

# **Regulation des CFTR**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

**Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften**

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

**Tanjef Szellas**

aus Eckernförde

Frankfurt 2002

(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann  
Wolfgang Goethe -Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Walter E. Müller
Gutachter :	PD Dr. Georg Nagel, Prof. Dr. Bernd Ludwig
Datum der Disputation:	5.Juni 2002

**Meiner Frau Dagmar**

**Meinen Eltern zum Dank**

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	<b>Biologische Membranen und Membrantransport</b>	<b>6</b>
1.2	<b>ABC-Proteine</b>	<b>7</b>
1.3	<b>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)</b>	<b>9</b>
1.3.1	Historie der CFTR-Forschung	9
1.3.2	Struktur	10
1.4	<b>Physiologie und Pathophysiologie des CFTR</b>	<b>11</b>
1.5	<b>Proteinkinasen</b>	<b>14</b>
1.6	<b>Regulation der CFTR-Aktivität</b>	<b>16</b>
1.6.1	Regulation durch Phosphorylierung	16
1.6.2	Einfluss von anderen Proteinkinasen	18
1.6.3	Proteinphosphatasen	19
1.6.4	Regulation über die Nukleotidbindedomänen	20
1.7	<b>Expression in <i>Xenopus</i>-Oozyten</b>	<b>21</b>
1.8	<b>Elektrophysiologie</b>	<b>22</b>
1.8.1	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	23
1.8.2	Die Patch-clamp-Technik	25
1.8.3	Charakterisierung von Ionenkanälen	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
2.1	<b>Geräte</b>	<b>29</b>
2.2	<b>Eingesetzte Substanzen</b>	<b>30</b>
2.3	<b>Verwendete Lösungen</b>	<b>31</b>
2.3.1	Präparation und Verwahrung der Oozyten	31
2.3.2	Voltage-clamp	32
2.3.3	Patch-clamp	33
2.4	<b>Expression des CFTR in <i>Xenopus</i>-Oozyten</b>	<b>36</b>
2.4.1	Herstellung der cRNA zur Injektion	36
2.4.2	Gewinnung der Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	37
2.5	<b>Elektrophysiologie</b>	<b>39</b>
2.5.1	Voltage-clamp	39
2.5.2	Patch-clamp	40
2.6	<b>Weitere Methoden</b>	<b>43</b>
2.6.1	Luciferase-Assay	43
2.6.2	Atom-Absorptions-Spektroskopie	43
2.6.3	Mutagenese und Transformation	44
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
3.1	<b>Grundlagen der CFTR-Charakterisierung</b>	<b>47</b>
3.1.1	Aktivierung im Zwei-Elektroden-Voltage-clamp	47
3.1.2	Abschätzung der CFTR-Expression in <i>Xenopus</i> -Oozyten	49
3.1.3	Verschiebung des Umkehrpotenzials	50
3.2	<b>Grundlagen der Patch-clamp-Messung</b>	<b>53</b>
3.2.1	CFTR-Phosphorylierung im isolierten Makropatch	53
3.2.2	Rundown	55
3.2.3	Grundlagen der Kinetik des CFTR	57
3.2.4	Calcium-aktivierte Chloridkanäle	57
3.2.5	Chloridkonzentrations sprünge bei aktiviertem CFTR	58
3.2.6	Öffnungs- und Schließkinetik des PKA-aktivierten CFTR	60
3.2.7	Spannungsabhängigkeit der CFTR-Chloridströme	63
3.2.8	Transiente Ströme bei Chloridkonzentrationswechseln	67

