliert.

Die Injektionsspitzen wurden aus Glaskapillaren (DRUMMOND, Broomall, USA) mit einem Horizontal-Pipettenziehgerät (SUTTER, Novato, USA) hergestellt. Anschließend wurden die Injektionsspitzen mit Silikonöl DC 200 (SIGMA, Deisenhofen) gefüllt und in eine Nanoliterpipette (DRUMMOND, Broomall, USA) eingespannt. Die ausgezogene Glasinjektionsspitze wurde mit einer Pinzette abgebrochen, um eine scharfe Glasnadel mit dem gewünschten Durchmesser zu erhalten.

Es wurden 1-3  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung aufgezogen und dann jeweils 50 nl/Oozyte injiziert. Die RNA-Lösung wurde vorher so verdünnt, dass 50 nl je nach Versuch zwischen 5-30 ng Gesamt-RNA enthielten.

Nach der Injektion wurden die Oozyten zur Expression für 2-3 Tage bei 17°C inkubiert.

#### 4.4.1.3. Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen

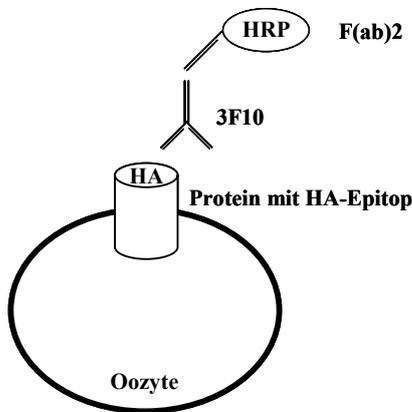


Abb. 4.2. Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen bei *Xenopus-laevis*-Oozyten

Die Chloridkanäle wurden zwischen zwei Transmembrandomänen extrazellulär mit einem HA-Epitop versehen und in *Xenopus-laevis*-Oozyten (Eizellen von afrikanischen Krallenfröschen) exprimiert. Als Negativkontrolle dienten unmarkierte Kanäle und nicht-injizierte Oozyten. Für jedes zu untersuchende Konstrukt wurden mindestens 10 Oozyten eingesetzt.

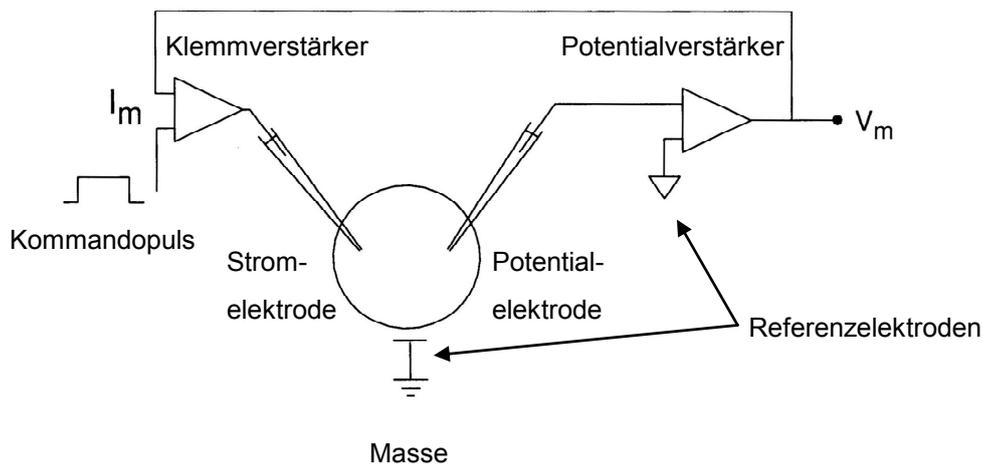
Alle Inkubationsschritte der Oozyten erfolgten bei 4°C, um den Stoffwechsel der Oozyten so gering wie möglich zu halten und Endozytosevorgänge zu verhindern.

Die Oozyten wurden zunächst für 30 min. in Blocklösung (ND96 mit 1% BSA) und anschließend für 1 h mit dem Anti-HA-Primärantikörper (3F10 Verdünnung 1:200 in Blocklösung) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die SUPERSIGNAL ELISA FEMTO Lösung (PIERCE, Rockford, USA) nach Herstellerangaben angesetzt. Die Oozyten wurden dreimal für 10 min. mit Blocklösung gewaschen und danach für eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörperfragment (F(ab)2 Verdünnung 1:500 in Blocklösung) inkubiert. Anschließend wurde sechsmal für insgesamt mindestens eine Stunde gewaschen. Dabei erfolgten die drei letzten Waschschrte mit ND96 ohne BSA, um Hintergrundsignale durch BSA zu vermeiden. [Zerangue et al., 1999] [Schwake et al., 2001].

Jede Oozyte wurde einzeln in 50 µl SUPERSIGNAL ELISA FEMTO Lösung transferiert und dann sofort in einem Luminometer (TD-20/20 von TURNER, Sunnyvale, USA) gemessen. Die relativen Lichteinheiten der einzelnen Oozyten wurden für jedes Konstrukt gemittelt und der Standardfehler berechnet.

## 4.5. Elektrophysiologische Methoden

### 4.5.1. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp



**Abb. 4.3. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp modifiziert nach Ashcroft [Ashcroft, 2000]**

Die Abbildung zeigt schematisch den Versuchsaufbau bei der Membranpotentialmessung einer Oozyte (Kreissymbol). Näheres siehe Text.

Der Stromfluss durch die gesamte Zellmembran («*whole-cell current*») in Abhängigkeit vom Membranpotential kann mit dem Verfahren der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp gemessen werden [Cole, 1949] [Hodgkin et al., 1949] [Marmont, 1949] [Hodgkin und Huxley, 1952] [Cole, 1979]. Das Verfahren wurde von Stühmer für Oozyten optimiert und nach dieser modifizierten Versuchsvorschrift durchgeführt [Stühmer, 1992].

In die Oozyte werden zwei fein ausgezogene Messelektroden aus Glas eingestochen. Mit der Potentialelektrode wird die Potentialdifferenz zwischen dem Inneren der Oozyte und der Badlösung gemessen, wobei das Potential der Badlösung definitionsgemäß 0 V beträgt. Über die Stromelektrode kann Strom in das Innere der Oozyte geleitet und der Oozyte somit ein vom Ruhemembranpotential abweichendes Potential aufgezwungen werden. Ein Rückkoppelungsverstärker vergleicht dabei ständig das momentane Potential der Oozyte («Ist-Potential»  $V_m$ ) mit dem vom Untersucher vorgegebenen «Soll-Potential» (Kommandopuls) und «injiziert» dabei über die Stromelektrode einen Strom, der für das Aufrechterhalten des «Soll-Potentials» notwendig ist. Dieser Strom  $I_m$  wird gegen die Zeit gemessen, wobei er die gleiche Amplitude aber das umgekehrte Vorzeichen des Stroms, der über die Membran fließt, besitzt. Zu einem bestimmten Zeitpunkt entspricht der gemessene Strom so dem Gesamtfluss an geladenen Teilchen durch die Oozytenmembran mit ihren Ionenkanälen, elektrogenen Transportprozessen,

kapazitiven Strömen und möglichen Leckagen. Definitionsgemäß haben einwärtsgerichtete Ströme von Kationen (von extra- nach intrazellulär) ein negatives Vorzeichen, so dass sie die Stromkurve nach unten lenken.

Bei starker Expression eines zu untersuchenden Ionenkanalproteins und dessen funktionellem «Einbau» in die Oozytenmembran ist der Strom bei geeigneten Versuchsbedingungen durch den Ionenkanal dominiert.

Eine Computersteuerung lässt es zu, eine bestimmte zeitliche Abfolge von «Soll-Potentialen» einzustellen (Pulsprotokoll, s.u.). Die Stromantworten auf diese angelegten, unterschiedlichen Spannungen werden dann in *einer* Abbildung überlagert dargestellt und charakterisieren die elektrophysiologischen Eigenschaften der exprimierten Kanäle (siehe Abschnitt «Ergebnisse»).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Elektroden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Filament ( $\varnothing = 1$  mm, CLARK CAPILLARIES von HARVARD APPARATUS LTD., Edenbridge, UK) mit einem Vertikal-Elektrodenziehgerät (LIST MEDICAL INSTRUMENTS, Firma nicht mehr am Markt) hergestellt und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. In die Lösung tauchte ein mit  $\text{FeCl}_3$  chlorierter Silberdraht, der als möglichst polarisationsfreies Bindeglied zwischen der Elektrodenlösung und dem Elektrokabel zum Verstärker diente. Die Badlösung für die Oozyte wurde über mit 3 M KCl gefüllte Agarbrücken mit den beiden mit 1 M NaCl gefüllten Bädern der Referenzelektroden verbunden. Der Serienwiderstand betrug 0,3-1 M $\Omega$ . Die Ströme wurden über einen Verstärker (NPI-INSTRUMENTS, Tamm) und einen Signalwandler (AXON INSTRUMENTS, Union City, USA) an einen PENTIUM-PC (INTEL, Santa Clara, USA) mit WINDOWSNT-Betriebssystem (MICROSOFT, Redmond, USA) geleitet. Die Pulsprotokolle wurden mit der Software PCLAMP (AXON INSTRUMENTS, Union City, USA) gesteuert. Die Messelektroden wurden unter Sicht durch ein Binokularmikroskop (ZEISS, Jena) mit Hilfe von Mikromanipulatoren (MÄRZHÄUSER, Wetzlar-Steindorf) positioniert. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die elektrophysiologische Charakterisierung der Kanalkonstrukte wurde an mindestens drei unabhängigen Oozyten-Präparationen mit jeweils neu *in-vitro*-synthetisierter RNA durchgeführt. Bei nicht-funktionellen Konstrukten wurde - sofern ein Antikörper vorhanden war - die Expression des Proteins mittels *Western-Blot* überprüft.

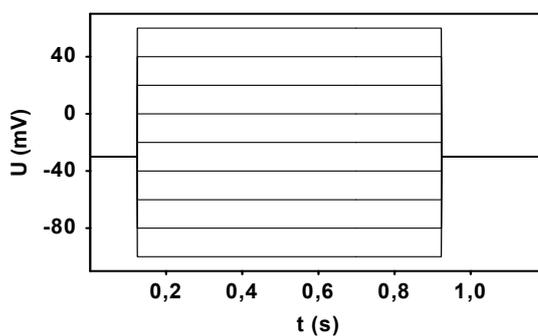
#### 4.5.1.1. Messung der Ionenselektivität

Die Ionenselektivität der verschiedenen Ströme und damit der Kanäle wurde bestimmt, indem Chlorid in der extrazellulären Lösung (Badlösung der Oozyte) gegen Bromid oder Iodid ausgetauscht wurde. Dabei wurden die 80 mM NaCl der ND96-Lösung durch 80 mM NaBr bzw. NaI ersetzt. Die Oozyten wurden mit der jeweiligen Lösung umspült, eine Minute

inkubiert und dann gemessen. Um die Reversibilität der Stromänderung zu überprüfen, wurde am Ende einer jeden Messreihe immer mit ND96 (somit Chlorid als Anion) gemessen.

#### 4.5.1.2. Pulsprotokoll und elektrophysiologische Berechnungen

Alle Voltage-Clamp-Messungen wurden mit demselben Pulsprotokoll durchgeführt. Dabei wurde die Oozyte ausgehend von einem Haltepotential (-30 mV) sequentiell in 20 mV-Schritten auf Membranpotentiale zwischen -100 mV und +80 mV geklemmt.



**Abb. 4.4. Standardpulsprotokoll**

Die Abbildung zeigt das bei allen Voltage-Clamp-Messungen angewandte Pulsprotokoll.

Der dafür injizierte Strom wurde gegen die Zeit gemessen (s.o.).

Für die Ermittlung der durchschnittlichen Leitfähigkeit einer Messreihe wurde dabei für jede Oozyte ein Strom-Spannungs-Diagramm erstellt. Dazu wurden die zu jeder Membranspannung gehörenden Ströme im Steady-State über 50 ms gemittelt und als ein Messpunkt gewertet. Aufgrund der näherungsweise linearen Strom-Spannungs-Beziehung für ClC-K und ClC-K/Barttin wurde die Leitfähigkeit als Steigung der Ausgleichsgeraden zwischen den Messpunkten im Bereich von -80 mV bis +40 mV berechnet. Für jede Messreihe wurden daraufhin die Einzelleitfähigkeiten gemittelt, wobei die Anzahl der Einzelmessungen jeder Messreihe (n) mindestens 5 betrug.

## 4.6. Elektronische Datenverarbeitung

Als Rechner dienten PENTIUM- (INTEL, Santa Clara, USA) und ATHLON- (AMD, Sunnyvale, USA) PCs mit WINDOWSNT- oder WINDOWS2000-Betriebssystem (MICROSOFT, Redmond, USA).

Computergestützte Analysen von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Software LASERGENE (DNASTAR, Madison, USA) durchgeführt. Plasmidübersichten mit Restriktionsschnittstellen wurden mit dem NEBCUTTER ([www.neb.com](http://www.neb.com)) erstellt. Datenbankrecherchen

erfolgten an den Servern des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, USA: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Elektrophysiologische Berechnungen wurden mit den Programmen CLAMPFIT (AXON INSTRUMENTS, Union City, USA) und EXCEL (MICROSOFT, Redmond, USA) durchgeführt.

Analysen der Kristallstrukturen wurden mit DS VIEWERPRO (ACCELRY'S INC, San Diego, USA) durchgeführt.

Abbildungen wurden mit POWERPOINT (MICROSOFT, Redmond, USA) erzeugt.

Als Textverarbeitung diente WORD (MICROSOFT, Redmond, USA).

## 5. Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist das 320 Aminosäuren umfassende Plasmamembranprotein Barttin die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit der ClC-K-Kanäle [Birkehäger et al., 2001] [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002]. Barttin ist essentiell für eine funktionelle Oberflächenexpression der Chloridkanäle ClC-Ka, ClC-Kb und ClC-K1, was u.a. in *Xenopus-laevis*-Oozyten gezeigt werden konnte [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002].

Die Stöchiometrie des Komplex' aus ClC-K und Barttin ist allerdings nicht geklärt, auch ist eine direkte Interaktion von ClC-K mit Barttin noch nicht zufriedenstellend bewiesen. Koimmunpräzipitationsstudien an ClC-Kb und Barttin, die in unserem Labor durchgeführt wurden, weisen aber bereits daraufhin [Meyer, 2003].

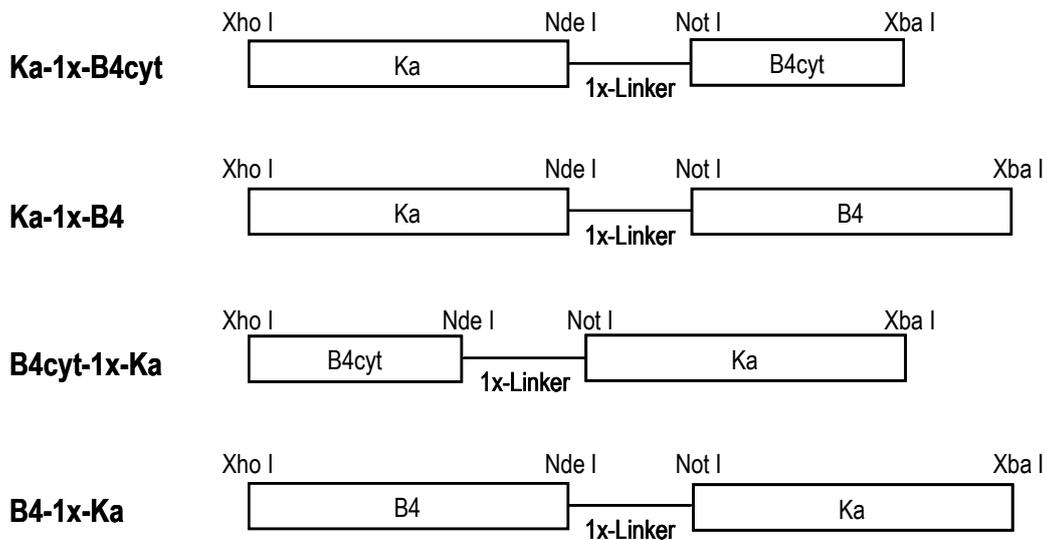
Die Signale, die für die Zielsteuerung des Komplex' zur Zelloberfläche verantwortlich sind bzw. die Oberflächenexpression regulieren, sind nicht bekannt. Über ein eventuelles PY-Motiv im C-terminalen Abschnitt von Barttin, das die Oberflächenexpression beeinflusst, wurde spekuliert [Estevez et al., 2001].

## 5.1. Funktionsanalyse von ClC-K/Barttin-Konstrukten

Der Begriff «Konstrukt» steht in diesem Zusammenhang für Tripel-Fusionsproteine bestehend aus ClC-K, einem Peptid-Bindeglied und Barttin (bzw. Teilproteinen von Barttin).

In diesem ersten Abschnitt der Arbeit sollen Hinweise auf die Stöchiometrie des Komplex' und auf mögliche Sortierungssignale im C-terminalen Abschnitt von Barttin gewonnen werden.

Der ClC-Ka-Kanal wurde zum einen mit einem vollständigen Barttin-Protein und zum anderen mit einem Barttin-Protein verbunden, dem der N-terminale Abschnitt mit seinen Transmembrandomänen fehlt. Die Verbindung wurde dabei mittels einer prolinreichen Aminosäuresequenz als bewegliches Bindeglied («1x-Linker» mit 33 Aminosäuren) hergestellt [Gründer et al., 1992]. Da jeweils beide Orientierungen der zwei miteinander verknüpften Proteine untersucht werden sollten, ergaben sich so vier Konstrukte (Fusionsproteine). Aufgrund der Eigenschaften der Barttin-Punktmutante Y98A (höhere Ströme durch höhere Oberflächenexpression [Estevez et al., 2001]), wurde zusätzlich diese Mutation in das WT-Barttin eingefügt, um die funktionelle Analyse der Konstrukte zu vereinfachen.

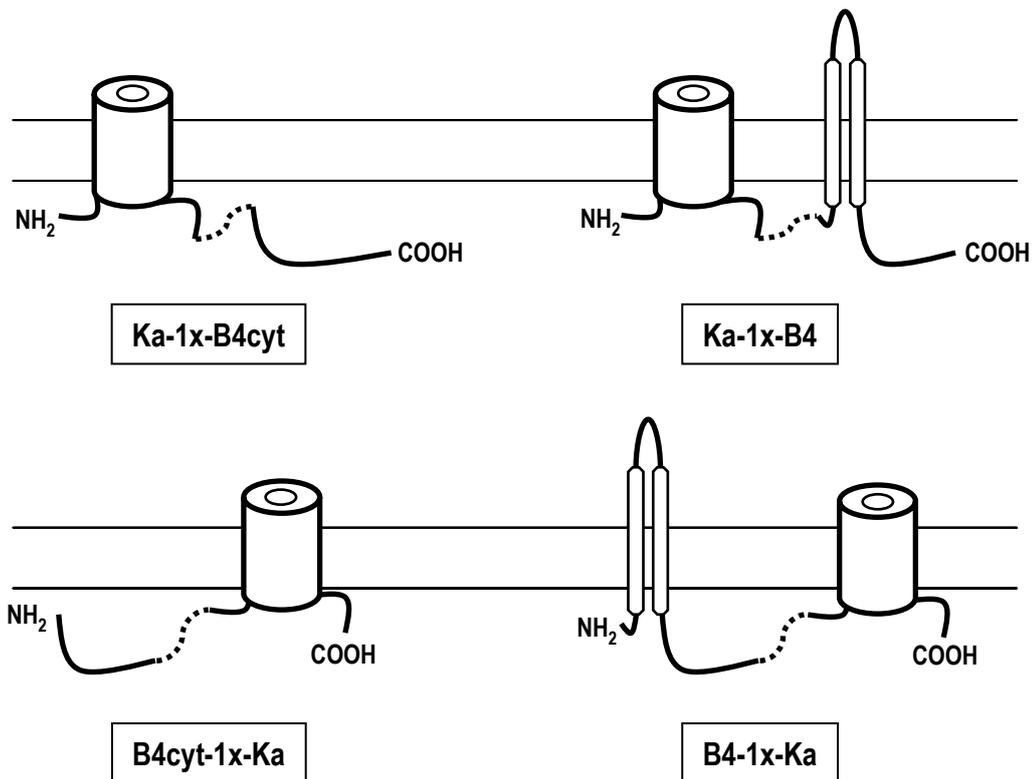


#### Abb. 5.1. Klonierungsstrategie der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte

Die kodierenden DNA-Sequenzen für CIC-Ka (Ka), Barttin (B4), den zytoplasmatischen C-terminalen Abschnitt von Barttin (B4cyt: Barttin, dem der N-terminale Abschnitt mit den Transmembrandomänen fehlt) sowie für das 33 Aminosäuren umfassende Bindeglied (1x-Linker) wurden mittels PCR amplifiziert und dabei mit Restriktionsschnittstellen versehen (siehe Abschnitt «Methoden»). Gleichzeitig wurde das Stopp-Codon der jeweils ersten proteinkodierenden Einheit entfernt, um eine vollständige Transkription der Konstrukte zu gewährleisten. Das Konstrukt B4cyt-2x-Ka wurde mit einem Start-Codon versehen. Der Linker wurde jeweils mit Nde I- und Not I-Schnittstellen eingefügt. Alle Konstrukte wurden über Xho I vor dem Start-Codon (5'wärts) und Xba I hinter dem Stopp-Codon (3'wärts) in pTLB kloniert.

Die in Abb. 5.1. schematisch dargestellten Konstrukte wurden in den Vektor p-TLB kloniert, die RNA der Konstrukte mittels *in-vitro*-Transkription synthetisiert und in die *Xenopus-laevis*-Oozyten injiziert. Die Oozyten wurden zur Expression der Proteine anschließend für drei Tage bei 17°C in BARTHS Lösung inkubiert.

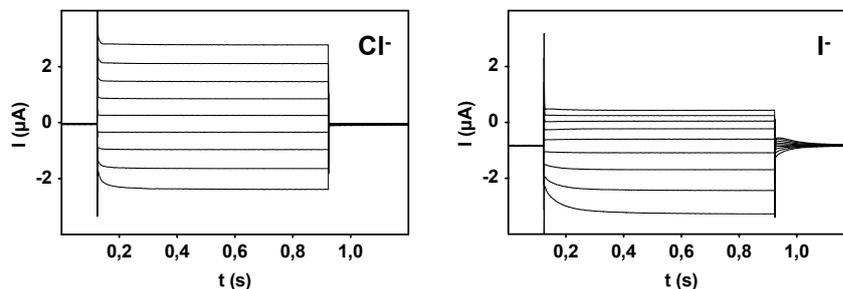
Mit Hilfe der *Voltage-Clamp*-Technik wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Konstrukte überprüft. Die Konstrukte, die neben CIC-Ka ein vollständiges Barttin enthalten, sollten Hinweise auf die Stöchiometrie des Komplex' liefern. Die Konstrukte, die neben CIC-Ka lediglich den zytoplasmatischen C-terminalen Abschnitt von Barttin enthalten (die N-terminalen Transmembrandomänen fehlen), sollten zur Klärung der Fragestellung dienen, ob der sehr kurze N-Terminus und die beiden Transmembrandomänen von Barttin für eine funktionelle Oberflächenexpression notwendig sind oder ob Signale im C-terminalen Abschnitt von Barttin dafür ausreichen, CIC-Ka zu aktivieren.



**Abb. 5.2. Schematische Darstellung der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte**

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau der Fusionsproteine in der Membran. Die Transmembrandomänen von CIC-Ka sind vereinfacht als ein weißer Zylinder mit Kanalpore dargestellt. Die beiden mutmaßlichen Transmembrandomänen von Barttin sowie ihre extrazelluläre Verbindung sind – sofern im Konstrukt vorhanden – abgebildet. Beim verkürzten Barttin (B4cyt) wurden die ersten 54 Aminosäuren von Barttin entfernt, d.h. die Region der Transmembrandomänen. Der Linker ist gepunktet dargestellt.

### 5.1.1. Eigenschaften von CIC-Ka/Barttin



**Abb. 5.3. Elektrophysiologische Eigenschaften des Komplexes aus CIC-Ka/Barttin**

Die Abbildung zeigt repräsentative Voltage-Clamp-Messungen einer CIC-Ka und Barttin exprimierenden Oozyte in ND96 (links) und 1 Minute nach Umspülung mit einer ND96-Lösung, in der NaCl durch äquimolare Mengen an NaI ersetzt wurde (rechts). Die Oozyte wurde mit 10 ng CIC-Ka-RNA und 5 ng Barttin-RNA injiziert und drei Tage in BARTHS Lösung inkubiert.

Die Abb. 5.3. zeigt die elektrophysiologischen Eigenschaften von CIC-Ka/Barttin nach heterologer Expression in *Xenopus-laevis*-Oozyten (Pulsprotokoll siehe Abschnitt

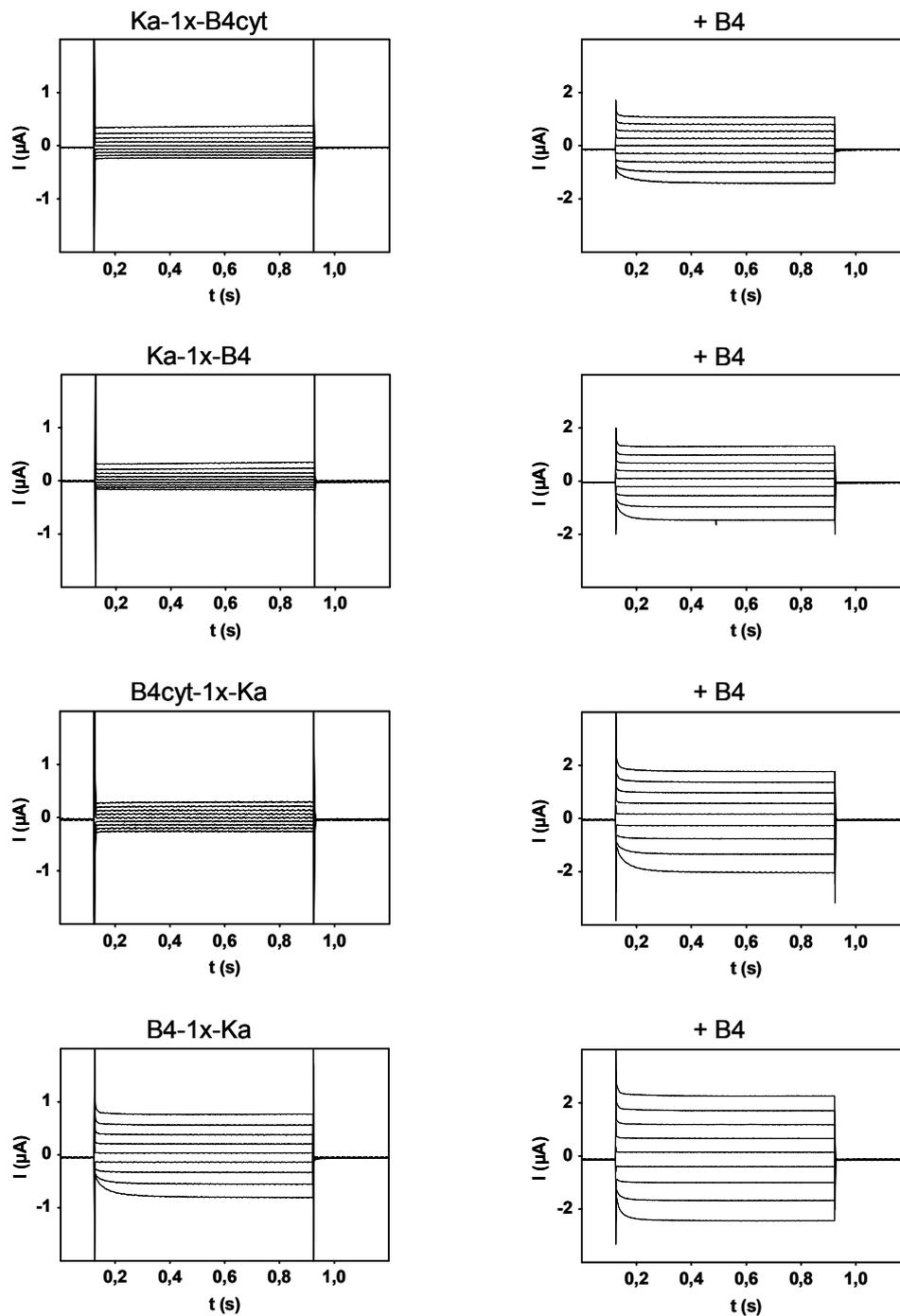
«Methoden»). Der ClC-Ka/Barttin-Chloridstrom ist nicht rektifizierend. Er zeigt zu Beginn bei negativen Membranpotentialen eine Aktivierung (Aktivierung des Chloridausstroms) sowie eine minimale Inaktivierung bei positiven Membranpotentialen (Inaktivierung des Chlorideinstroms). Im stationären Zustand («*steady state*») ist das Strom-Spannungs-Verhältnis annähernd linear. Das Umkehrpotential liegt bei -30 mV.

Um geringe ClC-K-Ströme zweifelsfrei von Strömen durch endogene *Xenopus-laevis*-Kanäle zu unterscheiden, wurde die Ionenselektivität der Kanäle überprüft. Da für ClC-Kanäle im Gegensatz zu endogenen *Xenopus-laevis*-Strömen gilt, dass Chlorid besser geleitet wird als Iodid [Jentsch et al., 1999] [Estevez et al., 2001] [Jentsch et al., 2002], wurde Chlorid in der extrazellulären Flüssigkeit gegen Iodid getauscht. Die Abb. 5.3. rechts zeigt exemplarisch die Stromantworten einer ClC-Ka/Barttin exprimierenden Oozyte, nachdem Chlorid in der extrazellulären Lösung gegen Iodid ausgetauscht wurde. Die veränderten Eigenschaften zeigen, dass es sich hier um einen Membranstrom handelt, der durch einen Kanal der ClC-Familie vermittelt wird. Dieser «Iodid-Test» wurde bei allen Voltage-Clamp-Messungen durchgeführt, um die zum Teil geringen ClC-Ströme von endogenen *Xenopus-laevis*-Strömen abzugrenzen.

### 5.1.2. Eigenschaften der ClC-Ka/Barttin-Konstrukte

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der ClC-Ka/Barttin-Konstrukte bei heterologer Expression in *Xenopus-laevis*-Oozyten sind in Abb. 5.4. dargestellt. Die drei Konstrukte Ka-1x-B4cyt, Ka-1x-B4 und B4cyt-1x-Ka ergaben keinen ClC-Ka/Barttin-Strom. Anders verhielt sich B4-1x-Ka, das einen charakteristischen ClC-Ka/Barttin-Strom zeigte (Abb. 5.4. unten links). Um die Funktionalität des ClC-Ka-Kanals der Konstrukte zu überprüfen und somit gleichzeitig die Expression der Konstrukte durch die Oozyte zu untersuchen, wurden die Konstrukte zur Kontrolle mit Barttin (Y98A) koexprimiert, was auch bei den drei allein nicht-funktionellen Konstrukten zu ClC-Ka/Barttin-Strömen führte. Der Strom des auch allein funktionellen Konstrukts B4-1x-Ka erfuhr in dieser Hinsicht durch zusätzliches Barttin eine Zunahme der Amplitude. Da alle Konstrukte durch die Koexpression mit Barttin die Eigenschaften von ClC-Ka/Barttin zeigten, muss folglich der ClC-Ka-Kanal der Konstrukte funktionell sein (Abb. 5.4. rechts).

Die Koexpression mit zusätzlichem ClC-Ka führte dagegen nicht zu einer Aktivierung der Konstrukte. Bei den Versuchen zur Koexpression von B4-1x-Ka mit zusätzlichem ClC-Ka, die auch mit unterschiedlichen RNA-Mengen-Verhältnissen durchgeführt wurden, war die Leitfähigkeit in der Mehrzahl der Fälle geringer, maximal gleich groß – verglichen mit der Stromhöhe von B4-1x-Ka nach alleiniger Expression. Eine Aktivierung des Konstrukts wurde im Gegensatz zur Koexpression mit Barttin nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

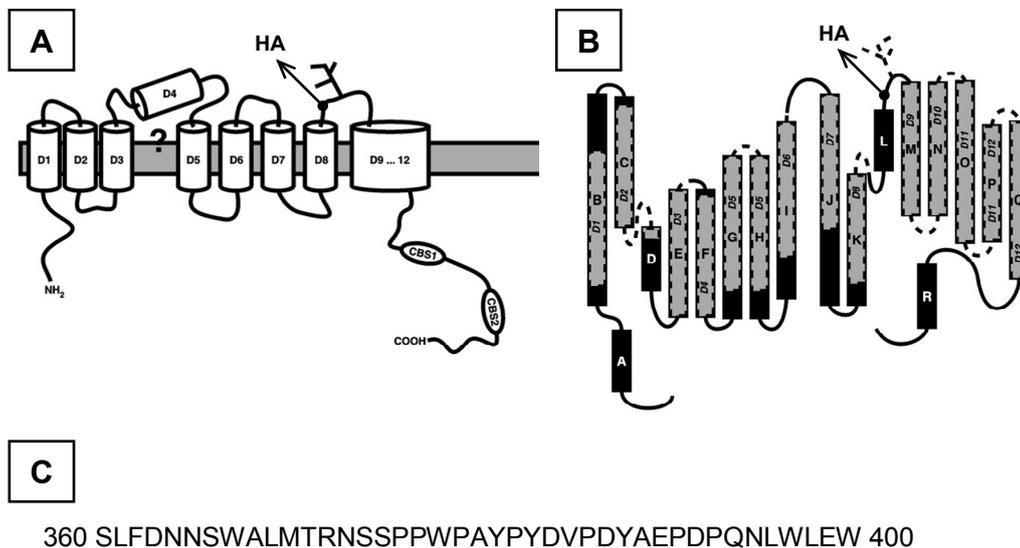


**Abb. 5.4. Elektrophysiologische Eigenschaften der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte**

Die Abbildung zeigt repräsentative Ströme in *Xenopus-laevis*-Oozyten nach Expression der Konstrukte (links) sowie nach Koexpression des jeweiligen Konstrukts mit zusätzlichem Barttin Y98A (rechts daneben). Die Messungen erfolgten in ND96-Lösung bei Raumtemperatur. Bei alleiniger Expression der Konstrukte wurden jeweils 15 ng RNA eingesetzt. Für die Koexpression wurden jeweils 10 ng Konstrukt-RNA zusammen mit 5 ng Barttin-RNA injiziert.

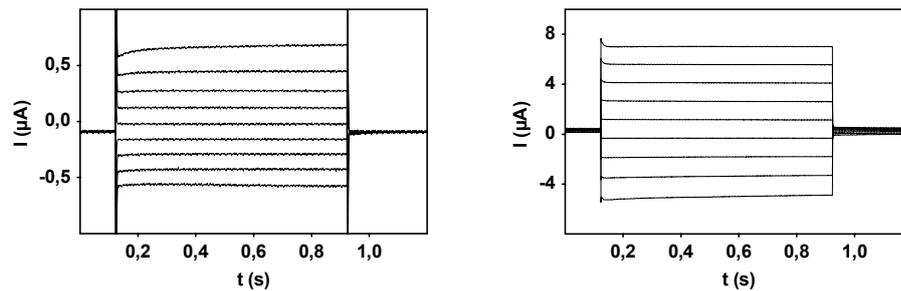
### 5.1.3. Extrazelluläre HA-Epitop-Markierung von CIC-K1

Für die Messung der Oberflächenexpression von Proteinen in *Xenopus-laevis*-Oozyten müssen diese Proteine an einer extrazellulär gelegenen Stelle mit einem Epitop versehen werden, das durch spezifische Antikörper erkannt werden kann. Da bei den CLC-Kanälen sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus intrazellulär gelegen sind und diese Bereiche somit ausscheiden, wurde mit Hilfe der rekombinanten PCR ein HA-Epitop in ein extrazelluläres Verbindungsstück zwischen zwei Transmembrandomänen von CIC-K1 eingefügt. Die Position wurde korrespondierend zu der Lage des HA-Epitops gewählt, das Estevez et al. in CIC-Ka eingefügten [Estevez et al., 2001] – nämlich zwischen den Transmembrandomänen D8 und D9, was in der Kristallstruktur den Transmembrandomänen K und M entspricht (siehe Abb. 5.5).



**Abb. 5.5. Position des HA-Epitops in CIC-K1**

A zeigt das Topologiemodell einer CIC-Untereinheit basierend auf biochemischer Analyse [Schmidt-Rose und Jentsch, 1997b]. Die Regionen um D4 sowie um D9 bis D12 konnten nicht eindeutig analysiert werden. Das HA-Epitop wurde zwischen D8 und D9 in der Nähe der Glykosylierungsregion (Baumstruktur) eingefügt. B zeigt das Topologiemodell einer bakteriellen CIC-Untereinheit, abgeleitet von der dreidimensionalen Kristallstruktur [Dutzler et al., 2002]. Zum Vergleich mit dem biochemischen Strukturmodell ist die ältere Bezeichnung der CIC-Domänen (D1 bis D12) als schattierte Fläche mit gezeigt. Nach dem Sequenzvergleich der bakteriellen Kanäle ecCIC und stCIC mit den CIC-K-Kanälen befindet sich das HA-Epitop in CIC-K1 nach diesem Modell im Bereich zwischen den Domänen K und M. Die Position zur Domäne L ist unklar, da die Homologie der CIC-K-Kanäle zu den bakteriellen Kanälen an dieser Stelle gering ist. C zeigt die Primärstruktur von CIC-K1 mit eingefügtem HA-Epitop nach Aminosäure-Position 380 (unterstrichen). A und B modifiziert nach Jentsch et al. [Jentsch et al., 2002] [Dutzler et al., 2002].



#### Abb. 5.6. Elektrophysiologische Eigenschaften von CIC-K1HA

Die Abbildung zeigt repräsentative Ströme in *Xenopus-laevis*-Oozyten nach Expression von CIC-K1HA (links) und nach Koexpression von CIC-K1HA/Barttin(Y98A) (rechts). Der Stromcharakter ist identisch mit den Strömen von CIC-K1 bzw. CIC-K1/WT-Barttin wie sie beispielsweise auch von Waldegger et al. gezeigt wurden [Waldegger et al., 2002].

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von CIC-K1 wurden durch die Epitopmarkierung nicht verändert. Auch nach Koexpression mit Barttin ergaben sich für CIC-K1 und «CIC-K1HA» vergleichbare Ströme (Abb. 5.6.).

#### 5.1.4. Eigenschaften der CIC-K1/Barttin-Konstrukte

Auf der Grundlage der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte und den Ergebnissen der anfänglichen Untersuchungen wurden weitere modifizierte Konstrukte generiert. So wurde wegen der relativ kleinen Ströme der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte der humane CIC-Ka durch den orthologen Kanal der Ratte (CIC-K1) ersetzt, für den höhere Stromamplituden gezeigt werden konnten [Estevez et al., 2001].

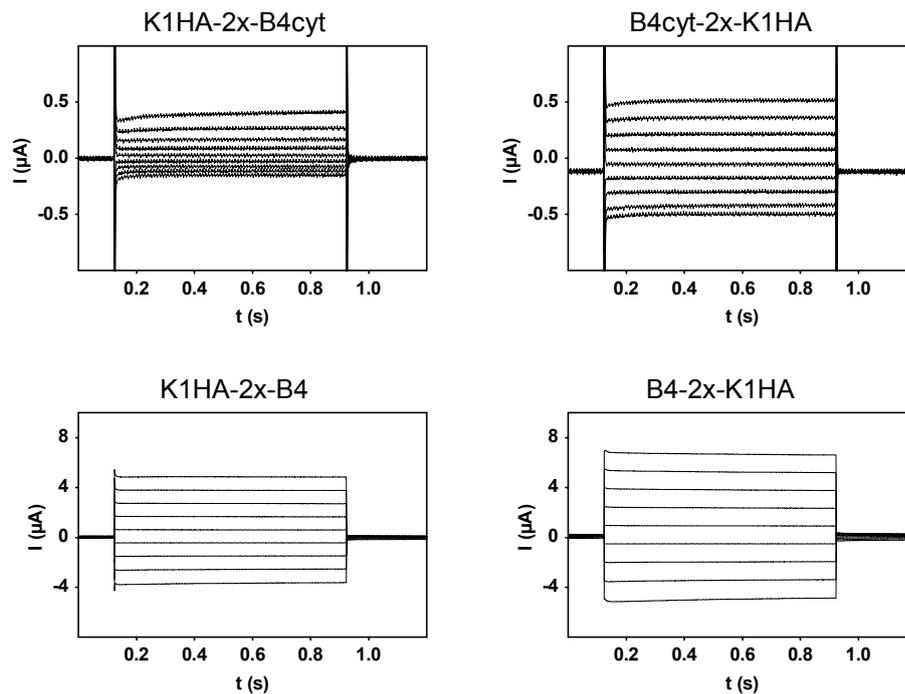
Weiterhin führte die Beobachtung, dass das Konstrukt B4-1x-Ka im Gegensatz zur umgekehrten Orientierung (Ka-1x-B4) funktionell war, zu der Überlegung, dass der 1x-Linker verknüpft mit dem nur sehr kurzen zytoplasmatischen N-terminalen Abschnitt von Barttin möglicherweise die korrekte Ausrichtung der beiden Proteine zueinander bzw. der homomeren Konstrukte untereinander behindert. Deshalb wurde die Länge des Linkers auf 66 Aminosäuren verdoppelt («2x»-Linker).

Um neben den elektrophysiologischen Eigenschaften auch die Oberflächenexpression der Konstrukte beurteilen zu können, wurde CIC-K1 zur Durchführung eines Oberflächen-Assays extrazellulär mit einem HA-Epitop versehen (s.o.) und gleichzeitig auch Konstrukte mit diesem HA-markierten CIC-K1 erzeugt.

### 5.1.4.1. Elektrophysiologische Eigenschaften

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der CIC-K1/Barttin-Konstrukte wurden ebenfalls mittels *Voltage-Clamp* in *Xenopus-laevis*-Oozyten analysiert.

Die Konstrukte bestehend aus HA-markiertem CIC-K1 und vollständigem Barttin Y98A bzw. verkürztem Barttin Y98A wurden – wie bereits oben erwähnt – mit einem längeren Bindeglied («2x-Linker») verknüpft als die CIC-Ka/Barttin-Konstrukte.



**Abb. 5.7. Elektrophysiologische Eigenschaften der CIC-K1/Barttin-Konstrukte**

Die Abbildung zeigt repräsentative Ströme in *Xenopus-laevis*-Oozyten nach Expression der Konstrukte bestehend aus HA-markiertem CIC-K1 (CIC-K1HA) und vollständigem Barttin Y98A (B4) bzw. verkürztem Barttin Y98A (B4cyt) nach Injektion von jeweils 15 ng Konstrukt-RNA und dreitägiger Inkubation in BARTHS Lösung. Die Benennung der Konstrukte ist analog der der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte. Das zuerst aufgeführte Protein bildet den N-Terminus, das hinten aufgeführte den C-Terminus. «2x» steht für den auf 66 Aminosäuren verdoppelten Linker. (Vgl. Abb. 5.4. links; Vgl. Abb. 5.6.)

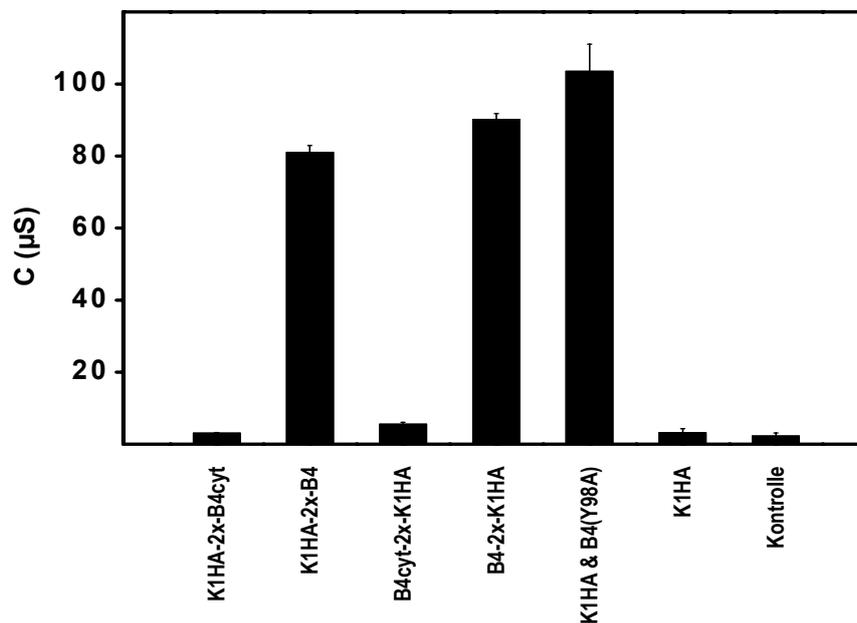
Insgesamt bestätigten die CIC-K1/Barttin-Konstrukte die Daten der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte. Die Konstrukte mit verkürztem Barttin (B4cyt) zeigten nur sehr geringe Stromantworten, vergleichbar der Stromantwort nach alleiniger Expression von CIC-K1. Die Konstrukte mit vollständigem Barttin (B4) zeigten Ströme wie CIC-K1 und Barttin koexprimierende Oozyten (Abb. 5.7.; Abb. 5.6.). Im Unterschied zu den CIC-Ka/Barttin-Konstrukten sind hier beide Orientierungen funktionell.

Die Koexpression mit zusätzlichem vollständigem Barttin führte wie bei den CIC-Ka/Barttin-Konstrukten zur Aktivierung der beiden Konstrukte mit verkürztem Barttin (Daten nicht gezeigt). Koexpression mit zusätzlichem CIC-K1 führte nicht zu höheren Strömen (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 5.8. sind ergänzend die Leitfähigkeiten der CIC-K1/Barttin-Konstrukte aufgeführt. Als Kontrolle dienten K1HA-exprimierende, K1HA- und Barttin-koexprimierende Oozyten sowie uninjizierte Oozyten («Kontrolle»). In einem weiteren Versuch wurde anschließend die Oberflächenexpression ermittelt (s.u.).

Grundsätzlich kann eine Zunahme des Stroms in *Xenopus-laevis*-Oozyten zum einen auf einer höheren Anzahl funktioneller Kanäle in der Plasmamembran beruhen, zum anderen führt aber auch eine Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit oder der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zu größeren Strömen.

Die folgende Untersuchung der Oberflächenexpression der HA-markierten Konstrukte sollte darüber Auskunft geben, ob der größere Stromfluss der funktionellen Konstrukte auf einer erhöhten Anzahl von Kanälen in der Membran beruht und ob die Konstrukte mit verkürztem Barttin, die ja wie CIC-K1 nur sehr geringe Ionenleitfähigkeiten besitzen, im Vergleich zu CIC-K1 vermehrt die Zelloberfläche erreichen, beispielsweise aufgrund von Sortierungssignalen im Abschnitt des verkürzten Barttins.



**Abb. 5.8. Leitfähigkeiten der CIC-K1HA/Barttin-Konstrukte mit 2x-Linker**

Die Abbildung zeigt die gemittelten Leitfähigkeiten von Oozyten nach Expression von HA-markierten Konstrukten mit den entsprechenden Kontrollen. Folgende RNA-Mengen wurden injiziert: HA-markierte Konstrukte 15 ng, CIC-K1HA 10 ng, Barttin Y98A 5 ng. Die Messung erfolgte 3 Tage nach Injektion.

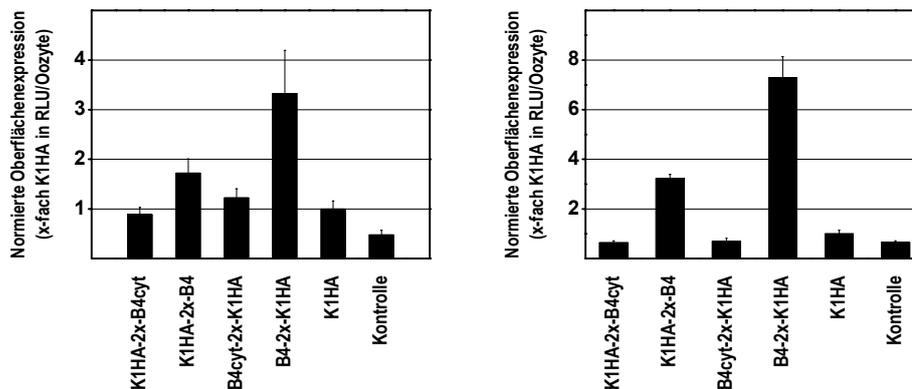
#### 5.1.4.2. Oberflächenexpression

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlich hohen Leitfähigkeiten der Konstrukte auf eine erhöhte Anzahl von Kanälen in der Plasmamembran der Oozyte zurückzuführen sind, wurde die Oberflächenexpression der extrazellulär HA-markierten Konstrukte bestimmt.

Oozyten, die verkürzte Konstrukte exprimierten, zeigten keinen deutlichen Unterschied in der Oberflächenexpression im Vergleich zu Oozyten, die CIC-K1HA allein exprimierten. Die verkürzten Konstrukte unterscheiden sich also weder in den elektrophysiologischen Eigenschaften noch in der Oberflächenexpression von CIC-K1HA.

Dagegen war die Oberflächenexpression der Konstrukte mit vollständigem Barttin höher als die von CIC-K1HA (Abb. 5.9.). Insbesondere das Konstrukt B4-2x-K1HA erreicht in signifikant höherem Ausmaß die Zelloberfläche ( $p < 0,025$ ).

Die Zunahme der Oberflächenexpression der vollständigen Konstrukte im Vergleich zu CIC-K1HA erklärt die starke Zunahme der Leitfähigkeit (ca. Faktor 10) allerdings nur teilweise.



**Abb. 5.9. Oberflächenexpression der CIC-K1/Barttin-Konstrukte**

Die Abbildung zeigt die jeweils auf K1HA (CIC-K1HA) normierte Oberflächenexpression von zwei Oozytenpräparationen als x-fach K1HA in RLU/Oozyte. Die Oberflächenexpression der Konstrukte mit vollständigem Barttin war höher im Vergleich zu CIC-K1HA. Folgende RNA-Mengen wurden injiziert: HA-markierte Konstrukte 15 ng, CIC-K1HA 10 ng. Die Messungen erfolgten 3 Tage nach Injektion mit dem HA-Antikörper 3F10 und F(ab)2 als Zweitantikörper.

Die Messung der Oberflächenexpression von CIC-K1HA- und Barttin- koexprimierenden Oozyten gleichzeitig mit den Konstrukten war nicht zweifelsfrei möglich. Bei allen durchgeführten Untersuchungen erwies sich CIC-K1HA/Barttin immer wieder als toxisch für die Oozyten, vor allem bei einer Expression über mehr als 2 Tage. Dieses gilt besonders für die hier eingesetzte Mutation Y98A, die den Strom durch die Membran im Vergleich zu WT-Barttin noch zusätzlich erhöht. Die *Voltage-Clamp*-Messung war nach drei Tagen Expression noch möglich, da lebende Oozyten neben der optischen Kontrolle anhand ihres Ruhemembranpotentials identifiziert werden konnten. Die sich anschließende Versuchsdurchführung der Oberflächenexpressionsmessung (alle Schritte bei 4°C und bei sehr häufigem Waschen über mehrere Stunden) überlebte wiederholt nur ein geringer Prozentsatz der CIC-K1HA- und Barttin-koexprimierenden Oozyten (optische Kontrolle), so dass diese Messdaten nicht auswertbar waren. Das Problem bestand darin, dass die Konstrukte erst nach drei Tagen Expression einen Strom zeigten, die CIC-K1HA- und Barttin-koexprimierenden Oozyten dagegen aber bereits nach 1,5 Tagen hohe Ströme ergaben. Der dabei auftretende osmotische Stress (hohe Chloridleitfähigkeit über der Oozytenmembran) begründet die geringe Überlebensrate dieser Oozyten nach drei Tagen Expression.

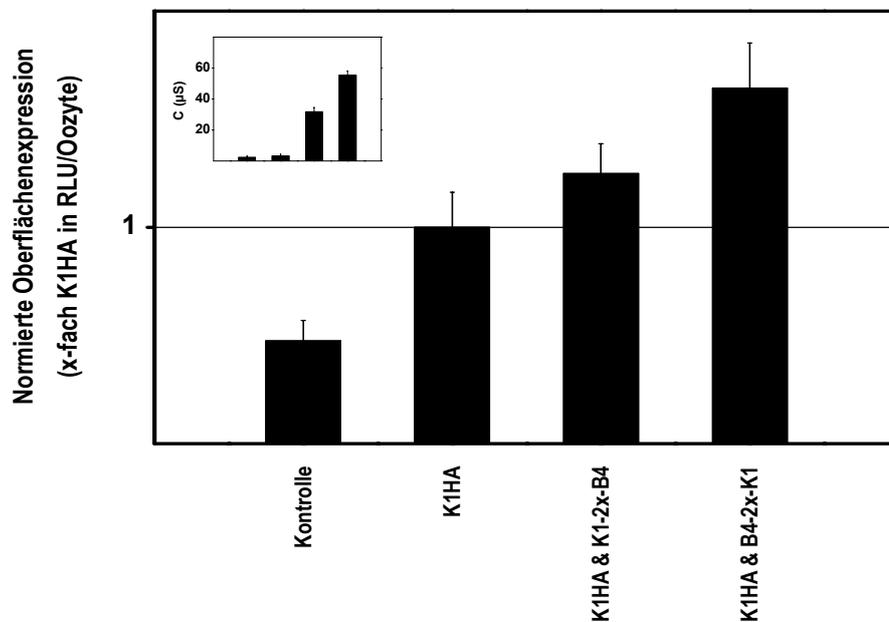
#### 5.1.4.3. Koexpression nicht Epitop-markierter Konstrukte mit HA-markiertem CIC-K1

Eine Koexpression von vollständigen (funktionellen), nicht markierten Konstrukten mit CIC-K1HA und anschließender Messung der Oberflächenexpression sollte zeigen, ob CIC-K1HA mit Hilfe der Konstrukte vermehrt die Zelloberfläche erreicht, was auf eine

Interaktion der Konstrukte mit CIC-K1HA hindeuten würde bzw. für eine Assoziation der beiden Komponenten spräche.

Für die Koexpression mit dem Konstrukt B4-2x-K1, bei dem Barttin also die vordere (N-terminale) Position einnimmt, ergab sich eine signifikant höhere Oberflächenexpression von CIC-K1HA gegenüber Oozyten, die CIC-K1HA allein exprimierten. Da nur geringe Mengen des Konstrukts zusätzlich eingesetzt wurden (5 ng), spricht die größere Oberflächenexpression von CIC-K1HA hier für eine Assoziation des Konstrukts mit CIC-K1HA. Dieses Konstrukt bringt anscheinend zusätzliches CIC-K1HA an die Zelloberfläche.

Die Expression von funktionellen Oberflächenkomplexen wurde mittels *Voltage-Clamp* bewiesen.



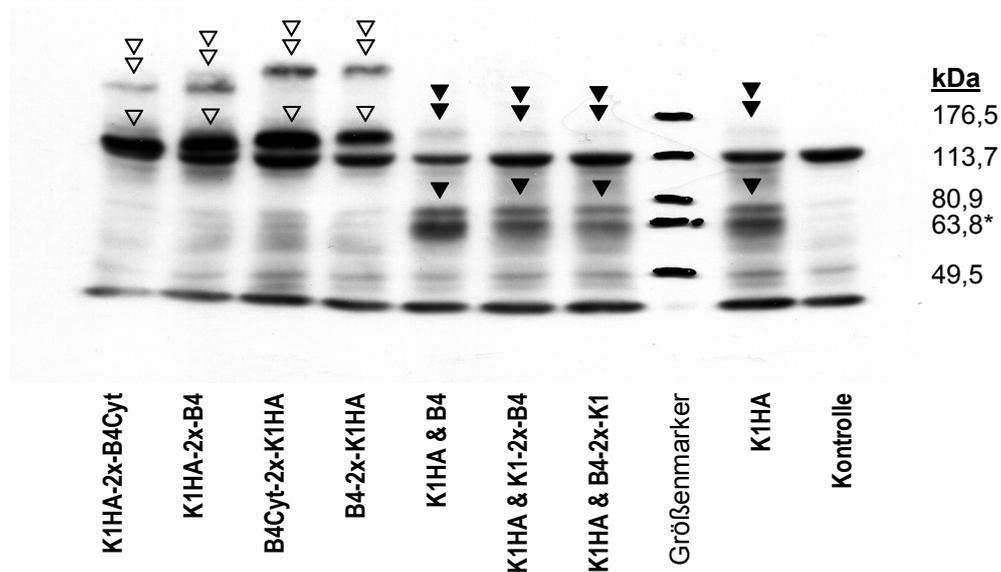
**Abb. 5.10. Oberflächenexpression von CIC-K1HA nach Koexpression mit Konstrukten**

Die Abbildung zeigt die auf CIC-K1HA normierte Oberflächenexpression nach Koexpression mit den nicht markierten, vollständigen Konstrukten in RLU/Oozyte (n=16). Die Oberflächenexpression von CIC-K1HA (K1HA) war nach Koexpression mit B4-2x-K1 signifikant höher als die von CIC-K1HA allein (p<0.025). Folgende RNA-Mengen wurden injiziert: CIC-K1HA 10 ng, nicht markierte Konstrukte 5 ng. Die Messung erfolgte 3 Tage nach Injektion mit dem HA-Antikörper 3F10 und F(ab)2 als Zweitantikörper. Die Leitfähigkeit der jeweiligen Messreihen ist ebenfalls angegeben (eingefügtes Diagramm).

#### 5.1.4.4. Western-Blot-Analyse

Um zu kontrollieren, dass alle Proteine, die in den gezeigten Analysen untersucht wurden, in ausreichendem Maße von den Oozyten exprimiert wurden und somit negative Ergebnisse (schwache Ströme, geringe Oberflächenexpression) nicht auf eine geringe Expression der Proteine zurückzuführen sind, wurden die Oozyten der Proteinpräparation mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender *Western-Blot*-Analyse zugeführt, in der das HA-Epitop der markierten Konstrukte und des markierten CIC-K1-Kanals (CIC-K1HA) detektiert werden sollte.

Während die Messung der Oberflächenexpression mit dem HA-Antikörper 3F10 der Ratte und Ziege-Anti-Ratte-F(ab)2 (HRP-konjugiert) als Zweitantikörper durchgeführt wurde, kamen hier der HA-Antikörper HA.11 der Maus zusammen mit einem Zweitantikörper des Schafs (Schaf-Anti-Maus, IgG H+L, HRP-konjugiert) zum Einsatz.



**Abb. 5.11. Western-Blot zur Kontrolle der durchgeführten Analysen**

Für jede Messreihe wurde das Proteinäquivalent einer Oozyte aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit HA.11 aus der Maus und Schaf-Anti-Maus (IgG (H+L) HRP-konjugiert). Die berechnete Größe der HA-markierten Proteine beträgt 112 kDa für Konstrukte mit verkürztem Barttin, 118 kDa für Konstrukte mit vollständigem Barttin (einfache Pfeilspitze >) sowie 77 kDa für CIC-K1HA (einfache Pfeilspitze >). Dimerisierte Einheiten sind mit einer doppelten Pfeilspitze >> bzw. >>> gekennzeichnet.

Die Oozyten, die mit RNA der HA-markierten Konstrukte injiziert wurden, zeigten wie erwartet eine Bande bei ca. 120 kDa (Abb. 5.11.>). Bei allen Oozyten, die mit CIC-K1HA-RNA

injiziert wurden, wurde eine CLC-typische Doppelbande bei 60-80 kDa detektiert (Abb. 5.11.►) [Kieferle et al., 1994] [Schwake et al., 2000] [Meyer, 2003].

Sowohl für die HA-markierten Konstrukte als auch für CIC-K1HA traten zusätzlich zu den zu erwartenden Banden jeweils eine zweite schwächere Bande bei doppelter Proteingröße auf. Für die Konstrukte wurde neben der Bande bei etwa 120 kDa eine zweite bei etwa 240 kDa detektiert (Abb. 5.11.▷▷), für CIC-K1HA zeigte sich neben der Doppelbande bei etwa 70 kDa eine weitere bei etwa 140 kDa (Abb. 5.11.►► hier druckbedingt nur schwach zu erkennen). Es dürfte sich hier um homodimerisierte Konstrukte und CIC-K1HA-Kanäle handeln. In unserer Arbeitsgruppe wurden Homodimere aus CIC-K-Kanälen, d.h. aus CIC-K-Untereinheiten, im *Western-Blot* bereits gezeigt [Waldegger und Jentsch, 2000] [Meyer, 2003].

Heterodimere bestehend aus den beiden jeweils nicht markierten Konstrukten und CIC-K1HA konnten nicht eindeutig detektiert werden.

Das Missverhältnis zwischen Laufverhalten und berechneter Proteingröße bei Membranproteinen beruht auf ihren großen hydrophoben Bereichen (Transmembrandomänen). Zusätzlich können posttranslationale Modifikationen die Proteingröße verändern (Glykosylierung) [Kieferle et al., 1994].

Die Proteinlösungen der Oozyten wurden vor der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nur auf 55°C erhitzt und nicht wie allgemein üblich bis 95°C, da Membranproteine bei hohen Temperaturen aufgrund ihrer lipophilen Transmembrandomänen zur Aggregation neigen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass es sich hier um unspezifische Aggregate handelt.

## 5.2. Untersuchungen zur Regulation von CIC-K/Barttin

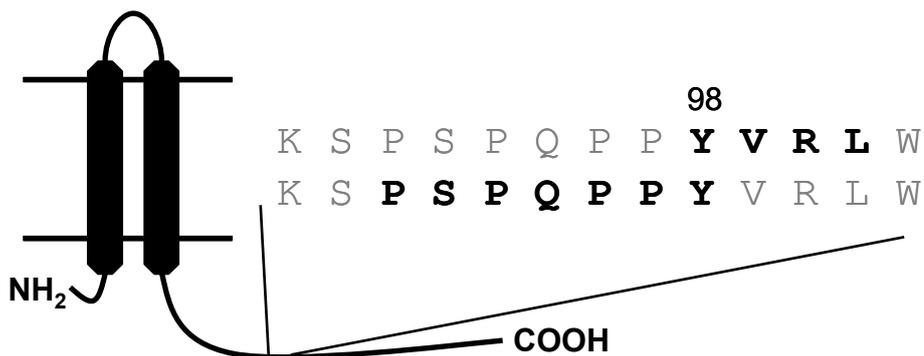
In diesem zweiten Abschnitt der Arbeit sollten Hinweise auf Regulationsmechanismen des Komplex' aus CIC-K/Barttin gewonnen werden. Da gezeigt wurde, dass Barttin in der Lage ist, den Komplex an die Zelloberfläche zu bringen, und dass die Mutation Y98A gegenüber dem WT-Barttin zu einer Erhöhung des Stroms und der Oberflächenexpression führt [Estevez et al., 2001], sollte Barttin nun auf Regulationsmechanismen untersucht werden, die die Leitfähigkeit bzw. die Oberflächenexpression des Komplex' beeinflussen. Insbesondere die Region um Y98 aber auch der übrige C-terminale Abschnitt von Barttin könnten Signale enthalten, die in solche Regulationsmechanismen involviert sind.

### 5.2.1. Mutationsanalyse der Barttin-Region um Y98

Die Barttin-Mutation des Tyrosin-Aminosäurerests 98 zu Alanin (Y98A) resultierte in einem höheren Strom bei erhöhter Oberflächenexpression des Komplex' CIC-K/Barttin. Dieser Tyrosin-Rest ist demnach an der Regulation der Oberflächenexpression beteiligt. Zusammen mit der Tatsache, dass sich vor Y98 mehrere Prolin-Reste befinden, führte diese Beobachtung zu der Vermutung, Y98 könne Teil eines PY-Motivs sein, das mit einer Ubiquitin-Ligase interagiert [Estevez et al., 2001].

Die Barttin-Primärstruktur um Y98 zeigt, dass das Tyrosin 98 auch Teil eines Tyrosin-basierten Sortierungsmotivs sein kann. Diese Motive haben die Konsensus-Sequenz YXX $\Phi$ , im vorliegenden Fall YVRL. Dieses steht nicht im Widerspruch zu der Annahme, dass es sich hier auch um ein PY-Motiv handelt [Estevez et al., 2001]; denn es wurden bereits überlappende Motive beschrieben [Thomas et al., 2003]. Im Connexin 43 (Cx43) ist die Sequenz SPPGYKLV sowohl als PY-Motiv der Form XPPXY als auch als Tyrosin-basiertes Motiv der Form YXX $\Phi$  beschrieben, wobei letzterem die größere Bedeutung zukommt [Thomas et al., 2003].

Es ist also durchaus möglich, dass die Oberflächenexpression von Barttin bzw. des CIC-K/Barttin-Komplex' sowohl mittels einer Ubiquitin-Ligase als auch mittels der AP-Komplexe reguliert wird.



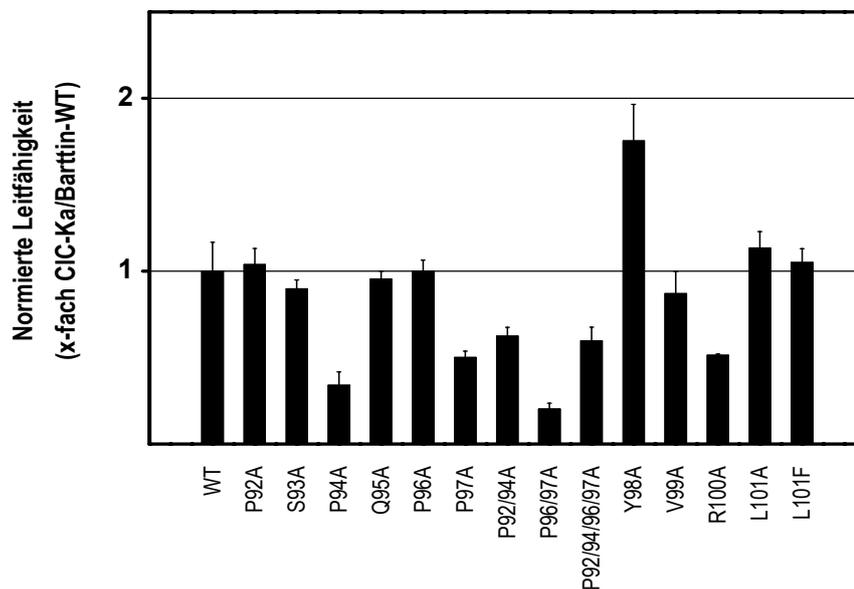
**Abb. 5.12. Potentielle Signalmotive der Barttin-Region um Y98**

Die Abbildung zeigt die Topologie von Barttin zusammen mit einem Teil seiner Primärstruktur um Y98. Die beiden potentiellen Signalmotive sind jeweils in einer Proteinsequenz fett markiert. Das Peptid YVRL könnte als Tyrosin-basiertes Sortierungssignal (YXXΦ) fungieren, das mit den  $\mu$ -Untereinheiten der AP-Komplexe interagiert. Die Sequenz PSPQPPY oder ein Teil von ihr ist möglicherweise ein PY-Motiv, das mit einer Ubiquitin-Ligase interagiert.

Eine Mutationsanalyse der Barttin-Region um Y98 sollte erste Anhaltspunkte liefern, ob ein PY-Motiv, ein Tyrosin-basiertes Motiv oder beide Motive gleichzeitig vorliegen. Dazu wurde mittels rekombinanter PCR jede Aminosäure der Region P92 bis L101 zu Alanin mutiert. Zusätzlich wurde die Mutante L101F sowie zwei doppelte Mutanten (P92/94A, P96/97A) und eine vierfache Mutante (P92/94/96/97A) erstellt. Die Klonierung erfolgte in Zusammenarbeit mit Ingo Kurth und Raúl Estévez. Die Mutanten wurden daraufhin jeweils mit ClC-Ka koexprimiert und mit der Voltage-Clamp-Technik analysiert.

Die Mutation der Proline zu Alanin sollte die Bindung einer potentiellen Ubiquitin-Ligase an Barttin verhindern und somit in einem höheren Strom resultieren.

Die Mutation L101A sollte eine potentielle Interaktion des Motivs YXXΦ mit der  $\mu$ -Untereinheit des AP-Komplex' vermindern und dadurch ebenfalls den Membranstrom erhöhen. Für die Phenylalanin-Mutation (L101F) würde man erwarten, dass sie sich bei Vorliegen eines YXXΦ-Motivs wie WT-Barttin verhält, da es sich ebenfalls um eine große hydrophobe Aminosäure (Φ) handelt.



**Abb. 5.13. Leitfähigkeiten von CIC-Ka nach Koexpression mit Barttin-Mutationen**

Die Abbildung zeigt die auf CIC-Ka/Barttin-WT normierten Leitfähigkeiten von Mutationen in der Barttin-Region um Y98. Die Messungen erfolgten 3 Tage nach Injektion bei Raumtemperatur in ND96-Lösung. Es wurden 10ng RNA CIC-Ka mit 5ng RNA Barttin-WT bzw. Barttin-Mutante eingesetzt.

Die Abb. 5.13. zeigt die Leitfähigkeiten der Barttin-Mutanten nach Koexpression mit CIC-Ka. CIC-Ka/Barttin(Y98A) hatte, wie schon früher gezeigt wurde [Estevez et al, 2001], eine knapp doppelt so hohe Leitfähigkeit wie CIC-Ka/Barttin(WT).

Die Ergebnisse der Messungen der Mutationen in der potentiellen YXXΦ-Region waren unspezifisch. Die Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin(L101A) war nur geringfügig höher als die von CIC-Ka/Barttin(WT), so dass hier nicht eindeutig auf ein YXXΦ-Motiv geschlossen werden kann. Die Mutation R100A zeigte eine reduzierte Leitfähigkeit.

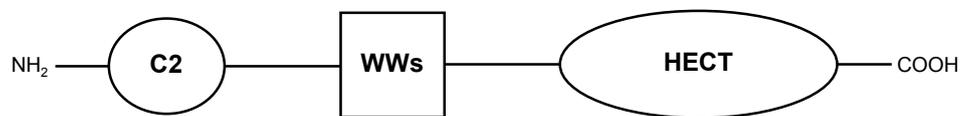
Keine der Prolin-Mutanten ergab mit CIC-Ka eine signifikant höhere Leitfähigkeit als CIC-Ka/Barttin(WT). Die Mutationen P92A und P96A zeigten einen Strom auf WT-Niveau, die anderen Prolin-Mutanten inklusive der beiden Doppel-Mutanten und der Vierfach-Mutante lagen deutlich darunter.

## 5.2.2. Untersuchung verschiedener potentieller Ubiquitin-Ligasen (E3s)

E3s erkennen ihre Substrate an spezifischen Ubiquitinierungssignalen (z.B. PY-Motive). Diese Signale binden an die Protein-Protein-Interaktionsdomänen der E3s, die WW-Domänen (benannt nach einem in den Domänen vorhandenen Paar konservierter Tryptophane). Mit Hilfe

der katalytischen Ubiquitin-Ligase-Domäne, die auch die Bindung mit dem Ubiquitin-Konjugationsenzym (E2) vermittelt, wird die Isopeptidbindung zwischen einem Lysin-Rest des Substrats (oder eines bereits gebundenen Ubiquitins) und dem C-Terminus von Ubiquitin gebildet [Pickart, 2001].

Anhand der katalytischen Ubiquitin-Ligase-Domäne werden die E3s in Gruppen eingeteilt, wie die HECT-E3s (*Homologous To E6AP Carboxy-Terminus*) und die RING-E3s (*Really Interesting New Gene*) [Pickart, 2001].



**Abb. 5.14. Schematische Darstellung einer HECT-E3**

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau einer HECT-Ubiquitin-Ligase. C2 (die Kernregion dieser Domäne wird auch CaLB genannt) bezeichnet die  $\text{Ca}^{2+}$ -Lipid-Bindungsdomäne, die für die Membranlokalisierung der Ligase sorgt [Plant et al., 1997]. Nicht alle E3s besitzen diese Domäne. WWs steht für die Region der WW-Domänen, sie vermitteln die Bindung an das Substrat. Typische E3s haben drei oder vier WW-Domänen. HECT ist die katalytische Ubiquitin-Ligase-Domäne (Homologous To E6AP Carboxy-Terminus), die mit dem Ubiquitin-Konjugationsenzym (E2) interagiert und die Isopeptidbindung zwischen einem Lysin-Rest des Substrats (oder eines bereits gebundenen Ubiquitins) und dem C-Terminus von Ubiquitin formiert. [Sazuka et al., 1992] [Staub et al., 1996] [Staub et al., 1997] [Pickart, 2001]

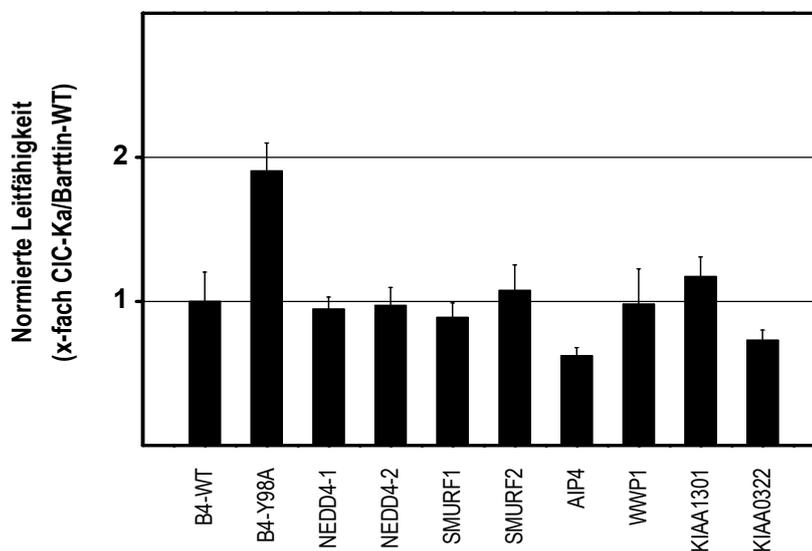
Zur Gruppe der HECT-E3s zählen sowohl die ENaC-regulierende E3 Nedd4-2 [Staub et al., 1997] [Kamynina et al., 2001] als auch die CIC-5-regulierende E3 WWP2 [Schwake et al., 2001]. Folglich wurden in unserem Labor von Raúl Estévez und Anselm Zdebik zunächst die beiden Nedd4-Isoformen Nedd4-1 und Nedd4-2 sowie WWP2 daraufhin untersucht, ob sie den CIC-Ka/Barttin-Strom und die Oberflächenexpression modulieren. Die Experimente deuten jedoch daraufhin, dass dieses nicht der Fall ist.

Für die Ermittlung weiterer potentieller Ubiquitin-Ligasen von Barttin wurden die zur Verfügung stehenden Datenbanken nach Proteinen durchsucht, die WW-Domänen und eine HECT-Domäne enthielten. Zusätzliche Hinweise lieferten die Expressionsanalysen in humanen Zelllinien von Scarafia et al. [Scarafia et al., 2000]. Die meisten der so ermittelten potentiellen HECT-E3s sind funktionell noch nicht charakterisiert.

Da gezeigt wurde, dass die Substratbindung der E3s durch Deletion der HECT-Domäne nicht unterbunden wird [Huibregtse et al., 1997] [Kumar et al., 1999] [Qiu et al., 2000] und die WW-Domänen an die PY-Motive binden [Staub et al., 1996] [Pirozzi et al., 1997], sollten die klonierten, nicht-katalytisch aktiven WW-Domänen der gesuchten Ligase an das potentielle PY-Motiv von Barttin binden können und aufgrund der Überexpression in der Oozyte die

Bindung der kompletten, aktiven Ubiquitin-Ligase der Oozyte verhindern. Dieses würde zu einem geringeren Ausmaß an Ubiquitinierung führen und in einem höheren Membranstrom resultieren.

Die WW-Domänen dieser potentiellen HECT-E3s wurden mittels PCR amplifiziert, dabei mit Start- und Stopp-Codons sowie mit Restriktionsschnittstellen versehen und in p-TLB kloniert, um sie mit CIC-Ka/Barttin in *Xenopus-laevis*-Oozyten koexprimieren zu können. Da so nur die WW-Domänen der E3s exprimiert wurden und die katalytische HECT-Domäne nicht vorhanden war, konnte keine Ubiquitinierung erfolgen.



**Abb. 5.15. Leitfähigkeiten von CIC-Ka/Barttin nach Koexpression mit WW-Domänen**

Die Abbildung zeigt die auf CIC-Ka/Barttin-WT normierten Leitfähigkeiten nach Koexpression von CIC-Ka/Barttin-WT mit den WW-Domänen potentieller HECT-E3s von Barttin. Neben CIC-Ka/Barttin-WT und CIC-Ka/Barttin(Y98A) dienen die WW-Domänen von Nedd4-1 und Nedd4-2 als Kontrolle, da diese beiden E3s bereits in unserem Labor untersucht wurden und den CIC-Ka/Barttin-Strom nicht modulieren. Die Messungen erfolgten 3 Tage nach Injektion. Es wurden 5ng RNA CIC-Ka und 5ng RNA Barttin zusammen mit 10ng RNA der WW-Domänen der Ubiquitinligasen eingesetzt.

In Abb. 5.15. sind die Effekte von WW-Domänen potentieller E3-Ligasen auf die Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin dargestellt. Als Kontrolle dienten CIC-Ka/Barttin exprimierende (Negativkontrolle) und CIC-Ka/Barttin-Y98A exprimierende Oozyten (Positivkontrolle). Zusätzlich wurden als Kontrolle die WW-Domänen von Nedd4-1 und Nedd4-2 koexprimiert. Die (vollständigen) Ubiquitin-Ligasen Nedd4-1, Nedd4-2 und WWP2 wurden bereits zuvor in unserem Labor untersucht und hatten keinen Einfluss auf den CIC-Ka/Barttin-Strom [persönliche Mitteilung Raul Estevez und Anselm Zdebik].

Keine der mit CIC-Ka/Barttin koexprimierten WW-Domänen der Ligasen führte zu einer signifikanten Erhöhung des Stroms.

Die WW-Domänen von AIP4 und KIAA0322 (ebenfalls noch unbezeichnet) führten zu einer Abnahme der Leitfähigkeit.

### 5.2.3. Koexpression von CIC-Ka/Barttin mit der $\mu$ 2-Untereinheit von AP-2

Der Adapterproteinkomplex 2 (AP-2) ist an der Bildung der Clathrinvesikelhülle bei der Internalisation von Plasmamembranproteinen und beim Transport zu den Lysosomen beteiligt [Bonifacino und Traub, 2003]. Dabei interagiert seine  $\mu$ -Untereinheit ( $\mu$ 2) mit zyttoplasmatischen YXX $\Phi$ -Motiven der Plasmamembranproteine.

Für die Untersuchungen wurde neben WT- $\mu$ 2 eine nicht funktionelle  $\mu$ 2-Mutante (W421A) hergestellt, bei der gezeigt wurde, dass sie nicht an YXX $\Phi$ -Motive bindet [Nesterov et al, 1999]. WT- $\mu$ 2 und die nicht funktionelle Mutante wurden in p-TLN kloniert.

Um den Einfluss dieser beiden  $\mu$ -Ketten auf die Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin zu untersuchen, wurden sie zum einen mit CIC-Ka/WT-Barttin und zum anderen mit CIC-Ka/Barttin(Y98A) in *Xenopus-laevis*-Oozyten koexprimiert, so dass sich vier Messreihen ergaben.

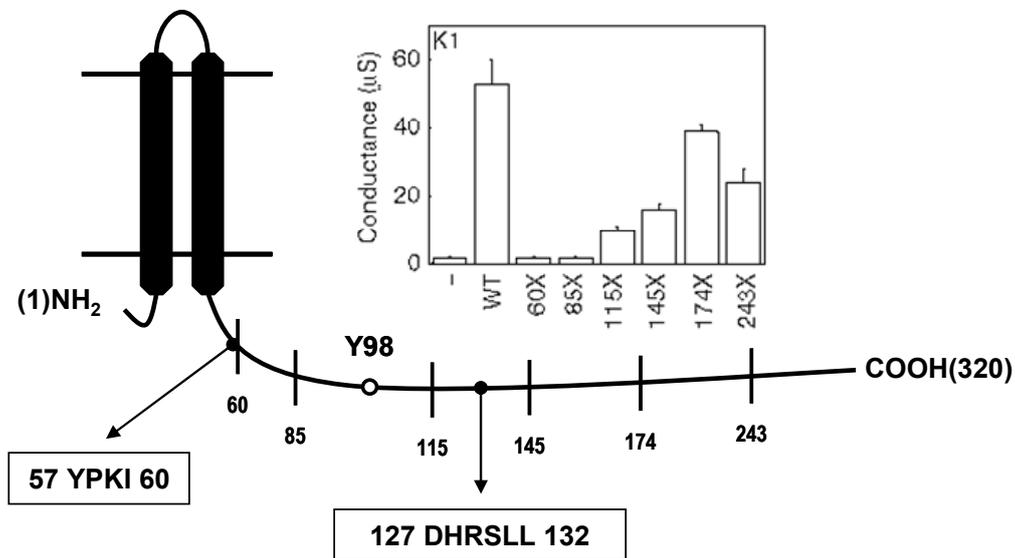
Bei einer Interaktion von WT-Barttin mit WT- $\mu$ 2 würde man eine Abnahme des Stroms (aufgrund der  $\mu$ 2-Überexpression) oder einen gleich großen Strom erwarten, wenn die  $\mu$ 2-Untereinheit mit den anderen AP-2-Untereinheiten der Oozyte assoziiert. Für die Interaktion von WT-Barttin mit der nicht funktionellen Mutante von  $\mu$ 2 sollte - da die Bindung an das Motiv verhindert ist - nach Assoziation der defekten  $\mu$ 2-Kette mit den anderen AP-2-Untereinheiten die Internalisation behindert sein und der Strom somit ansteigen. Die Koexpression mit Barttin Y98A sollte aufgrund des zerstörten YXX $\Phi$ -Motivs als Kontrolle dienen und Effekte, die durch Überexpression entstehen, aufdecken.

Für die vier Messreihen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Leitfähigkeiten (Daten nicht gezeigt).

### 5.2.4. Untersuchung weiterer Signalmotive von Barttin

Bei der Analyse der Primärstruktur von Barttin wurden in seinem zyttoplasmatischen C-terminalen Abschnitt, abgesehen von der Region um Y98, zwei weitere potentielle Signalmotive entdeckt. Ein YXX $\Phi$ -Motiv (potentielles Tyrosin-basiertes Sortierungssignal) befindet sich kurz hinter der zweiten Transmembrandomäne an AS-Position 57-60. Ein

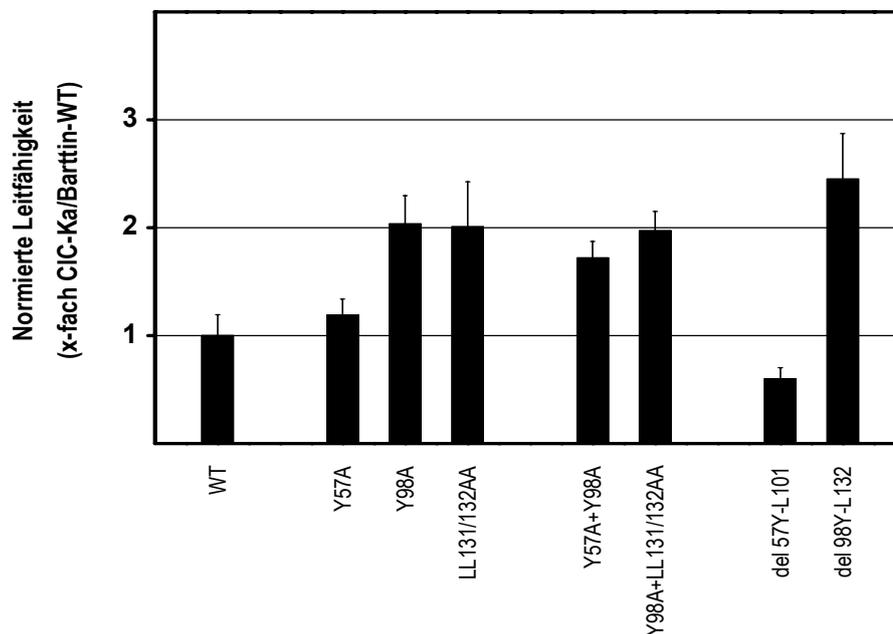
DHRSSL-Motiv liegt in AS-Position 127-132 und würde zu den Dileucin-basierten Sortierungssignalen gehören.



**Abb. 5.16. Signalmotive von Barttin**

Die schematische Abbildung zeigt zwei weitere Signalmotive (neben der Region um Y98). Ein YXXΦ-Motiv befindet sich in AS-Position 57-60, ein [DE]XXXL[LI]-Motiv in AS-Position 127-132. In dem eingefügten Diagramm sind zusätzlich die Leitfähigkeiten von verkürzten Barttinproteinen bei Koexpression mit ClC-K1 abgebildet [Estevez et al., 2001]. Die verkürzten Barttinproteine mit 60 und 85 AS steigern die Leitfähigkeit nicht, die übrigen erhöhen zwar die Leitfähigkeit, das ClC-K1/Barttin-WT-Niveau wird allerdings nicht erreicht. Abbildung modifiziert nach Estevez et al. [Estevez et al., 2001].

Ob es sich tatsächlich um Signale handelt, die die Leitfähigkeit von ClC-Ka/Barttin verändern, wurde anhand von Mutationen und Deletionen ermittelt. Die Klonierung erfolgte mittels rekombinanter PCR in p-T7T3. Zum einen wurden die für die Signalmotive essentiellen Aminosäuren zu Alanin mutiert (Y57A, LL131/132AA), zum anderen wurden die Proteinabschnitte von Barttin, die die Motive enthalten, deletiert (Deletion 57Y-L101, Deletion 98Y-L132). Die Motive wurden dadurch auf zwei Arten zerstört. Nach Koexpression mit ClC-Ka in *Xenopus-laevis*-Oozyten wurden die Leitfähigkeiten mit der *Voltage-Clamp*-Technik ermittelt.



**Abb. 5.17. Auswirkungen von Mutationen und Deletionen im C-terminalen Abschnitt von Barttin**

Die Abbildung zeigt die auf CIC-Ka/Barttin-WT normierten Leitfähigkeiten von Barttin-Mutationen und Deletionen. Näheres im Text. Die Messungen erfolgten 3 Tage nach Injektion und es wurden 10ng RNA CIC-Ka mit 5ng RNA Barttin-WT- bzw. Barttin-Mutante eingesetzt.

Die Untersuchung der Leitfähigkeiten der Barttin-Mutationen gibt Hinweise auf ein weiteres Signalmotiv im C-terminalen Abschnitt von Barttin. Während die Zerstörung des YPKI-Motivs durch die Mutation Y57A nur zu einer geringen Steigerung der Leitfähigkeit führte, resultierte die Zerstörung des Motivs DHRSLL durch die Mutation LL131/132AA in einer Verdoppelung der Leitfähigkeit gegenüber CIC-Ka/Barttin-WT. Die Stromhöhe ist vergleichbar mit der von CIC-Ka/Barttin(Y98A). Die zusätzliche Zerstörung des Motivs YVRL durch die Mutationen Y98A+LL131/132AA ergab keine weitere Steigerung der Leitfähigkeit.

Die beiden Barttin-Deletionen ergänzen die Analysen der verkürzten Barttinproteine [Estevez et al., 2001]. Die Barttin-Region 57Y-101L ist für die Funktion von Barttin von wichtiger Bedeutung, da die Deletion dieses Bereichs eine Verminderung der Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin nach sich zieht. Es bleibt nur eine Restfunktion von Barttin erhalten.

Interessanterweise ist die Funktion der Barttin-Deletion 98Y-L132 nicht beeinträchtigt. Die Leitfähigkeit war sogar ganz im Gegenteil deutlich größer als die von CIC-Ka/Barttin-WT (Faktor 2). Dieses ist deshalb bemerkenswert, da verkürzte Barttinproteine, bei denen dieser Bereich ebenfalls fehlt (Abb. 5.16., eingefügtes Diagramm 85X), sich anders verhalten und keine Funktion zeigen.

## 6. Diskussion

Ionenkanäle erfüllen die wichtige Funktion des geregelten Ionentransports durch biologische Membranen. Die Untersuchung der Eigenschaften von Ionenkanälen und Proteinen, die mit ihnen im Zusammenhang stehen ( $\beta$ -Untereinheiten, andere Interaktionspartner), ist von entscheidender Bedeutung, um physiologische und pathophysiologische Vorgänge im Organismus zu verstehen.

Defekte in den Genen von Ionenkanälen und ihren assoziierten Proteinen können zu Krankheiten führen. So sind Mutationen im CIC-Kb-Gen verantwortlich für das Bartter-Syndrom Typ III [Simon et al., 1997], Mutationen im Barttin-Gen für den Phänotyp des Bartter-Syndroms Typ IV [Birkenhäger et al., 2001]. Die eingeschränkte Aktivierung von CIC-Ka und CIC-Kb durch die defekte  $\beta$ -Untereinheit Barttin ist dabei das molekulare Korrelat des Bartter-Syndroms Typ IV; denn Barttin steigert die Oberflächenexpression der CIC-K-Kanäle [Estevez et al., 2001] und nimmt nach Waldegger et al. auch Einfluss auf die Kanaleigenschaften [Waldegger et al., 2002]. Ob Barttin lediglich die Oberflächenexpression von CIC-K verstärkt oder auch wesentlich die Eigenschaften der Kanalpore beeinflusst ist noch nicht abschließend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Struktur-/Funktions-Analyse des Komplexes aus CIC-K/Barttin durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde das *Xenopus-laevis*-Oozyten-Expressionssystem gewählt, da hier unmittelbar die Ionenkanalfunktion überprüft werden kann. Die Nachteile dieses Expressionssystems begründen sich in den allgemeinen Eigenschaften von Amphibienzellen. Da sie bei der Körpertemperatur von Ratte und Mensch nicht lebensfähig sind, werden alle Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt, was für die untersuchten Proteine eine unphysiologische Bedingung darstellt. Insgesamt ist das *Xenopus-laevis*-Oozyten-System aber für die Untersuchung von Ionenkanälen etabliert und vielfach verwendet worden. Die Vorteile dieses Systems sind neben der Zellgröße der Oozyten und der guten Verfügbarkeit insbesondere die weitgehend ruhende Expression endogener Ströme.

## 6.1. Untersuchungen an CIC-K/Barttin-Konstrukten

Ionenkanäle sind häufig multimere Proteinkomplexe aus einer oder mehreren porenformenden  $\alpha$ -Untereinheiten, die zusätzlich mit regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten assoziiert sein können. Die  $\alpha$ -Untereinheiten von Plasmamembrankanälen benötigen ihre  $\beta$ -Untereinheit dabei häufig für eine ausreichende Expression an der Zelloberfläche [Fink et al., 1996] [Shi et al., 1996] [Trimmer, 1998] [Zerangue et al., 1999] [Estevez et al., 2001].

In den (hetero-)multimeren Ionenkanalkomplexen sind unterschiedliche Kombinationen der Untereinheiten (Stöchiometrien) denkbar. Biochemische und elektrophysiologische Arbeiten zeigten allerdings, dass die Kanalkomplexe an der Zelloberfläche meistens eine spezifische Stöchiometrie aufweisen, d.h., dass überwiegend nur bestimmte Kombinationen der Untereinheiten die Plasmamembran erreichen [Isom et al., 1994] [Wang et al., 1994] [Sheng et al., 1994] [Rhodes et al., 1997] [Zerangue et al., 1999].

Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind noch nicht endgültig geklärt. Untersuchungen zur Assoziation nicotinischer Acetylcholinrezeptoren weisen darauf hin, dass das Verlassen des ER ein wichtiger Kontrollpunkt für die Oberflächenstöchiometrie ist [Blount et al., 1990]. Möglicherweise können hier nur bestimmte Kombinationen von Untereinheiten korrekt gefaltet werden und nicht-assoziierte Untereinheiten oder nur partiell-assoziierte Komplexe werden durch Chaperone im ER zurückgehalten [Kowalski et al., 1998] [Zerangue et al., 1999].

Weiterhin könnten Signale (Peptidmotive), die in den Untereinheiten vorhanden sind, durch die korrekte Assoziation des Komplex' so maskiert werden, dass entweder die Degradierung blockiert wird (Maskierung von Degradierungssignalen), wie es beispielsweise für Immunrezeptoren gezeigt wurde [Bonifacino et al., 1990] [Kopito, 1997], oder dass die Retention im ER aufgehoben wird (Maskierung von Retentionssignalen) [Klausner et al., 1990] [Zerangue et al., 1999]. Es können dann solche Signale überwiegen, die den korrekt gefalteten Komplex zur Zelloberfläche steuern [Zerangue et al., 1999]. Der Mechanismus der Maskierung von Retentionssignalen wurde für die ATP-abhängigen Kaliumkanäle Kir6.1/2 und ihre  $\beta$ -Untereinheit SUR1 beobachtet. Durch die Assoziation der Untereinheiten in einem octameren Komplex (4 Kir6.2 : 4 SUR1) werden die Retentionssignale von Kir6.2 und SUR1 maskiert und der Komplex an die Zelloberfläche gesteuert [Zerangue et al., 1999]. SUR1 verstärkt dabei nicht nur die Oberflächenexpression, sondern beeinflusst auch in großem Maße die Kanaleigenschaften [Babenko et al., 1999].

Es ist noch nicht geklärt, auf welche Weise Barttin den Komplex CIC-K/Barttin an die Zelloberfläche steuert und welche Mechanismen daran beteiligt sind.

Die Untersuchungen an den im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Fusionsproteinen sollten zum einen Hinweise auf die Stöchiometrie des Komplex' liefern, zum anderen sollte die Funktion des C-terminalen Abschnitt von Barttin im Komplex erörtert werden. Die Vermutung lag nahe, die lange C-terminale Barttin-Region könnte Signalmotive enthalten, die für eine Oberflächenaktivierung von CIC-K ausreichend sind. Außerdem wäre es möglich, dass sich in dieser Region Interaktionsdomänen für CIC-K befinden, die seine Eigenschaften beeinflussen (z.B. Maskierung von Retentionssignalen). Durch die Verkettung mit Hilfe eines Bindeglieds («Linker») wurde berücksichtigt, dass wahrscheinlich die Transmembrandomänen von Barttin über hydrophobe Wechswirkungen eine Interaktion mit CIC-K (Bindung) gewährleisten, da alle bisher beschriebenen krankheitsverursachenden Mutationen im Bereich dieser N-terminalen Transmembrandomänen liegen [Birkehäger et al., 2001] [Estevez et al., 2001].

Die CIC-K/Barttin-Konstrukte, in denen die Transmembrandomänen von Barttin fehlen, haben im Oozytenexpressionssystem insgesamt dieselben Eigenschaften (Strom; Oberflächenexpression; durch zusätzliches, vollständiges Barttin aktivierbar) wie die entsprechenden WT-CIC-K-Kanäle.

Diese Tatsache unterstreicht die Funktion der Transmembrandomänen von Barttin. Ihre Mitintegration in den Komplex ist sowohl entscheidend für seine Oberflächenexpression als auch für die Erhöhung der Leitfähigkeit. Dieses ist vereinbar mit den Beobachtungen, dass alle bis jetzt entdeckten und das BS-Typ IV verursachenden Mutationen in Barttin im Bereich der Transmembrandomänen liegen [Birkehäger et al., 2001] und diese Defekte die Funktion von CIC-K/Barttin verschlechtern [Estevez et al., 2001]. Ob die Transmembrandomänen auch die Eigenschaften der Kanalpore modulieren, bleibt eine interessante Fragestellung.

Der C-terminale Abschnitt von Barttin reicht unterdessen nicht dafür aus, den CIC-K-Strom zu aktivieren. Die Oberflächenexpression wird ebenfalls nicht beeinflusst, auch wenn durch die Kopplung des C-terminalen Barttinabschnitts an CIC-K potentielle Sortierungssignale von Barttin für CIC-K zur Verfügung stehen könnten. Es wäre hier möglich gewesen, dass die verkürzten Konstrukte zwar gegenüber CIC-K den Strom nicht besser leiten, aber dennoch vermehrt die Zelloberfläche erreichen. Insgesamt beeinflussen potentielle Signale im C-terminalen Abschnitt von Barttin in diesen Konstrukten die Zielsteuerung zur Plasmamembran nicht wesentlich.

Bei den Untersuchungen wurden auch keine Hinweise auf eine CIC-K-Interaktionsdomäne im C-terminalen Abschnitt von Barttin gefunden.

Da eine ausreichende Expression der Konstrukte im *Western-Blot* bewiesen wurde, kann eine ungenügende Expression als Ursache für die Ergebnisse ausgeschlossen werden. Der Grund für die unterschiedlichen Eigenschaften gegenüber den Konstrukten mit vollständigem Barttin muss

hier folglich allein im Fehlen der Transmembrandomänen liegen. Da auf der anderen Seite gezeigt wurde, dass ein verkürztes Barttin, das nach Aminosäure 85 endet und somit die N-terminalen Transmembrandomänen vorhanden sind, auch nicht in der Lage ist, CIC-K zu aktivieren (Abb. 5.16., eingefügtes Diagramm) [Estevez et al., 2001], ist Barttin also nur in der Einheit von Transmembrandomänen und C-terminalem Abschnitt funktionell.

Die Untersuchungen der CIC-K-Konstrukte mit vollständigem Barttin ergeben einen starken Hinweis auf eine direkte CIC-K/Barttin-Interaktion mit äquimolarer Stöchiometrie. Diese Konstrukte sind elektrophysiologisch weitgehend identisch zu Komplexen, die nach Koexpression von CIC-K und Barttin entstehen.

Die Oberflächenexpression der CIC-K1/Barttin-Konstrukte war dabei größer als die von CIC-K1 allein, wobei die Orientierung die Signalstärke beeinflusste. Das Konstrukt, in dem Barttin den N-Terminus bildet, ergab hier ein höheres Signal. Da für Mitglieder der CLC-Familie eine dimere Struktur beschrieben ist [Ludewig et al., 1996] [Middleton et al., 1996] [Dutzler et al., 2002] und auch in der *Western-Blot*-Analyse dimerisierte Konstrukte detektiert wurden, ist eine Stöchiometrie von 2:2 anzunehmen (vgl. Dimere in Abb. 5.11.). Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass evtl. weniger Barttin für die CIC-K-Aktivierung ausreicht (2 CIC-K : 1 Barttin). Dagegen sprechen aber die Koexpressionsversuche der funktionellen Konstrukte mit zusätzlichem CIC-K (Konstrukt+CIC-K). Es kam dabei nie zu einem Anstieg der Leitfähigkeit - verglichen zur Leitfähigkeit bei alleiniger Expression des Konstrukts - wie man ihn für eine derartige Stöchiometrie erwarten würde (Versuche mit unterschiedlichen RNA-Mengen-Verhältnissen, Daten nicht gezeigt). Zusätzliche Hinweise auf eine äquimolare Stöchiometrie lieferten Koimmunopräzipitationsstudien am nativen CIC-Kb/Barttin-Komplex, die in unserem Labor durchgeführt wurden [Meyer, 2003].

Die Beobachtungen für die CIC-Ka/Barttin-Konstrukte mit kurzem Bindeglied («1x-Linker») stehen nicht im Gegensatz zu einer äquimolaren Stöchiometrie. Hier war das Konstrukt, in dem Barttin den N-Terminus bildet, allein funktionell und konnte durch zusätzliches Barttin weiter aktiviert werden. Wahrscheinlich ist hier durch den zu kurzen Linker die Ausrichtung von Barttin im Komplex nicht optimal und ein zusätzliches Barttin kann die Interaktion besser erfüllen. Ob hier beispielsweise Retentionssignalen von CIC-K maskiert werden oder welche anderen Mechanismen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Insgesamt wirkt sich ein Barttin-Überschuss für die Konstrukte (Expression von Konstrukt+Barttin) im Gegensatz zum CIC-K-Überschuss (Expression von Konstrukt+CIC-K, Daten nicht gezeigt) aktivierend auf die Leitfähigkeit des Komplex' aus.

Eine weitere Abschätzung der Stöchiometrie könnte in Zukunft mit biochemischen Techniken (Gelfiltration) gelingen, endgültige Sicherheit wird aber erst die Kristallisation von CIC-K/Barttin bringen.

Die Ergebnisse zu den Messungen der Oberflächenexpression von CIC-K1HA nach Koexpression mit nicht-markierten Konstrukten sind schwierig zu bewerten. Das Konstrukt B4-2x-K1 scheint in geringem Ausmaß zusätzliches CIC-K1HA an die Zelloberfläche zu führen, so dass hier eine Interaktion des Konstrukts mit CIC-K1HA denkbar ist. Vermutlich hat hier die CIC-K1-Komponente des Konstrukts CIC-K1HA gebunden und mit an die Zelloberfläche geführt (dimerisierte CIC-K1HA-Untereinheiten im *Western-Blot* deuten auf eine CIC-K/CIC-K-Bindung hin). Ob ein Komplex der Form (2 CIC-K : 1 Barttin) allerdings *in vivo* eine Rolle spielt, ist fraglich.

### 6.1.1. Messung der Oberflächenexpression

An dieser Stelle soll allgemein auf die Problematik des Oberflächen-Assays eingegangen werden. Das Prinzip der Messung beruht auf der spezifischen Antikörperbindung an ein Epitop, das im Falle von CIC-K1 extrazellulär zwischen zwei Transmembrandomänen eingefügt wurde, da sowohl N- als auch C-Terminus bei CLC-Kanälen im Zytosol liegen (Abb. 1.2; Abb. 4.2).

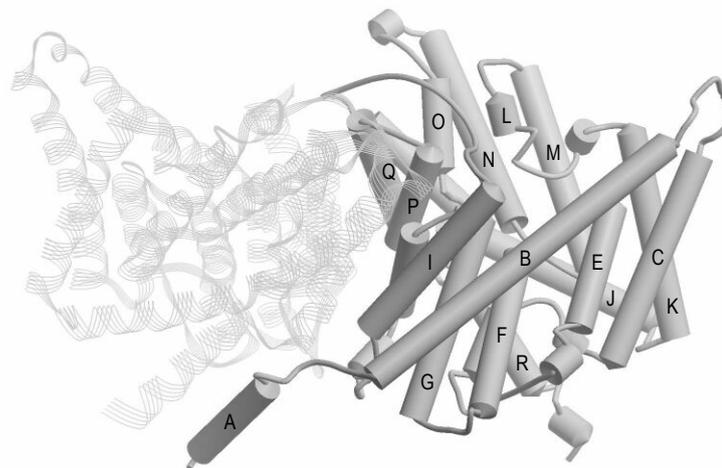
Die Problematik des Oberflächen-Assays liegt im Auffinden einer geeigneten Position für das HA-Epitop. Viele Stellen der CIC-K-Kanäle waren dafür nicht zweckmäßig, d.h., es wurden entweder die Kanaleigenschaften beeinflusst oder eine Detektion im Oberflächen-Assay war unmöglich (persönliche Mitteilung Raul Estevez). Daher wurde die einzige bis dahin funktionelle Position in CIC-Ka auch für CIC-K1 verwendet. Die Position des HA-Epitops in CIC-K1 wurde also entsprechend zu der Lage des HA-Epitops gewählt, das Estevez et al. in CIC-Ka einfügten (Abb. 5.5.) [Estevez et al., 2001].

Im Rahmen der Pilotexperimente für den Oberflächen-Assay der CIC-K1HA/Barttin-Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Verhältnis von Signal zu Hintergrund für den als Plausibilitätskontrolle eingesetzten  $\beta$ -adrenergen Rezeptor, dessen extrazellulärer N-Terminus mit einem HA-Epitop versehen war, deutlich besser war als für CIC-K1HA/Barttin (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht klar, ob dieser Effekt allein auf eine größere Oberflächenexpression des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors zurückzuführen ist. Es kann auch davon ausgegangen werden, dass grundsätzlich ein HA-Epitop, das am freien, extrazellulären N- oder C-Terminus angefügt wurde, wesentlich besser zugänglich ist als ein HA-Epitop, das sich - wie im Falle von CIC-K1HA - zentral im Protein befindet. Für die Position in CIC-Ka (und damit auch in CIC-K1) wurde von Estevez et al. (2001) eine nicht-homologe Region gewählt, damit nicht entscheidende Bereiche des Kanals strukturell beeinflusst werden. Wie sich diese nicht-

homologe Region räumlich ausrichtet, ist unklar, gerade wenn man die von Dutzler et al. gezeigte bakterielle CLC-Struktur zugrunde legt [Dutzler et al., 2002]. Diese Region liegt nach dem Sequenzvergleich im bakteriellen CLC-Modell zwischen den Transmembrandomänen K und M, wobei die Lage zur Domäne L nicht eindeutig bestimmbar ist. Die Abb. 6.1 verdeutlicht dieses Problem.

Zusätzlich scheint die Nähe des HA-Epitops zur Glykosylierungsregion nicht günstig (Abb. 5.5.), da Oligosaccharide mit der Antikörperbindung interferieren können.

In Zukunft könnte eventuell eine bessere HA-Position mit Hilfe dieser Struktur und des Sequenzvergleichs gefunden werden, was detailliertere Studien zur Oberflächenexpression ermöglichen würde.



#### Abb. 6.1. Dreidimensionale Struktur des bakteriellen CIC-Kanals

Die Abbildung zeigt die beiden Untereinheiten des stCIC-Kanals in seitlicher Ansicht, C- und N-Terminus sind nach unten in Richtung Zytosol orientiert. Die linke Untereinheit ist als Linienband dargestellt, um den Blick auf die rechte Untereinheit freizugeben. Die rechte Untereinheit ist ab AS 12 vollständig dargestellt.  $\alpha$ -Helices (D und H tragen keine Beschriftung) sind schematisch als Zylinder dargestellt. Nach dem Sequenzvergleich befindet sich das HA-Epitop von CIC-K1HA zwischen Domäne K und M. CIC-K besitzt hier einen relativ großen zusätzlichen Proteinabschnitt im Vergleich zu stCIC (nicht-homologe Region). Die dreidimensionale Lage dieses zusätzlichen Abschnitts, in der sich auch das HA-Epitop befindet, ist unklar. Die komplexe Anordnung der Transmembrandomänen verdeutlicht die Schwierigkeit, eine gute Position für ein extrazelluläres HA-Epitop zu finden. Kristallstrukturdaten nach Dutzler et al., 2002. Die Abbildung wurde mit der Software DS VIEWERPRO (ACCELRYS INC) erzeugt.

## 6.2. Untersuchungen zur Regulation von ClC-K/Barttin

Im heterologen *Xenopus-laevis*-Oozyten-Expressionssystem zeigt sich eine Aktivierung des Chloridstroms bei Koexpression von ClC-K und Barttin in Verbindung mit einer höheren Oberflächenexpression von ClC-K [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002]. Die Leitfähigkeit kann durch Mutation des Barttin-Aminosäurerests Y98 noch weiter erhöht werden [Estevez et al., 2001].

Barttin wird in diesem System an der Zelloberfläche exprimiert, wogegen ClC-Ka und ClC-Kb bei alleiniger Expression die Zelloberfläche nur in geringem Ausmaß erreichen [Waldegger et al., 2002]. Diese Beobachtungen zeigen, dass Barttin ein wichtiger Regulator der ClC-K-Funktion ist und insbesondere starken Einfluss auf seine Oberflächenexpression hat. Die verantwortlichen Regulationsmechanismen sind ebenso wie mögliche weitere Interaktionspartner von Barttin noch unbekannt.

Es wurden deshalb Aminosäuresequenzabschnitte in Barttin gesucht, die die ClC-K/Barttin-Funktion beeinflussen und an der Regulation bzw. Zielsteuerung des ClC-K/Barttin-Komplex' beteiligt sein könnten. Gleichzeitig wurden potentielle Interaktionspartner für diese Motive getestet.

Im Fall von ClC-5 und ENaC ist bereits ein Regulationsmechanismus der Oberflächenexpression für Ionenkanäle beschrieben. Hier interagieren Tyrosin-Prolin(PY)-Motive mit E3-Ubiquitinligasen, was zur Internalisierung führt [Staub et al., 1996] [Schild et al., 1996] [Staub et al., 1997] [Schwake et al., 2001] [Kamynina et al., 2001]. Da auch Barttin ein potentielles PY-Motiv enthält, lag die Vermutung nahe, auch hier könne eine Ubiquitin-Regulation von Bedeutung sein [Estevez et al., 2001]. Bei der Suche nach einer möglichen zugehörigen Ubiquitin-Ligase kamen in unserer Arbeitsgruppe bereits verschiedene Techniken zum Einsatz. So wurde das *Yeast2Hybrid*-Verfahren angewendet und dabei der C-terminale Abschnitt von Barttin gegen die cDNA-Bank der Niere getestet, was ohne Erfolg blieb [persönliche Mitteilung Raul Estevez, Tertia de Jager, Ingo Kurth]. Verschiedene Koimmunpräzipitationsstudien mit Barttin in *Xenopus-laevis*-Oozyten- und Maus-Nierenlysat waren ebenfalls nicht erfolgreich [persönliche Mitteilung Raul Estevez, Ingo Kurth].

Aufgrund der Tatsache, dass bis jetzt keine Ubiquitin-Ligase gefunden wurde und auch die Ubiquitinierung von ClC-K oder Barttin noch nicht gezeigt werden konnte, wurde die Suche auf andere Regulationsmechanismen ausgeweitet. Da die Barttin-Primärstruktur zeigt, dass das Y98

auch Teil eines YXXΦ-Signals sein kann, welches mit den AP-Komplexen interagiert, wurde insbesondere diese Möglichkeit der Regulation berücksichtigt.

Zunächst wurde eine Mutationsanalyse der Barttin-Region um das zentrale Tyrosin Y98 in der Region der Aminosäuren 92-101 durchgeführt. Die Prolin-zu-Alanin-Mutationen ergaben bis auf zwei (P92A, P96A) einen geringeren Strom, eine deutliche Stromerhöhung wurde bei keiner der Mutationen beobachtet. Die Mutation der Proline sollte ein potentiell PY-Motiv zerstören und somit eine Interaktion mit der Ligase verhindern, was in einer höheren Oberflächenexpression mit höheren Strömen resultieren würde. Mit diesem Versuchsansatz wurde kein Hinweis auf ein PY-Signal gefunden, das Vorhandensein eines solchen ist dadurch allerdings nicht völlig ausgeschlossen. Möglicherweise verändern die Mutationen die Konformation von Barttin so stark, dass die Funktion beeinträchtigt wird. Außerdem ergibt im Falle von CIC-5 die Mutation mehrerer Reste des PY-Motivs (PPY zu AAE) einen nur geringfügig höheren Strom als die alleinige Mutation des Tyrosins (PPY zu PPE) [Schwake et al., 2001]. Die zusätzlichen Mutationen der Proline scheinen sich funktionell also nicht so stark auszuwirken wie die Mutation des Tyrosins, was auch für das PY-Motiv in Barttin gelten könnte. Insgesamt ist der Stromanstieg für CIC-5 und CIC-K/Barttin, der durch Mutation des PY-Tyrosinrests entsteht, allerdings relativ gering (zweifach) im Vergleich zur Aktivierung des Stroms bei Mutationen in den PY-Motiven der ENaC-Untereinheiten (fünffach) [Schild et al., 1995] [Schild et al., 1996] [Schwake et al., 2001]. In CIC-5 wurde außerdem ein weiteres Motiv gefunden, das den Strom nach Mutation (YF661/662AA) noch wirkungsvoller erhöht (dreifach), was zeigt, dass das PY-Signal in CIC-5 nur eines von mehreren Motiven sein könnte, die die Internalisierung vermitteln [Schwake, 2001]. Ähnliches könnte auch für Barttin gelten.

CIC-5 . . . . .TEHS**PPLPPYTP**PPTL. . . . .

Barttin . . . . .EMKS**PSQPPY**VRLWE. . . . .

**Abb. 6.2. PY-Aminosäuresequenzen in CIC-5 und Barttin**

In den anschließenden Koexpressionsversuchen wurden die WW-Domänen potentieller E3s daraufhin untersucht, ob sie den CIC-Ka/Barttin-Strom beeinflussen. Wenn es sich in der Barttin-Region Y98 tatsächlich um ein PY-Motiv handelt und die Zerstörung dieses Motivs durch die Mutation Y98A in *Xenopus-laevis*-Oozyten zu einer Erhöhung des CIC-K/Barttin-Stroms führt, muss die gesuchte E3 endogen in den Oozyten exprimiert sein. Die WW-Domänen sollten folglich als kompetitiver Inhibitor die Interaktion der (vollständigen) endogenen E3 mit Barttin verhindern, was in einem höheren Strom resultieren würde. Die in

den Datenbanken gefundenen Ligasen wurden deshalb und aus praktischen Gründen nicht vollständig kloniert. In dieser Tatsache liegt ein grundsätzliches Problem des Versuchsansatzes. Für die WW-Domänen der Ligasen, die eine C2-Domäne besitzen, ist es z.B. denkbar, dass durch das Fehlen dieser Membranbindungsdomäne die intrazelluläre Lokalisation verändert ist. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die WW-Domänen als unvollständige Proteine nicht bereits im ER degradiert werden, da ihre Expression nicht durch *Western-Blot*-Analyse bewiesen wurde. In Zukunft könnten deshalb - sollte CIC-K/Barttin einer Ubiquitinregulation unterliegen - Koexpressionsversuche mit vollständigen Ligasen andere Ergebnisse zeigen und eventuell die gesuchte Ligase identifizieren. Dabei wäre dann auch eine Epitopmarkierung der Ligasen sinnvoll, um sie zuverlässig detektieren zu können.

Die über die Datenbanksuche gefundenen E3s sind durchaus gute Kandidaten für die gesuchte Ubiquitinligase. Für Nedd4 und Smurf wurde gezeigt, dass diese endogen in *Xenopus-laevis*-Oozyten exprimiert werden [Rebhun und Pratt, 1998] [Zhu et al., 1999]. Die WW-Domänen der *Xenopus-laevis*-E3 xNedd4 binden zudem an die PY-Motive von ENaC [Rebhun und Pratt, 1998], was zu der Überlegung führte, dass Barttin möglicherweise in den *Xenopus-laevis*-Oozyten auch mit dieser Ligase interagiert und in Säugetieren dann durch die homologe E3 hNedd4-2 oder die Isoform hNedd4-1 [Kamynina et al., 2001] reguliert wird. Diese Vermutung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch die Koexpression mit den vollständigen Ligasen Nedd4-2 und Nedd4-1 beeinflusste den CIC-K/Barttin-Strom in *Xenopus-laevis*-Oozyten nicht [persönliche Mitteilung Raul Estevez und Anselm Zdebik], so dass eine Interaktion von Barttin mit Nedd4 nicht wahrscheinlich ist.

Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu Untersuchungen von Embark et al. [Embark et al., 2004]. Sie sehen einen Nedd4-2-Effekt auf CIC-Ka/Barttin und postulieren weiterhin eine Regulation über die Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinasen (SGK). Die vorgelegten Daten sind allerdings keineswegs überzeugend. So sind die Leitfähigkeiten von CIC-Ka/Barttin nach Koexpression mit Nedd4-2 zwar geringer als die Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin, allerdings findet sich kein inhibierender Effekt auf CIC-Ka/Barttin nach Koexpression mit der katalytisch inaktiven Nedd4-2-Mutation C938S [Embark et al., 2004]. Zudem zeigen die Daten auch für CIC-Ka/Barttin(Y98A) nach Koexpression mit Nedd4-2 eine deutliche Abnahme der Leitfähigkeit, obwohl hier das PY-Motiv zerstört ist [Embark et al., 2004]. Bei der Messung der Oberflächenexpression ist der Nedd4-2-Effekt erst nach Injektion von für *Xenopus-laevis*-Oozyten unüblich hohen RNA-Mengen von 30 ng Nedd4-2 erkennbar (bei einem insgesamt dürftigen Signal/Rausch-Verhältnis) [Embark et al., 2004]. Es wurden außerdem keine Koimmunpräzipitationen von Nedd4-2 mit Barttin durchführt, die die Vermutung einer Barttin/Nedd4-2-Interaktion hätten untermauern können. Davon abgesehen ist es nicht

unwahrscheinlich, dass die Effekte der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinasen (SGK), die Embark et al. postulieren, unspezifischer Natur sind.

Ebenso wie xNedd wird auch xSmurf1 in *Xenopus-laevis*-Oozyten exprimiert [Zhu et al., 1999]. Deshalb wurden die WW-Domänen der humanen homologen E3s hSmurf1 und hSmurf2 [Zhang et al., 2000] [Lin et al., 2000] auf eine Interaktion mit Barttin getestet. Auch für die Koexpression mit WW-Domänen dieser beiden Ligasen konnten keine eindeutigen Veränderungen der Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin gemessen werden. Das gleiche gilt für die in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten WW-Domänen von WWP1 [Pirozzi et al., 1997]. WWP2 veränderte den CIC-Ka/Barttin-Strom in *Xenopus-laevis*-Oozyten ebenfalls nicht [persönliche Mitteilung Raul Estevez], beeinflusst allerdings die Ströme und die Oberflächenexpression von CIC-5 und scheint eine Rolle bei der Zielsteuerung dieses Kanals zu spielen [Schwake et al., 2001].

Die Koexpression mit den WW-Domänen der Ubiquitin-Ligase AIP4 [Wood et al., 1998] [Marchese et al., 2003] [Angers et al., 2004] sowie mit den WW-Domänen von KIAA0322 resultierten entgegen der Erwartung in einer verminderten Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin. Hier dürfte es sich um einen unspezifischen Effekt handeln. Im Falle der WW-Domänen von KIAA1301 (Nedd4-related E3 ubiquitin ligase, NEDL2 [Miyazaki et al., 2003]) wurde zwar eine geringe Erhöhung der Leitfähigkeit gemessen, diese ist allerdings nicht signifikant.

Insgesamt gaben die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes keinen konkreten Hinweis auf eine E3, die die Oberflächenexpression von CIC-Ka/Barttin reguliert. Eine Möglichkeit wäre, noch einmal vollständige Ligasen mit CIC-Ka/Barttin zu exprimieren, am besten gekoppelt mit nicht funktionellen Mutanten der Ligasen, die als Plausibilitätskontrolle von wichtiger Bedeutung wären. Gleichzeitig müssten die Ligasen dann auch mit CIC-Ka/BarttinY98A als Kontrolle exprimiert werden, wo ein Effekt ausbleiben müsste.

Für die Experimente wurde zudem angenommen, dass die Funktion der Ubiquitinligasen zwischen den Spezies konserviert ist und somit die Ligasen der *Xenopus-laevis*-Oozyten mit denselben Motiven interagieren wie die humanen Ligasen. Dieses muss aber nicht der Fall sein, was bedeuten würde, dass eine *Xenopus-laevis*-Ligase zwar die CIC-K/Barttin-Funktion beeinflusst, dieses aber beim Säugetier keine Rolle spielt.

Auch mit anderen Techniken konnte, wie bereits oben erwähnt, keine Ligase identifiziert werden. Deshalb muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass hier evtl. ein anderer Regulationsmechanismus involviert ist.

In Barttin kann das Y98 auch Teil eines YXX $\Phi$ -Signals der Sequenz YVRL sein (s. «Einleitung»). YXX $\Phi$ -Motive interagieren mit den  $\mu$ -Untereinheiten der AP-Komplexe

1 bis 4. Diese sind Komponenten der Vesikelhülle. AP-1, AP-2 und AP-3 sind dabei mit Clathrin assoziiert, wobei AP-2 u.a. an der Formierung der Clathrinvesikelhülle bei der Internalisation von Plasmamembranproteinen beteiligt ist und somit für YXX $\Phi$  als Endozytose-signal die entscheidende Rolle spielt [Bonifacino und Traub, 2003]. Die Barttin-Mutation L101A ( $\Phi$ 101A) ergab eine geringfügig höhere Leitfähigkeit, was für die Funktion als Sortierungssignal spricht.

Um weitere Hinweise auf ein YXX $\Phi$ -Motiv zu finden, wurden Koexpressionsversuche mit der  $\mu$ 2-Untereinheit ( $\mu$ 2-Kette) des Adapterproteinkomplex' 2 (AP-2) und einer nicht funktionellen Mutation der  $\mu$ 2-Kette durchgeführt. AP-2 ist - wie bereits beschrieben - als wichtiger Bestandteil der Regulationsmaschinerie an der Proteinsortierung zwischen der Plasmamembran und den intrazellulären Kompartimenten beteiligt. Die nicht funktionelle  $\mu$ 2-Kette, die nicht mehr an YXX $\Phi$ -Motive binden kann, sollte mit den anderen, endogenen AP-2-Untereinheiten der Oozyte assoziieren und zu einem defekten AP-2 führen, was in einer verminderten Internalisation und damit einem höheren Strom resultieren sollte. Dieses war jedoch nicht der Fall. Allerdings wurde weder die Expression der  $\mu$ 2-Kette durch die Oozyte bewiesen noch ist klar, ob bei erfolgreicher Expression die verwendeten humanen  $\mu$ 2-Untereinheiten mit den AP-2-Untereinheiten von *Xenopus laevis* assoziieren. Hier wären möglicherweise Versuche mit dem vollständigen humanen AP-2-Komplex bzw. Analysen in einem anderen Expressionssystem wie transfizierte Säugetierzellen eine Alternative.

Bei der Untersuchung weiterer Signalmotive im C-terminalen Abschnitt von Barttin wurde ein [DE]XXXL[LI]-Motiv entdeckt, dessen Mutation zur Erhöhung der Leitfähigkeit von CIC-Ka/Barttin führt. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Deletion der 35 Aminosäuren umfassenden Barttin-Region 98Y-L132 zu einem deutlichen Stromanstieg führt. In dieser Region befinden sich zwei Motive, die für die Regulation von Bedeutung zu sein scheinen.

[DE]XXXL[LI]-Motive sind bei der schnellen Internalisierung von Plasmamembranproteinen und bei Transportvorgängen zu den Lysosomen von Bedeutung [Letourneur und Klausner, 1992]. Sie interagieren dafür - ähnlich wie die YXX $\Phi$ -Motive - mit den AP-Komplexen 1-3 (s. «Einleitung») [Bonifacino und Traub, 2003]. Außerdem sind diese Motive wie die YXX $\Phi$ -Motiv auch am Transport in Richtung der basolateralen Membran beteiligt [Matter et al., 1994] [Miranda et al., 2001]. Eine derartige Funktion des Motivs wäre für Barttin gut denkbar, da Barttin sowohl in der Niere als auch im Innenohr basolateral exprimiert wird. Ob diese Vermutung zutrifft, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Hier könnten Versuche mit transfizierten polarisierten Zellen wie z.B. MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney) neue Erkenntnisse liefern, indem man die Zielsteuerung der entsprechenden Mutanten beobachtet.

Ein weiterer interessanter Aspekt des [DE]XXXL[LI]-Motivs in Barttin ist eine potentielle Regulationsmöglichkeit durch Phosphorylierung. Für die CD3- $\gamma$ -Kette ist die Sequenz SDKQTLL beschrieben. Die Phosphorylierung des Serin-Rests führt für den T-Zell-Rezeptor zur schnellen Internalisierung und zum Abbau im Lysosom [Dietrich et al., 1994] [von Essen et al., 2002]. Ähnliches gilt auch für CD4 [Pitcher et al., 1999]. Das Barttinmotiv SYSEDHRSLL zeigt gleich mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen. Ob hier eine derartige Regulation eine Rolle spielt, ist für die Zukunft eine weitere interessante Fragestellung.

Die Ergebnisse der Analysen zur Barttin-Primärstruktur weisen auf eine Regulation durch die AP-Komplexe hin. Für das DHRSSL-Motiv ist dieses sehr wahrscheinlich. Die Bindungsstelle der [DE]XXXL[LI]-Motive am AP-Komplex ist - im Gegensatz zu den YXX $\Phi$ -Motiven - noch nicht bekannt. Es ist durchaus möglich, dass ein bis heute noch nicht identifiziertes Protein an der Interaktion dieser Motive mit den APs beteiligt ist [Bonifacino und Traub, 2003]. Für die Barttin-Region Y98 ist es ebenfalls denkbar, dass es sich hier um ein YXX $\Phi$ -Signal handelt, das mit der  $\mu$ -Untereinheit der AP-Komplexe interagiert und nicht nur bzw. allein - wie ursprünglich angenommen - um ein PY-Motiv. YXX $\Phi$ -Endozytosesignale, die mit AP-2 interagieren, sind meistens 10-40 Aminosäurereste von den Transmembrandomänen entfernt [Bonifacino und Traub, 2003], was hier für Barttin gegeben ist.

### 6.3. Ausblick

Die Untersuchung der Eigenschaften der am Bartter-Syndrom beteiligten Proteine wird für die nächsten Jahre ein spannendes Forschungsgebiet bleiben.

Für das Verständnis der (Patho-)Physiologie von ClC-K/Barttin ist es unerlässlich, die Eigenschaften dieser Proteine weiter zu untersuchen.

Die Untersuchungen zur Stöchiometrie von ClC-K und Barttin in dieser Arbeit ergeben einen starken Hinweis auf ein äquimolares Verhältnis der beiden Proteine im Komplex. Es konnte dabei gezeigt werden, dass fusionierte Proteine aus ClC-K und Barttin sehr ähnliche Eigenschaften besitzen wie Komplexe, die nach Koexpression der beiden einzelnen Proteine entstehen. Für die Konstrukte gilt, dass Barttin und ClC-K als Fusionsprotein die Zelloberfläche erreichen und somit *ein* Molekül Barttin für eine gute Oberflächenexpression von *einem* Molekül ClC-K ausreichend ist. Diese Beobachtung ergänzt die Untersuchungen von Estevez et al. und Waldegger et al. [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002].

Weitere Untersuchungen sollten im nativen Gewebe erfolgen und nicht im heterologen Expressionssystem. Dies ermöglicht die Bestimmung der Stöchiometrie unter Säugetier-*in-vivo*-Bedingungen. Dabei wäre auch eine Suche nach anderen Proteinen, die vielleicht mit dem Komplex assoziiert sind, möglich.

Eine Kristallisation von ClC-K/Barttin wäre gleichfalls von entscheidender Bedeutung und würde nicht nur die Stöchiometrie sicher aufklären, sondern könnte möglicherweise auch Hinweise liefern, ob Barttin neben der Steigerung der Oberflächenexpression auch direkt die Kanalpore von ClC-K verändert. Die von Waldegger et al. gefundenen Veränderungen der Kanaleigenschaften hinsichtlich der Kalziumsensitivität sind schwierig zu bewerten [Waldegger et al., 2002]. Problematisch ist hier insbesondere die große Stromamplitudendifferenz von ClC-K1 und ClC-K1/Barttin. Weiterhin ist eine Beteiligung von Barttin an der Kanalpore eher unwahrscheinlich, da die Ionenselektivität durch Barttin nicht beeinflusst wird.

Die Untersuchung einer Barttin-defizienten Maus wird die Pathophysiologie des Bartter-Syndroms Typ IV weiter charakterisieren.

Die Mechanismen, die auf der einen Seite ClC-K/Barttin an die Zelloberfläche führen und auf der anderen Seite von der Zelloberfläche entfernen, gilt es ebenso weiter zu erforschen.

ClC-K wird bei alleiniger Expression sowohl im Oozyten-System als auch in Säugetierzellen weitestgehend nicht zur Plasmamembran gesteuert [Estevez et al., 2001] [Waldegger et al., 2002] [Meyer, 2003]. Es wäre denkbar, dass Barttin Retentionssignale in ClC-K maskiert und

auf diese Weise die Oberflächenexpression von CIC-K erreicht wird. Dieser Mechanismus ist für die ATP-abhängigen Kaliumkanäle Kir6.1/2 und ihre  $\beta$ -Untereinheit SUR1 beschrieben [Zerangue et al., 1999]. Mutationsanalysen in den CIC-K-Kanälen könnten zukünftig einen solchen oder ähnlichen Mechanismus bzw. Retentionssignale in CIC-K offenbaren.

Die Regulation der Internalisierung von CIC-K/Barttin wurde ebenfalls untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Anzeichen für eine Ubiquitin-Regulation entdeckt werden. Dagegen wurde aufgrund eines Dileucin-basierten Signals ein Hinweis auf eine durch die AP-Komplexe vermittelte Endozytose gefunden. Hier sind zusätzliche Versuche nötig, um diese Vermutung weiter zu untermauern. Eine Problematik ist, dass die Bindungsstelle der [DE]XXXL[LI]-Motive an den AP-Komplexen noch nicht bekannt ist und vielleicht sogar ein bisher unbekanntes Protein mit involviert ist [Bonifacino und Traub, 2003]. Möglicherweise wären hier Koimmunpräzipitationsstudien mit WT-Barttin gegenüber der Barttin-Deletion 98Y-L132 hilfreich. Das deletierte Barttin sollte die gesuchten Interaktionspartner dann im Gegensatz zum WT-Barttin nicht präzipitieren. Es wäre also möglich nach SDS-Page mit Silberfärbung nicht-korrespondierende Banden, d.h. die Interaktionspartner, zu isolieren und sie anschließend mit Hilfe der Massenspektroskopie zu identifizieren.

Versuche mit transfizierten polarisierten Zellen (MDCK) könnten außerdem zeigen, ob die Barttin-Signale vielleicht auch an einer apikal-basolateralen Sortierung beteiligt sind.

Eine mögliche Erklärung für den Stromanstieg bei den Barttin Mutationen Y98A und LL131/132AA bzw. der Deletion 98Y-L132 wäre eine längere Verweildauer dieser CIC-K/Barttin-Komplexe in der Plasmamembran aufgrund verminderter Internalisierung, wie es z.B. auch für CIC-5 zutrifft [Schwake, 2001]. Um diese These zu überprüfen, käme die Bestimmung der Halbwertszeit der Komplexe an der Zelloberfläche in Frage, was beispielsweise mit Brefeldin A in *Xenopus-laevis*-Oozyten [Pelham, 1991] [Shimkets et al., 1997] oder Pulse-Chase-Experimenten in Säugetierzellen abgeschätzt werden könnte [Schwake, 2001].

## 7. Zusammenfassung

Das Bartter-Syndrom Typ IV mit den Leitsymptomen des renalen Salzverlusts und *sensori-neuraler* Taubheit konnte auf Mutationen im *BSND*-Gen zurückgeführt werden, welches für Barttin kodiert [Birkenhäger et al., 2001]. Barttin dient als funktionelle Untereinheit der ClC-K-Kanäle, die der Familie der spannungsabhängigen Chloridkanäle angehören, und steigert im *Xenopus-laevis*-Oozyten-System die Leitfähigkeit sowie die Oberflächenexpression der ClC-K-Kanäle [Estevez et al., 2001].

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der funktionellen Einheit aus ClC-K und Barttin.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob Barttin als funktionelle Untereinheit lediglich indirekter Regulator der ClC-K Kanäle ist, oder ob eine direkte Interaktion beider Partner, evtl. auch an der Zelloberfläche, stattfindet. Hierzu wurden Fusionsproteine von ClC-K/Barttin, bestehend aus ClC-K, einem Peptid-Bindeglied und Barttin bzw. Abschnitten von Barttin verwendet. Die Oberflächenexpression der Fusionsproteine nach Expression in *Xenopus-laevis*-Oozyten konnte mittels eines Oberflächenassays nachgewiesen werden. Barttin ist somit bei direkter Interaktion mit ClC-K in der Lage, dieses an die Zelloberfläche zu führen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die *Voltage-Clamp*-Ströme der Fusionsproteine aus ClC-K und Barttin sich entsprechend verhalten, wie ClC-K nach Koexpression mit Barttin. Diese Beobachtungen geben einen starken Hinweis auf eine direkte Interaktion von ClC-K und Barttin an der Zelloberfläche. Die Funktionalität der Fusionsproteine deutet auf eine äquimolare Stöchiometrie der Proteine im Komplex hin. Aufgrund von *Western-Blot*-Analysen, bei denen Dimere der Fusionsproteine detektiert wurden, könnte im Kanal-komplex ein Verhältnis von *zwei* Molekülen ClC-K zu *zwei* Molekülen Barttin vorliegen.

Konstrukte, die ClC-K und lediglich den zytoplasmatischen, C-terminalen Abschnitt von Barttin enthalten, unterscheiden sich weder elektrophysiologisch noch in ihrer Oberflächenexpression von ClC-K. Diese Beobachtung zeigt die wichtige Funktion der N-terminalen Transmembran-domänen von Barttin und verdeutlicht, dass Signale im C-terminalen Abschnitt von Barttin allein nicht ausreichen, um ClC-K zu aktivieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Mechanismen, die an der Regulation der Oberflächenexpression von CIC-K/Barttin beteiligt sein könnten, untersucht werden. Barttin besitzt ein mutmaßliches PY-Motiv im Bereich des Tyrosinrests Y98, über das eine Ubiquitin-abhängige Internalisierung der Oberflächenkomplexe aus CIC-K und Barttin stattfinden könnte. Konkurrenzexperimente mit WW-Domänen verschiedener Ubiquitinligasen, die die Bindung einer endogenen Ligase an das beschriebene Motiv verhindern sollten, zeigten im Oozyten-System keinen Hinweis auf einen solchen Regulationsmechanismus. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von Tyrosin-basierten Sortierungsmotiven sowie Dileucinmotiven an der Regulation von Barttin untersucht, die durch Interaktion mit Adapterkomplexen zu einer Clathrin-assoziierten Endozytose der Proteine führen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Mutation eines Dileucin-Motivs in Barttin als auch eine Deletion der Barttin-Region Y98-L132 zu einer Erhöhung der CIC-K-Ströme führt. Die deletierte Region umfasst neben dem Dileucin-Motiv auch das Tyrosin Y98, das als zentraler Anteil des oben erwähnten PY-Motivs überlappend auch Teil eines Tyrosin-basierten Sortierungssignals sein kann. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, dass eine gezielte Regulation der Oberflächenexpression des Komplexes aus CIC-K und Barttin über Adapterkomplexe stattfindet.

## 8. Literaturverzeichnis

- Accardi, A. und C. Miller (2004) *Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl-channels*. **Nature** 427 (6977): 803-807.
- Adachi, S., S. Uchida, H. Ito, M. Hata, M. Hiroe, F. Marumo und S. Sasaki (1994) *Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney*. **J Biol Chem** 269 (26): 17677-17683.
- Aguilar, R. C., M. Boehm, I. Gorshkova, R. J. Crouch, K. Tomita, T. Saito, H. Ohno und J. S. Bonifacino (2001) *Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4*. **J Biol Chem** 276 (16): 13145-13152.
- Angers, A., A. R. Ramjaun und P. S. McPherson (2004) *The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system*. **J Biol Chem** 279 (12): 11471-11479.
- Ashcroft, F. M. (2000) *Ion Channels and Disease*. **Academic Press**, San Diego
- Asplin, J. R. und F. L. Coe (2001) *Hereditäre tubuläre Störungen*. In: M. Dietel, J. Dudenhausen und N. Suttrop (Hrsg.) *Harrisons Innere Medizin 2*. 1758-1765. **ABW Wissenschaftsverlag**, Berlin
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. D. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl (1993) *Current protocols in molecular biology*. **J. Wiley & Sons**, New York
- Babenko, A. P., G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan und J. Bryan (1999) *Sulfonylurea receptors set the maximal open probability, ATP sensitivity and plasma membrane density of KATP channels*. **FEBS Lett** 445 (1): 131-136.
- Bettinelli, A., S. Ciarmatori, L. Cesareo, S. Tedeschi, G. Ruffa, A. C. Appiani, A. Rosini, G. Grumieri, B. Mercuri, M. Sacco, G. Leozappa, S. Binda, M. Cecconi, C. Navone, C. Curcio, M. L. Syren und G. Casari (2000) *Phenotypic variability in Bartter syndrome type I*. **Pediatr Nephrol** 14 (10-11): 940-945.
- Birkenhäger, R., E. Otto, M. J. Schurmann, M. Vollmer, E. M. Ruf, I. Maier-Lutz, F. Beekmann, A. Fekete, H. Omran, D. Feldmann, D. V. Milford, N. Jeck, M. Konrad, D. Landau, N. V. Knoers, C. Antignac, R. Sudbrak, A. Kispert und F. Hildebrandt (2001) *Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure*. **Nat Genet** 29 (3): 310-314.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. **Nucleic Acids Res** 7 (6): 1513-1523.
- Blair, E., C. Redwood, H. Ashrafian, M. Oliveira, J. Broxholme, B. Kerr, A. Salmon, I. Ostman-Smith und H. Watkins (2001) *Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis*. **Hum Mol Genet** 10 (11): 1215-1220.
- Blount, P., M. M. Smith und J. P. Merlie (1990) *Assembly intermediates of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor in stably transfected fibroblasts*. **J Cell Biol** 111 (6 Pt 1): 2601-2611.
- Boll, W., H. Ohno, Z. Songyang, I. Rapoport, L. C. Cantley, J. S. Bonifacino und T. Kirchhausen (1996) *Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes*. **Embo J** 15 (21): 5789-5795.

- Bonifacino, J. S., P. Cosson und R. D. Klausner (1990) *Colocalized transmembrane determinants for ER degradation and subunit assembly explain the intracellular fate of TCR chains*. **Cell** 63 (3): 503-513.
- Bonifacino, J. S. und A. M. Weissman (1998) *Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways*. **Annu Rev Cell Dev Biol** 14 19-57.
- Bonifacino, J. S. und L. M. Traub (2003) *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. **Annu Rev Biochem** 72 395-447.
- Borsani, G., E. I. Rugarli, M. Tagliatalata, C. Wong und A. Ballabio (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 (1): 131-141.
- Bösl, M. R., V. Stein, C. Hubner, A. A. Zdebik, S. E. Jordt, A. K. Mukhopadhyay, M. S. Davidoff, A. F. Holstein und T. J. Jentsch (2001) *Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel disruption*. **Embo J** 20 (6): 1289-1299.
- Bowne, S. J., L. S. Sullivan, S. H. Blanton, C. L. Cepko, S. Blackshaw, D. G. Birch, D. Hughbanks-Wheaton, J. R. Heckenlively und S. P. Daiger (2002) *Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa*. **Hum Mol Genet** 11 (5): 559-568.
- Brandt, S. und T. J. Jentsch (1995) *CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family*. **FEBS Lett** 377 (1): 15-20.
- Bremnes, T., V. Lauvrak, B. Lindqvist und O. Bakke (1998) *A region from the medium chain adaptor subunit (mu) recognizes leucine- and tyrosine-based sorting signals*. **J Biol Chem** 273 (15): 8638-8645.
- Brown, E. M., N. Chattopadhyay, P. M. Vassilev und S. C. Hebert (1998) *The calcium-sensing receptor (CaR) permits Ca<sup>2+</sup> to function as a versatile extracellular first messenger*. **Recent Prog Horm Res** 53 257-280; discussion 280-251.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez und J. M. Short (1987) *XII-blue : a high efficiency plasmid transforming Reca Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection*. **Biotechniques** 5 (4): 376-379.
- Cole, K. S. (1949) *Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane*. **Arch Sci Physiol** 3 253-258.
- Cole, K. S. (1979) *Mostly membranes*. **Annu Rev Physiol** 41 1-24.
- Collins, B. M., A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans und D. J. Owen (2002) *Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex*. **Cell** 109 (4): 523-535.
- Craig, H. M., T. R. Reddy, N. L. Riggs, P. P. Dao und J. C. Guatelli (2000) *Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif*. **Virology** 271 (1): 9-17.
- Delpire, E., J. Lu, R. England, C. Dull und T. Thorne (1999) *Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter*. **Nat Genet** 22 (2): 192-195.
- Dietrich, J., X. Hou, A. M. Wegener und C. Geisler (1994) *CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor*. **Embo J** 13 (9): 2156-2166.
- Dixon, M. J., J. Gazzard, S. S. Chaudhry, N. Sampson, B. A. Schulte und K. P. Steel (1999) *Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene Slc12a2 results in deafness in mice*. **Hum Mol Genet** 8 (8): 1579-1584.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait und R. MacKinnon (1998) *The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity*. **Science** 280 (5360): 69-77.

- Dutzler, R., E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait und R. MacKinnon (2002) *X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity*. **Nature** 415 (6869): 287-294.
- Embark, H. M., C. Bohmer, M. Palmada, J. Rajamanickam, A. W. Wyatt, S. Wallisch, G. Capasso, P. Waldegger, H. W. Seyberth, S. Waldegger und F. Lang (2004) *Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases*. **Kidney Int** 66 (5): 1918-1925.
- Estevez, R., T. Boettger, V. Stein, R. Birkenhager, E. Otto, F. Hildebrandt und T. J. Jentsch (2001) *Barttin is a Cl-channel beta-subunit crucial for renal Cl-reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion*. **Nature** 414 (6863): 558-561.
- Estevez, R., M. Pusch, C. Ferrer-Costa, M. Orozco und T. J. Jentsch (2004) *Functional and structural conservation of CBS domains from CLC channels*. **J Physiol**
- Fink, M., F. Duprat, F. Lesage, C. Heurteaux, G. Romey, J. Barhanin und M. Lazdunski (1996) *A new K<sup>+</sup> channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression*. **J Biol Chem** 271 (42): 26341-26348.
- Fisher, S. E., G. C. Black, S. E. Lloyd, E. Hatchwell, O. Wrong, R. V. Thakker und I. W. Craig (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 (11): 2053-2059.
- Frattini, A., P. J. Orchard, C. Sobacchi, S. Giliani, M. Abinun, J. P. Mattsson, D. J. Keeling, A. K. Andersson, P. Wallbrandt, L. Zecca, L. D. Notarangelo, P. Vezzoni und A. Villa (2000) *Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis*. **Nat Genet** 25 (3): 343-346.
- Fromm, M. und K. Hierholzer (2000) *Epithelien*. In: R. F. Schmidt, G. Thews und F. Lang (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin
- Gitelman, H. J., J. B. Graham und L. G. Welt (1966) *A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia*. **Trans Assoc Am Phys** 79 221-235.
- Gollob, M. H., J. J. Seger, T. N. Gollob, T. Tapscott, O. Gonzales, L. Bachinski und R. Roberts (2001a) *Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy*. **Circulation** 104 (25): 3030-3033.
- Gollob, M. H., M. S. Green, A. S. Tang, T. Gollob, A. Karibe, A. S. Ali Hassan, F. Ahmad, R. Lozado, G. Shah, L. Fananapazir, L. L. Bachinski und R. Roberts (2001b) *Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome*. **N Engl J Med** 344 (24): 1823-1831.
- Gough, N. R., M. E. Zweifel, O. Martinez-Augustin, R. C. Aguilar, J. S. Bonifacino und D. M. Fambrough (1999) *Utilization of the indirect lysosome targeting pathway by lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) is influenced largely by the C-terminal residue of their GYXXphi targeting signals*. **J Cell Sci** 112 ( Pt 23) 4257-4269.
- Gründer, S., A. Thiemann, M. Pusch und T. J. Jentsch (1992) *Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume*. **Nature** 360 (6406): 759-762.
- Gundersen, C. B., R. Miledi und I. Parker (1983) *Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in Xenopus oocytes*. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 219 (1214): 103-109.
- Gurdon, J. B., C. D. Lane, H. R. Woodland und G. Marbaix (1971) *Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells*. **Nature** 233 (5316): 177-182.
- Hammond, D. E., S. Urbe, G. F. Vande Woude und M. J. Clague (2001) *Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor*. **Oncogene** 20 (22): 2761-2770.
- Hanahan, D. (1983) *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. **J Mol Biol** 166 (4): 557-580.

- Hardie, D. G. und S. A. Hawley (2001) *AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited*. **Bioessays** 23 (12): 1112-1119.
- Harter, C. und I. Mellman (1992) *Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane*. **J Cell Biol** 117 (2): 311-325.
- Herbert, S. C. (2003) *Bartter Syndrome*. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 12 (5): 527-532.
- Hicke, L. und H. Riezman (1996) *Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis*. **Cell** 84 (2): 277-287.
- Hicke, L. (1999) *Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels*. **Trends Cell Biol** 9 (3): 107-112.
- Hicke, L. (2001a) *A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin*. **Cell** 106 (5): 527-530.
- Hicke, L. (2001b) *Protein regulation by monoubiquitin*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2 (3): 195-201.
- Higuchi, R. (1990) *Recombinant PCR*. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sinnsky und T. J. White (Hrsg.) *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. 177-183. **Academis Press**, San Diego
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. **Sinauer Associates Inc.**, Sunderland, Massachusetts
- Hirst, J., N. A. Bright, B. Rous und M. S. Robinson (1999) *Characterization of a fourth adaptor-related protein complex*. **Mol Biol Cell** 10 (8): 2787-2802.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley und M. Katz (1949) *Ionic current underlying activity in the giant axon of the squid*. **Arch Sci Physiol** 3 129-150.
- Hodgkin, A. L. und A. F. Huxley (1952) *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. **J Physiol** 117 (4): 500-544.
- Hofmann, M. W., S. Honing, D. Rodionov, B. Dobberstein, K. von Figura und O. Bakke (1999) *The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains*. **J Biol Chem** 274 (51): 36153-36158.
- Honing, S., I. V. Sandoval und K. von Figura (1998) *A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3*. **Embo J** 17 (5): 1304-1314.
- Huber, S. M., C. Duranton, G. Henke, C. Van De Sand, V. Heussler, E. Shumilina, C. D. Sandu, V. Tanneur, V. Brand, R. S. Kasinathan, K. S. Lang, P. G. Kremsner, C. A. Hubner, M. B. Rust, K. Dedek, T. J. Jentsch und F. Lang (2004) *Plasmodium induces swelling-activated ClC-2 anion channels in the host erythrocyte*. **J Biol Chem**
- Huibregtse, J. M., J. C. Yang und S. L. Beaudenon (1997) *The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94 (8): 3656-3661.
- Hunziker, W., C. Harter, K. Matter und I. Mellman (1991) *Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant*. **Cell** 66 (5): 907-920.
- Isom, L. L., K. S. De Jongh und W. A. Catterall (1994) *Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels*. **Neuron** 12 (6): 1183-1194.
- Jeck, N., M. Konrad, M. Peters, S. Weber, K. E. Bonzel und H. W. Seyberth (2000) *Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype*. **Pediatr Res** 48 (6): 754-758.
- Jeck, N., C. Derst, E. Wischmeyer, H. Ott, S. Weber, C. Rudin, H. W. Seyberth, J. Daut, A. Karschin und M. Konrad (2001) *Functional heterogeneity of ROMK mutations linked to hyperprostaglandin E syndrome*. **Kidney Int** 59 (5): 1803-1811.
- Jeck, N., P. Waldegger, J. Doroszewicz, H. Seyberth und S. Waldegger (2004a) *A common sequence variation of the CLCNKB gene strongly activates ClC-Kb chloride channel activity*. **Kidney Int** 65 (1): 190-197.

- Jeck, N., S. Waldegger, A. Lampert, C. Boehmer, P. Waldegger, P. A. Lang, B. Wissinger, B. Friedrich, T. Risler, R. Moehle, U. E. Lang, P. Zill, B. Bondy, E. Schaeffeler, S. Asante-Poku, H. Seyberth, M. Schwab und F. Lang (2004b) *Activating Mutation of the Renal Epithelial Chloride Channel ClC-Kb Predisposing to Hypertension. Hypertension*
- Jentsch, T. J., K. Steinmeyer und G. Schwarz (1990) *Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. Nature* 348 (6301): 510-514.
- Jentsch, T. J., T. Friedrich, A. Schriever und H. Yamada (1999) *The CLC chloride channel family. Pflugers Arch* 437 (6): 783-795.
- Jentsch, T. J. (2000) *Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. Nat Rev Neurosci* 1 (1): 21-30.
- Jentsch, T. J. (2002) *Chloride channels are different. Nature* 415 (6869): 276-277.
- Jentsch, T. J., V. Stein, F. Weinreich und A. A. Zdebik (2002) *Molecular structure and physiological function of chloride channels. Physiol Rev* 82 (2): 503-568.
- Joazeiro, C. A., S. S. Wing, H. Huang, J. D. Levenson, T. Hunter und Y. C. Liu (1999) *The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. Science* 286 (5438): 309-312.
- Jordt, S. E. und T. J. Jentsch (1997) *Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. Embo J* 16 (7): 1582-1592.
- Kamynina, E., C. Debonneville, M. Bens, A. Vandewalle und O. Staub (2001) *A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. Faseb J* 15 (1): 204-214.
- Kawasaki, M., S. Uchida, T. Monkawa, A. Miyawaki, K. Mikoshiba, F. Marumo und S. Sasaki (1994) *Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. Neuron* 12 (3): 597-604.
- Kennan, A., A. Aherne, A. Palfi, M. Humphries, A. McKee, A. Stitt, D. A. Simpson, K. Demtroder, T. Orntoft, C. Ayuso, P. F. Kenna, G. J. Farrar und P. Humphries (2002) *Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and Rho(-/-) mice. Hum Mol Genet* 11 (5): 547-557.
- Kieferle, S., P. Fong, M. Bens, A. Vandewalle und T. J. Jentsch (1994) *Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (15): 6943-6947.
- Klausner, R. D., J. Lippincott-Schwartz und J. S. Bonifacino (1990) *The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. Annu Rev Cell Biol* 6 403-431.
- Kobayashi, K., S. Uchida, S. Mizutani, S. Sasaki und F. Marumo (2001) *Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. J Am Soc Nephrol* 12 (7): 1327-1334.
- Koch, M. C., K. Steinmeyer, C. Lorenz, K. Ricker, F. Wolf, M. Otto, B. Zoll, F. Lehmann-Horn, K. H. Grzeschik und T. J. Jentsch (1992) *The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. Science* 257 (5071): 797-800.
- Kokubo, Y., N. Iwai, N. Tago, N. Inamoto, A. Okayama, H. Yamawaki, H. Naraba und H. Tomoike (2005) *Association analysis between hypertension and CYBA, CLCNKB, and KCNMB1 functional polymorphisms in the Japanese population--the Suita Study. Circ J* 69 (2): 138-142.
- Kopito, R. R. (1997) *ER quality control: the cytoplasmic connection. Cell* 88 (4): 427-430.
- Kornak, U., A. Schulz, W. Friedrich, S. Uhlhaas, B. Kremens, T. Voit, C. Hasan, U. Bode, T. J. Jentsch und C. Kubisch (2000) *Mutations in the  $\alpha 3$  subunit of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. Hum Mol Genet* 9 (13): 2059-2063.

- Kornak, U., D. Kasper, M. R. Bosl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Dellling und T. J. Jentsch (2001) *Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man*. **Cell** 104 (2): 205-215.
- Kowalski, J. M., R. N. Parekh, J. Mao und K. D. Wittrup (1998) *Protein folding stability can determine the efficiency of escape from endoplasmic reticulum quality control*. **J Biol Chem** 273 (31): 19453-19458.
- Krieg, P. A. und D. A. Melton (1984) *Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs*. **Nucleic Acids Res** 12 (18): 7057-7070.
- Kumar, S., Y. Tomooka und M. Noda (1992) *Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain*. **Biochem Biophys Res Commun** 185 (3): 1155-1161.
- Kumar, S., K. F. Harvey, M. Kinoshita, N. G. Copeland, M. Noda und N. A. Jenkins (1997) *cDNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse Nedd4 gene*. **Genomics** 40 (3): 435-443.
- Kumar, S., A. L. Talis und P. M. Howley (1999) *Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination*. **J Biol Chem** 274 (26): 18785-18792.
- Kurtz, I. (1998) *Molecular pathogenesis of Bartter's and Gitelman's syndromes*. **Kidney Int** 54 (4): 1396-1410.
- Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature** 227 (259): 680-685.
- Letourneur, F. und R. D. Klausner (1992) *A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains*. **Cell** 69 (7): 1143-1157.
- Levkowitz, G., H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz und Y. Yarden (1999) *Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1*. **Mol Cell** 4 (6): 1029-1040.
- Liantonio, A., M. Pusch, A. Picollo, P. Guida, A. De Luca, S. Pierno, G. Fracchiolla, F. Loiodice, P. Tortorella und D. Conte Camerino (2004) *Investigations of pharmacologic properties of the renal CLC-K1 chloride channel co-expressed with barttin by the use of 2-(p-Chlorophenoxy)propionic acid derivatives and other structurally unrelated chloride channels blockers*. **J Am Soc Nephrol** 15 (1): 13-20.
- Lin, X., M. Liang und X. H. Feng (2000) *Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling*. **J Biol Chem** 275 (47): 36818-36822.
- Lloyd, S. E., S. H. Pearce, S. E. Fisher, K. Steinmeyer, B. Schwappach, S. J. Scheinman, B. Harding, A. Bolino, M. Devoto, P. Goodyer, S. P. Rigden, O. Wrong, T. J. Jentsch, I. W. Craig und R. V. Thakker (1996) *A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases*. **Nature** 379 (6564): 445-449.
- Lorenz, C., M. Pusch und T. J. Jentsch (1996) *Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93 (23): 13362-13366.
- Lu, M., T. Wang, Q. Yan, X. Yang, K. Dong, M. A. Knepper, W. Wang, G. Giebisch, G. E. Shull und S. C. Hebert (2002) *Absence of small conductance K<sup>+</sup> channel (SK) activity in apical membranes of thick ascending limb and cortical collecting duct in ROMK (Bartter's) knockout mice*. **J Biol Chem** 277 (40): 37881-37887.
- Lu, M., T. Wang, Q. Yan, W. Wang, G. Giebisch und S. C. Hebert (2004) *ROMK is required for expression of the 70-pS K channel in the thick ascending limb*. **Am J Physiol Renal Physiol** 286 (3): F490-495.
- Ludewig, U., M. Pusch und T. J. Jentsch (1996) *Two physically distinct pores in the dimeric CLC-0 chloride channel*. **Nature** 383 (6598): 340-343.

- Maduke, M., C. Miller und J. A. Mindell (2000) *A decade of CLC chloride channels: structure, mechanism, and many unsettled questions*. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 29 411-438.
- Marchese, A., C. Raiborg, F. Santini, J. H. Keen, H. Stenmark und J. L. Benovic (2003) *The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4*. **Dev Cell** 5 (5): 709-722.
- Marks, M. S., P. A. Roche, E. van Donselaar, L. Woodruff, P. J. Peters und J. S. Bonifacino (1995) *A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments*. **J Cell Biol** 131 (2): 351-369.
- Marks, M. S., L. Woodruff, H. Ohno und J. S. Bonifacino (1996) *Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components*. **J Cell Biol** 135 (2): 341-354.
- Marmont, G. (1949) *Studies on the axon membrane. I. A new method*. **J Cell Comp Physiol** 34 351-382.
- Matsumura, Y., S. Uchida, Y. Kondo, H. Miyazaki, S. B. Ko, A. Hayama, T. Morimoto, W. Liu, M. Arisawa, S. Sasaki und F. Marumo (1999) *Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel*. **Nat Genet** 21 (1): 95-98.
- Matter, K., E. M. Yamamoto und I. Mellman (1994) *Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells*. **J Cell Biol** 126 (4): 991-1004.
- Meyer, S. (2003) *Struktur-Funktionsanalyse von CIC-Kb und Barttin*. **Diplomarbeit**. Universität Hamburg
- Middleton, R. E., D. J. Pheasant und C. Miller (1996) *Homodimeric architecture of a CIC-type chloride ion channel*. **Nature** 383 (6598): 337-340.
- Miledi, R., I. Parker und K. Sumikawa (1983) *Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in Xenopus oocytes*. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 218 (1213): 481-484.
- Miller, C. (1982) *Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 299 (1097): 401-411.
- Miller, C. und M. M. White (1984) *Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 81 (9): 2772-2775.
- Miranda, K. C., T. Khromykh, P. Christy, T. L. Le, C. J. Gottardi, A. S. Yap, J. L. Stow und R. D. Teasdale (2001) *A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells*. **J Biol Chem** 276 (25): 22565-22572.
- Miyazaki, K., T. Ozaki, C. Kato, T. Hanamoto, T. Fujita, S. Irino, K. Watanabe, T. Nakagawa und A. Nakagawara (2003) *A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity*. **Biochem Biophys Res Commun** 308 (1): 106-113.
- Mohammad-Panah, R., R. Harrison, S. Dhani, C. Ackerley, L. J. Huan, Y. Wang und C. E. Bear (2003) *The chloride channel CIC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking*. **J Biol Chem** 278 (31): 29267-29277.
- Neher, E. und B. Sakmann (1976) *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. **Nature** 260 (5554): 799-802.
- Nesterov, A., R. E. Carter, T. Sorkina, G. N. Gill und A. Sorkin (1999) *Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis*. **Embo J** 18 (9): 2489-2499.
- Neyroud, N., F. Tesson, I. Denjoy, M. Leibovici, C. Donger, J. Barhanin, S. Faure, F. Gary, P. Coumel, C. Petit, K. Schwartz und P. Guicheney (1997) *A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome*. **Nat Genet** 15 (2): 186-189.

- Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen und J. S. Bonifacino (1995) *Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins*. **Science** 269 (5232): 1872-1875.
- Ohno, H., M. C. Fournier, G. Poy und J. S. Bonifacino (1996) *Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains*. **J Biol Chem** 271 (46): 29009-29015.
- Ohno, H., R. C. Aguilar, D. Yeh, D. Taura, T. Saito und J. S. Bonifacino (1998) *The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals*. **J Biol Chem** 273 (40): 25915-25921.
- Pelham, H. R. (1991) *Multiple targets for brefeldin A*. **Cell** 67 (3): 449-451.
- Perry, W. L., C. M. Hustad, D. A. Swing, T. N. O'Sullivan, N. A. Jenkins und N. G. Copeland (1998) *The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice*. **Nat Genet** 18 (2): 143-146.
- Pickart, C. M. (2001) *Mechanisms underlying ubiquitination*. **Annu Rev Biochem** 70 503-533.
- Piccolo, A., A. Liantonio, M. P. Didonna, L. Elia, D. C. Camerino und M. Pusch (2004) *Molecular determinants of differential pore blocking of kidney CLC-K chloride channels*. **EMBO Rep** 5 (6): 584-589.
- Piccolo, A. und M. Pusch (2005) *Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5*. **Nature** 436 (7049): 420-423.
- Pirozzi, G., S. J. McConnell, A. J. Uveges, J. M. Carter, A. B. Sparks, B. K. Kay und D. M. Fowlkes (1997) *Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets*. **J Biol Chem** 272 (23): 14611-14616.
- Pitcher, C., S. Honing, A. Fingerhut, K. Bowers und M. Marsh (1999) *Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation*. **Mol Biol Cell** 10 (3): 677-691.
- Piwon, N., W. Gunther, M. Schwake, M. R. Bosl und T. J. Jentsch (2000) *CLC-5 Cl<sup>-</sup>-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease*. **Nature** 408 (6810): 369-373.
- Plant, P. J., H. Yeger, O. Staub, P. Howard und D. Rotin (1997) *The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent plasma membrane localization*. **J Biol Chem** 272 (51): 32329-32336.
- Pond, L., L. A. Kuhn, L. Teyton, M. P. Schutze, J. A. Tainer, M. R. Jackson und P. A. Peterson (1995) *A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway*. **J Biol Chem** 270 (34): 19989-19997.
- Qiu, L., C. Joazeiro, N. Fang, H. Y. Wang, C. Elly, Y. Altman, D. Fang, T. Hunter und Y. C. Liu (2000) *Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hec-type E3 ubiquitin ligase*. **J Biol Chem** 275 (46): 35734-35737.
- Rajasekaran, A. K., J. S. Humphrey, M. Wagner, G. Miesenbock, A. Le Bivic, J. S. Bonifacino und E. Rodriguez-Boulan (1994) *TGN38 recycles basolaterally in polarized Madin-Darby canine kidney cells*. **Mol Biol Cell** 5 (10): 1093-1103.
- Rapoport, I., Y. C. Chen, P. Cupers, S. E. Shoelson und T. Kirchhausen (1998) *Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site*. **Embo J** 17 (8): 2148-2155.
- Rebhun, J. F. und J. H. Pratt (1998) *Molecular cloning of Nedd4 from Xenopus laevis*. **DNA Seq** 9 (5-6): 295-306.
- Rhodes, K. J., B. W. Strassle, M. M. Monaghan, Z. Bekele-Arcuri, M. F. Matos und J. S. Trimmer (1997) *Association and colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K<sup>+</sup> channel complexes*. **J Neurosci** 17 (21): 8246-8258.

- Rodionov, D. G. und O. Bakke (1998)  
*Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain.* **J Biol Chem** 273 (11): 6005-6008.
- Roth, A. F. und N. G. Davis (1996)  
*Ubiquitination of the yeast a-factor receptor.* **J Cell Biol** 134 (3): 661-674.
- Rotin, D., O. Staub und R. Haguenauer-Tsapis (2000)  
*Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases.* **J Membr Biol** 176 (1): 1-17.
- Rugarli, E. I., D. A. Adler, G. Borsani, K. Tsuchiya, B. Franco, X. Hauge, C. Disteché, V. Chapman und A. Ballabio (1995)  
*Different chromosomal localization of the Clcn4 gene in Mus spretus and C57BL/6J mice.* **Nat Genet** 10 (4): 466-471.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2000)  
*Molecular cloning: a laboratory manual.* **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, Woodbury NY
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977)  
*DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* **Proc Natl Acad Sci U S A** 74 (12): 5463-5467.
- Sazuka, T., Y. Tomooka, S. Kathju, Y. Ikawa, M. Noda und S. Kumar (1992)  
*Identification of a developmentally regulated gene in the mouse central nervous system which encodes a novel proline rich protein.* **Biochim Biophys Acta** 1132 (3): 240-248.
- Scarafia, L. E., A. Winter und D. C. Swinney (2000)  
*Quantitative expression analysis of the cellular specificity of HECT-domain ubiquitin E3 ligases.* **Physiol Genomics** 4 (2): 147-153.
- Scheel, O., A. A. Zdebik, S. Lourdel und T. J. Jentsch (2005)  
*Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins.* **Nature** 436 (7049): 424-427.
- Schild, L., C. M. Canessa, R. A. Shimkets, I. Gautschi, R. P. Lifton und B. C. Rossier (1995)  
*A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the Xenopus laevis oocyte expression system.* **Proc Natl Acad Sci U S A** 92 (12): 5699-5703.
- Schild, L., Y. Lu, I. Gautschi, E. Schneeberger, R. P. Lifton und B. C. Rossier (1996)  
*Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome.* **Embo J** 15 (10): 2381-2387.
- Schlingmann, K. P., M. Konrad, N. Jeck, P. Waldegger, S. C. Reinalter, M. Holder, H. W. Seyberth und S. Waldegger (2004)  
*Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels.* **N Engl J Med** 350 (13): 1314-1319.
- Schmidt-Rose, T. und T. J. Jentsch (1997a)  
*Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1.* **J Biol Chem** 272 (33): 20515-20521.
- Schmidt-Rose, T. und T. J. Jentsch (1997b)  
*Transmembrane topology of a CLC chloride channel.* **Proc Natl Acad Sci U S A** 94 (14): 7633-7638.
- Schulze-Bahr, E., Q. Wang, H. Wedekind, W. Haverkamp, Q. Chen, Y. Sun, C. Rubie, M. Hordt, J. A. Towbin, M. Borggreffe, G. Assmann, X. Qu, J. C. Somberg, G. Breithardt, C. Oberti und H. Funke (1997)  
*KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome.* **Nat Genet** 17 (3): 267-268.
- Schwake, M. (2001)  
*Untersuchungen zur Zielsteuerung von Ionenkanälen anhand ausgewählter Mitglieder der CIC- und KCNQ-Familien.* **Dissertation**. Freie Universität Berlin
- Schwake, M., T. Friedrich und T. J. Jentsch (2001)  
*An internalization signal in CIC-5, an endosomal Cl-channel mutated in dent's disease.* **J Biol Chem** 276 (15): 12049-12054.

- Scott, J. W., S. A. Hawley, K. A. Green, M. Anis, G. Stewart, G. A. Scullion, D. G. Norman und D. G. Hardie (2004) *CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations*. **J Clin Invest** 113 (2): 274-284.
- Seyberth, H. W., W. Rascher, H. Schweer, P. G. Kuhl, O. Mehls und K. Scharer (1985) *Congenital hypokalemia and hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome*. **J Pediat** 107 694-701.
- Sheng, M., M. L. Tsaur, Y. N. Jan und L. Y. Jan (1994) *Contrasting subcellular localization of the Kv1.2 K<sup>+</sup> channel subunit in different neurons of rat brain*. **J Neurosci** 14 (4): 2408-2417.
- Shi, G., K. Nakahira, S. Hammond, K. J. Rhodes, L. E. Schechter und J. S. Trimmer (1996) *Beta subunits promote K<sup>+</sup> channel surface expression through effects early in biosynthesis*. **Neuron** 16 (4): 843-852.
- Shih, S. C., K. E. Sloper-Mould und L. Hicke (2000) *Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors*. **Embo J** 19 (2): 187-198.
- Shimkets, R. A., R. P. Lifton und C. M. Canessa (1997) *The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis*. **J Biol Chem** 272 (41): 25537-25541.
- Simon, D. B., C. Nelson-Williams, M. J. Bia, D. Ellison, F. E. Karet, A. M. Molina, I. Vaara, F. Iwata, H. M. Cushner, M. Koolen, F. J. Gainza, H. J. Gittleman und R. P. Lifton (1996a) *Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter*. **Nat Genet** 12 (1): 24-30.
- Simon, D. B., F. E. Karet, J. Rodriguez-Soriano, J. H. Hamdan, A. DiPietro, H. Trachtman, S. A. Sanjad und R. P. Lifton (1996b) *Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK*. **Nat Genet** 14 (2): 152-156.
- Simon, D. B., R. S. Bindra, T. A. Mansfield, C. Nelson-Williams, E. Mendonca, R. Stone, S. Schurman, A. Nayir, H. Alpay, A. Bakkaloglu, J. Rodriguez-Soriano, J. M. Morales, S. A. Sanjad, C. M. Taylor, D. Pilz, A. Brem, H. Trachtman, W. Griswold, G. A. Richard, E. John und R. P. Lifton (1997) *Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III*. **Nat Genet** 17 (2): 171-178.
- Simon, D. B. und R. P. Lifton (1998) *Mutations in Na(K)Cl transporters in Gitelman's and Bartter's syndromes*. **Curr Opin Cell Biol** 10 (4): 450-454.
- Speirs, H. J., W. Y. Wang, A. V. Benjafeld und B. J. Morris (2005) *No association with hypertension of CLCNKB and TNFRSF1B polymorphisms at a hypertension locus on chromosome 1p36*. **J Hypertens** 23 (8): 1491-1496.
- Staub, O., S. Dho, P. Henry, J. Correa, T. Ishikawa, J. McGlade und D. Rotin (1996) *WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome*. **Embo J** 15 (10): 2371-2380.
- Staub, O., I. Gautschi, T. Ishikawa, K. Breitschopf, A. Ciechanover, L. Schild und D. Rotin (1997) *Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination*. **Embo J** 16 (21): 6325-6336.
- Steinmeyer, K., C. Ortlund und T. J. Jentsch (1991) *Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel*. **Nature** 354 (6351): 301-304.
- Stobrawa, S. M., T. Breiderhoff, S. Takamori, D. Engel, M. Schweizer, A. A. Zdebik, M. R. Bosl, K. Ruether, H. Jahn, A. Draguhn, R. Jahn und T. J. Jentsch (2001) *Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus*. **Neuron** 29 (1): 185-196.
- Strous, G. J. und R. Govers (1999) *The ubiquitin-proteasome system and endocytosis*. **J Cell Sci** 112 ( Pt 10) 1417-1423.

- Stühmer, W., H. Terlau und S. H. Heinemann (1992) *Xenopus oocytes for two-electrode and patch-clamp recordings*. In: H. Kettenmann und R. Grantyn (Hrsg.) *Practical electrophysiological methods*. Wiley-Liss, New York
- Takahashi, N., D. R. Chernavsky, R. A. Gomez, P. Igarashi, H. J. Gitelman und O. Smithies (2000) *Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97 (10): 5434-5439.
- Terrell, J., S. Shih, R. Dunn und L. Hicke (1998) *A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor*. **Mol Cell** 1 (2): 193-202.
- Thiemann, A., S. Grunder, M. Pusch und T. J. Jentsch (1992) *A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells*. **Nature** 356 (6364): 57-60.
- Thomas, M. A., N. Zosso, I. Scerri, N. Demaurex, M. Chanson und O. Staub (2003) *A tyrosine-based sorting signal is involved in connexin43 stability and gap junction turnover*. **J Cell Sci** 116 (Pt 11): 2213-2222.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner und C. M. Pickart (2000) *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*. **Embo J** 19 (1): 94-102.
- Trimmer, J. S. (1998) *Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits*. **Curr Opin Neurobiol** 8 (3): 370-374.
- Uchida, S., S. Sasaki, T. Furukawa, M. Hiraoka, T. Imai, Y. Hirata und F. Marumo (1993) *Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla*. **J Biol Chem** 268 (6): 3821-3824.
- Uchida, S., S. Sasaki, T. Furukawa, M. Hiraoka, T. Imai, Y. Hirata und F. Marumo (1994) *Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla*. **J Biol Chem** 269 (29): 19192.
- Uchida, S., S. Sasaki, K. Nitta, K. Uchida, S. Horita, H. Nihei und F. Marumo (1995) *Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1*. **J Clin Invest** 95 (1): 104-113.
- van Kerkhof, P., M. Sachse, J. Klumperman und G. J. Strous (2001) *Growth hormone receptor ubiquitination coincides with recruitment to clathrin-coated membrane domains*. **J Biol Chem** 276 (6): 3778-3784.
- Vandewalle, A., F. Cluzeaud, M. Bens, S. Kieferle, K. Steinmeyer und T. J. Jentsch (1997) *Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney*. **Am J Physiol** 272 (5 Pt 2): F678-688.
- Vargas-Poussou, R., C. Huang, P. Hulin, P. Houillier, X. Jeunemaitre, M. Paillard, G. Planelles, M. Dechaux, R. T. Miller und C. Antignac (2002) *Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome*. **J Am Soc Nephrol** 13 (9): 2259-2266.
- von Essen, M., C. Menne, B. L. Nielsen, J. P. Lauritsen, J. Dietrich, P. S. Andersen, K. Karjalainen, N. Odum und C. Geisler (2002) *The CD3 gamma leucine-based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down-regulation*. **J Immunol** 168 (9): 4519-4523.
- Waldegger, S. und T. J. Jentsch (2000) *Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease*. **J Biol Chem** 275 (32): 24527-24533.
- Waldegger, S., N. Jeck, P. Barth, M. Peters, H. Vitzthum, K. Wolf, A. Kurtz, M. Konrad und H. W. Seyberth (2002) *Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels*. **Pflugers Arch** 444 (3): 411-418.
- Wang, H., D. D. Kunkel, P. A. Schwartzkroin und B. L. Tempel (1994) *Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain*. **J Neurosci** 14 (8): 4588-4599.

- Watanabe, S., S. Fukumoto, H. Chang, Y. Takeuchi, Y. Hasegawa, R. Okazaki, N. Chikatsu und T. Fujita (2002) *Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome*. **Lancet** 360 (9334): 692-694.
- Waterman, H., M. Katz, C. Rubin, K. Shtiegman, S. Lavi, A. Elson, T. Jovin und Y. Yarden (2002) *A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling*. **Embo J** 21 (3): 303-313.
- Weinreich, F. und T. J. Jentsch (2001) *Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels*. **J Biol Chem** 276 (4): 2347-2353.
- Wilkinson, K. D. (2000) *Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome*. **Semin Cell Dev Biol** 11 (3): 141-148.
- Williams, M. A. und M. Fukuda (1990) *Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail*. **J Cell Biol** 111 (3): 955-966.
- Wood, J. D., J. Yuan, R. L. Margolis, V. Colomer, K. Duan, J. Kushi, Z. Kaminsky, J. J. Kleiderlein, A. H. Sharp und C. A. Ross (1998) *Atrophin-1, the DRPLA gene product, interacts with two families of WW domain-containing proteins*. **Mol Cell Neurosci** 11 (3): 149-160.
- Zelikovic, I., R. Szargel, A. Hawash, V. Labay, I. Hatib, N. Cohen und F. Nakhoul (2003) *A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes*. **Kidney Int** 63 (1): 24-32.
- Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan und L. Y. Jan (1999) *A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels*. **Neuron** 22 (3): 537-548.
- Zhu, H., P. Kavsak, S. Abdollah, J. L. Wrana und G. H. Thomsen (1999) *A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation*. **Nature** 400 (6745): 687-693.

## 9. Anhang

## 9.1. Abkürzungen

|           |                   |                   |   |
|-----------|-------------------|-------------------|---|
| <b>AS</b> | <b>Aminosäure</b> | <b>B4</b>         | Barttin   |
| <b>A</b>  | Alanin            | <b>B4cyt</b>      | Zytoplasmatischer,<br>C-terminaler Abschnitt von<br>Barttin               |
| <b>C</b>  | Cystein           | <b>CBS</b>        | Cystathionin-Beta-Synthase  |
| <b>D</b>  | Asparaginsäure    | <b>cDNA</b>       | Complementäre<br>Desoxyribonukleinsäure                                   |
| <b>E</b>  | Glutaminsäure     | <b>CFTR</b>       | Cystische-Fibrose-<br>Transmembran-<br>Leitfähigkeits-Regulator           |
| <b>F</b>  | Phenylalanin      | <b>CIP</b>        | Alkalische Phosphatase aus<br>Kälberdarm                                  |
| <b>G</b>  | Glycin            | <b>CIC</b>        | Chloridkanal der<br>CIC-Familie   |
| <b>H</b>  | Histidin          | <b>cRNA</b>       | Complementäre<br>Ribonukleinsäure   |
| <b>I</b>  | Isoleucin         | <b>C-Terminus</b> | Carboxyterminus   |
| <b>K</b>  | Lysin             | <b>d</b>          | Tag   |
| <b>L</b>  | Leucin            | <b>dATP</b>       | Desoxyadenosintriphosphat   |
| <b>M</b>  | Methionin         | <b>dCTP</b>       | Desoxycytidintriphosphat  |
| <b>N</b>  | Asparagin         | <b>DEPC</b>       | Diethylpyrocarbonat   |
| <b>P</b>  | Prolin            | <b>dGTP</b>       | Desoxyguanosin-triphosphat  |
| <b>Q</b>  | Glutamin          | <b>DNA</b>        | Desoxyribonukleinsäure  |
| <b>R</b>  | Arginin           | <b>dNTP</b>       | Mischung der vier Desoxy-<br>nukleosidtriphosphate                        |
| <b>S</b>  | Serin             | <b>dTTP</b>       | Desoxythymidin-triphosphat  |
| <b>T</b>  | Threonin          | <b>DTT</b>        | Dithiothreitol  |
| <b>V</b>  | Valin             | <b>E1-E3</b>      | Ubiquitin activating (E1),<br>conjugating (E2), and ligase<br>(E3) enzyme |
| <b>W</b>  | Tryptophan        | <b>EDTA</b>       | Ethyldiamintetraessigsäure  |
| <b>Y</b>  | Tyrosin           | <b>ENaC</b>       | Epithelialer Natriumkanal   |
| <b>Φ</b>  | Hydrophobe AS     | <b>ER</b>         | Endoplasmatisches<br>Retikulum  |
| <b>X</b>  | Beliebige AS      | <b>GABA</b>       | γ-Aminobuttersäure  |

---

|             |   |
|-------------|---|
| <b>A</b>    | Ampere  |
| <b>Abb.</b> | Abbildung   |
| <b>AIP</b>  | Atrophin-1-interacting<br>Protein                 |
| <b>AQP</b>  | Aquaporin   |
| <b>AP</b>   | Adapterprotein                                    |
| <b>ATP</b>  | Adenosintriphosphat                               |
| <b>bp</b>   | Basenpaare  |
| <b>BSA</b>  | Bovines Serumalbumin<br>(Albumin aus Kälberserum) |
| <b>cAMP</b> | Cyklisches<br>Adenosintriphosphat                 |

|                   |  |                 |  |
|-------------------|--|-----------------|--|
| <b>GFP</b>        | Grünes Fluoreszenzprotein<br>aus der Qualle<br><i>Aequorea victoria</i>  | <b>PCR</b>      | Polymerasekettenreaktion                                     |
| <b>h</b>          | Stunde   | <b>Pfu</b>      | Pyrococcus furiosus  |
| <b>HECT</b>       | Homologous to E6-AP<br>protein COOH-terminal,<br>Ubiquitinligasedomäne   | <b>pH</b>       | $-\log(\text{H}^+ \text{-Konzentration})$                    |
| <b>HA</b>         | Influenza<br>Hämagglutinin-Epitop  | <b>PKA</b>      | Protein Kinase A   |
| <b>HEPES</b>      | N-(2-Hydroxyethyl)-<br>piperazin-<br>N'-(2-ethansulfonsäure)   | <b>PKC</b>      | Protein Kinase C   |
| <b>HRP</b>        | Meerrettich-Peroxidase   | <b>PY-Motiv</b> | Prolin-Tyrosin-Motiv   |
| <b>kb</b>         | Kilobasen  | <b>RLU</b>      | Relative Light Units,<br>Relative Lichteinheiten             |
| <b>K1</b>         | C1C-K1   | <b>RNA</b>      | Ribonukleinsäure   |
| <b>K1HA</b>       | C1C-K1 mit extra-zellulärem<br>HA-Epitop   | <b>rpm</b>      | Umdrehungen pro Minute                                       |
| <b>Ka</b>         | C1C-Ka   | <b>RT-PCR</b>   | Reverse Transkriptase<br>Polymerasekettenreaktion            |
| <b>kDa</b>        | Kilodalton   | <b>S</b>        | Siemens  |
| <b>LB</b>         | Luria Broth  | <b>s</b>        | Sekunde  |
| <b>M</b>          | Molar  | <b>SD</b>       | Standardabweichung   |
| <b>m</b>          | Milli  | <b>SEM</b>      | Standardabweichung des<br>Mittelwerts                        |
| <b>μ</b>          | Mikro  | <b>SDS</b>      | Natrium-Dodecylsulfat  |
| <b>mRNA</b>       | Boten-Ribonukleinsäure   | <b>Smurf</b>    | SMAD ubiquitination<br>regulatory factor,<br>Ubiquitinligase |
| <b>N</b>          | Normal   | <b>t</b>        | Zeit   |
| <b>Nedd4</b>      | Neuronal precursor cell<br>expressed developmentally<br>downregulated; mit ENaC<br>interagierende Ubiquitin-<br>ligase | <b>Tab.</b>     | Tabelle  |
| <b>n</b>          | Nano   | <b>TBS</b>      | Tris-gepufferte<br>Kochsalzlösung                            |
| <b>NMDA</b>       | N-Methyl-D-Aspartat  | <b>TEA</b>      | Tetraethylammonium   |
| <b>N-Terminus</b> | Aminoterminus  | <b>Tris</b>     | Trishydroxymethylamino-<br>ethan                             |
| <b>OD</b>         | Optische Dichte  | <b>U</b>        | Unit, Einheit der<br>enzymatischen Aktivität                 |
| <b>p</b>          | Pico   | <b>UV</b>       | Ultraviolettes Licht   |
| <b>PAGE</b>       | Polyacrylamid-<br>Gelelektrophorese  | <b>V</b>        | Volt   |
| <b>PBS</b>        | Phosphatgepufferte<br>Kochsalzlösung   | <b>v/v</b>      | Volumen pro Volumen  |
|                   |  | <b>WWP</b>      | WW-Domain-containing<br>Protein                              |
|                   |  | <b>WT</b>       | Wildtyp  |
|                   |  | <b>w/v</b>      | Gewicht pro Volumen  |
|                   |  | <b>ZNS</b>      | Zentrales Nervensystem                                       |

## 9.2. Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <i>Abb. 1.1. Möglichkeiten der Porenformation von Membrankanälen</i>  | 8  |
| <i>Abb. 1.2. Topologiemodell einer bakteriellen CIC-Untereinheit nach Dutzler et al., 2002</i>  | 9  |
| <i>Abb. 1.3. Topologie des Barttins</i>   | 11 |
| <i>Abb. 1.4. CIC-Ka/Barttin-Voltage-Clamp-Messung</i>   | 12 |
| <i>Abb. 1.5. Modell zur Funktion von CIC-K/Barttin</i>  | 13 |
| <i>Abb. 1.6. Modell der beim Bartter-Syndrom betroffenen Genprodukte in der Tubuluszelle</i>  | 17 |
| <i>Abb. 4.1. Rekombinante PCR</i>   | 36 |
| <i>Abb. 4.3. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp modifiziert nach Ashcroft [Ashcroft, 2000]</i>   | 42 |
| <i>Abb. 5.1. Klonierungsstrategie der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte</i>   | 48 |
| <i>Abb. 5.2. Schematische Darstellung der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte</i>   | 49 |
| <i>Abb. 5.3. Elektrophysiologische Eigenschaften des Komplex' aus CIC-Ka/Barttin</i>  | 49 |
| <i>Abb. 5.4. Elektrophysiologische Eigenschaften der CIC-Ka/Barttin-Konstrukte</i>  | 51 |
| <i>Abb. 5.5. Position des HA-Epitops in CIC-K1</i>  | 52 |
| <i>Abb. 5.6. Elektrophysiologische Eigenschaften von CIC-K1HA</i>   | 53 |
| <i>Abb. 5.7. Elektrophysiologische Eigenschaften der CIC-K1/Barttin-Konstrukte</i>  | 54 |
| <i>Abb. 5.8. Leitfähigkeiten der CIC-K1HA/Barttin-Konstrukte mit 2x-Linker</i>  | 56 |
| <i>Abb. 5.9. Oberflächenexpression der CIC-K1/Barttin-Konstrukte</i>  | 57 |
| <i>Abb. 5.10. Oberflächenexpression von CIC-K1HA nach Koexpression mit Konstrukten</i>  | 58 |
| <i>Abb. 5.11. Western-Blot zur Kontrolle der durchgeführten Analysen</i>  | 59 |
| <i>Abb. 5.12. Potentielle Signalmotive der Barttin-Region um Y98</i>  | 62 |
| <i>Abb. 5.13. Leitfähigkeiten von CIC-Ka nach Koexpression mit Barttin-Mutationen</i>   | 63 |
| <i>Abb. 5.14. Schematische Darstellung einer HECT-E3</i>  | 64 |
| <i>Abb. 5.15. Leitfähigkeiten von CIC-Ka/Barttin nach Koexpression mit WW-Domänen</i>   | 65 |
| <i>Abb. 5.16. Signalmotive von Barttin</i>  | 67 |
| <i>Abb. 5.17. Auswirkungen von Mutationen und Deletionen im C-terminalen Abschnitt von Barttin</i>  | 68 |
| <i>Abb. 6.1. Dreidimensionale Struktur des bakteriellen CIC-Kanals</i>  | 74 |
| <i>Abb. 6.2. PY-Aminosäuresequenzen in CIC-5 und Barttin</i>  | 76 |
| <br>  |    |
| <i>Tab. 1.1. Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale der physiologisch wichtigsten Ionen in der Säugertierzelle bzw. im menschlichen Blut</i> | 2  |
| <i>Tab. 1.2. Dendrogramm der Mitglieder der CLC-Familie in Säugetieren</i>  | 5  |
| <i>Tab. 1.3. Klinische Differenzen bei Bartter- und Gitelman-Syndrom</i>  | 16 |
| <i>Tab. 1.4. Signalmotive</i>   | 21 |

## 9.3. Curriculum vitae

### Tim Marnitz

Anschrift: Vielohweg 134  
22455 Hamburg

Email: tmarnitz@gmx.de

Familienstand: ledig

1988-1997 **Gymnasium**, Hamburg

1994-1998 **Doppelqualifikation Abitur/Berufsausbildung**, Hamburg

07/1997 **Abitur**

02/1998 **Staatlich geprüfter Chemisch-Technischer Assistent**, CTA

1998-1999 **Zivildienst** als Rettungssanitäter

Seit 1999 **Studium der Medizin**, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

03/2001 Ärztliche Vorprüfung

Seit 2002 Promotionsarbeit am Institut für Molekulare Neuropathobiologie von Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)

03/2002 Erstes Staatsexamen

03/2005 Zweites Staatsexamen

2005 Praktisches Jahr

Hamburg im November 2005

## 9.4. Danksagung

Zuerst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Labor und die Überlassung des Themas. Für die ständige Bereitschaft zur Beratung, Gelegenheit zur Diskussion und die persönliche Betreuung möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Mein besonderer Dank für die umfassende Betreuung während der gesamten Doktorarbeit gilt Ingo Kurth, meinem ständig gedulden und hilfsbereiten Ansprechpartner im Labor. Anselm Zdebik danke ich für seine Hilfe in allen Bereichen, insbesondere bei Fragestellungen in der Elektrophysiologie. Ebenso danke ich Julia Offe für ihre methodischen Ratschläge. Olaf Scheel half mir in Fragen der EDV. Für ihre Unterstützung in labortechnischen Fragen gilt mein Dank außerdem Gabriela Boia und Ina Holst.

Allen (Ex-)Mitarbeitern am Institut Jentsch danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Raul Estevez und Ingo Kurth danke ich für die gemeinsame Arbeit am Barttin-Projekt und die Überlassung von Barttin-Mutationen für die elektrophysiologische Analyse.

Für die Durchsicht der Arbeit bedanke ich mich bei Ingo Kurth, Julia Offe, Anselm Zdebik, Torsten Beeck und Udo Marnitz.

Ich danke meinen Eltern Ursel und Udo Marnitz, meinen Geschwistern Ulla, Ulf und Jan Marnitz und meinen Freunden für den privaten Rückhalt.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduierten Kolleg *Neurale Signaltransduktion und deren pathologische Störungen* unter Leitung von Frau Prof. Dr. Melitta Schachner.

Alle diejenigen, die ich versehentlich vergessen habe namentlich zu erwähnen, bitte ich dieses zu entschuldigen.

## 9.5. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Tim Marnitz

Hamburg im November 2005