<b>3.3</b>	<b>Phosphorylierung I: Koexpression von BR-PKA</b>	<b>69</b>
3.3.1	Überprüfung der Insertion in die Plasmamembran	69
3.3.2	BR-Aktivierung im isolierten Makropatch	70
3.3.3	Effekte des Proteinkinaseinhibitors PKI	74
3.3.4	Einfluss der Phosphorylierung auf die Kinetik	75
3.3.5	Rundown	78
3.3.6	ATP-Affinität	79
<b>3.4</b>	<b>Phosphorylierung II: Aktivierung durch die cGKII</b>	<b>81</b>
3.4.1	Voltage-clamp	81
3.4.2	Phosphorylierung durch die cGKII im isolierten Makropatch	82
3.4.3	Kinetik unter cGKII-Einfluss	86
3.4.4	ATP-Affinität	90
3.4.5	Phosphorylierungsabhängigkeit des Rundowns	92
<b>3.5</b>	<b>Inhibiert der CFTR den epithelialen Natriumkanal?</b>	<b>93</b>
3.5.1	ENaC-Charakterisierung im isolierten Makropatch	94
3.5.2	Endogene Natriumleitfähigkeiten	96
3.5.3	Kinetik	97
3.5.4	Wechselwirkung ENaC-CFTR	98
3.5.5	Regulierung des ENaC durch Phosphorylierung und ATP	102
<b>3.6</b>	<b>CFTR-Regulation durch ATP-Hydrolyse / Magnesium</b>	<b>105</b>
3.6.1	Notwendigkeit von Magnesium für die Kanalöffnung	105
3.6.2	Öffnungs- und Schließkinetik bei Mg <sup>2+</sup> -Entzug	108
3.6.3	Messungen mit der Walker-A-Mutante K1250A/Q	111
3.6.4	Einfluss von nichthydrolysierbaren ATP-Analoga	114
3.6.5	Modulation des Öffnungszyklus durch Magnesium	116
3.6.6	Effekt der Mutation des Walker-B-Asparts D1370	119
3.6.7	Öffnungs- und Schließkinetik der Walker-B-Mutante D1370N	121
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>123</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression von CFTR</b>	<b>123</b>
<b>4.2</b>	<b>Elektrophysiologie an <i>Xenopus</i>-Oozyten</b>	<b>124</b>
4.2.1	Zwei-Elektroden-Voltage-clamp	124
4.2.2	Makropatchmessungen	124
<b>4.3</b>	<b>Inhibition des CFTR durch Aspartat</b>	<b>125</b>
<b>4.4</b>	<b>Regulation des CFTR durch Phosphorylierung</b>	<b>127</b>
<b>4.5</b>	<b>Rundown des CFTR-Chloridstroms</b>	<b>130</b>
<b>4.6</b>	<b>Gibt es eine Interaktion zwischen ENaC und CFTR?</b>	<b>132</b>
<b>4.7</b>	<b>Regulation des Öffnungszyklus des CFTR</b>	<b>136</b>
4.7.1	Ist für die Kanalöffnung eine ATP-Hydrolyse notwendig?	136
4.7.2	Beteiligung von Magnesium an der Kanalöffnung	139
4.7.3	Sind beide Nukleotidbindestellen an der Öffnung beteiligt?	141
4.7.4	Nichthydrolytische Aktivierung des CFTR	144
4.7.5	Vorschlag eines erweiterten CFTR-Öffnungszyklus	145
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>151</b>
<b>7</b>	<b>HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN</b>	<b>159</b>
<b>8</b>	<b>DANKE...</b>	<b>160</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>161</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Biologische Membranen und Membrantransport

Das wichtigste Ordnungsprinzip jeder Zelle ist die Abgrenzung gegen ihre äußere Umgebung. Zu diesem Zweck besitzt sie eine für wasserlösliche Substanzen weitgehend undurchlässige, vorwiegend aus Phospholipiden bestehende, Zellmembran. Diese Abgrenzung erlaubt Unterschiede in der Beschaffenheit von Zytosol und Extrazellulärraum, z. B. hinsichtlich des pH-Werts, der Ionenstärke und der enthaltenen Ionen. Andererseits macht diese Barriere aber Mechanismen notwendig, die sowohl einen Informations-, als auch einen Molekülaustausch zulassen. Integrale Membranproteine dienen unter anderem dazu, Ionen und kleinen polaren Molekülen den Durchtritt durch die Membran zu ermöglichen. Darüber hinaus induziert die Wechselwirkung von extrazellulären Reizen mit verschiedenen membranständigen Rezeptoren die Informationsweiterleitung in das Zellinnere. Größere Moleküle werden durch Prozessen wie Exo- bzw. Endozytose befördert, in denen ganze Membranareale abgeschnürt werden und die so entstehenden Vesikel den Transport größerer Moleküle bewerkstelligen.

Die Membrantransportproteine werden in zwei Klassen unterteilt: Membrantransporter und Ionenkanäle. Beiden Proteingruppen ist gemeinsam, dass sie die hydrophobe Lipiddoppelschicht mit Hilfe einer lipidlöslichen Hülle durchdringen. Ein häufig gefundenes Motiv zur Ausbildung von Transmembrandomänen sind sowohl  $\alpha$ -Helices, als auch sogenannte  $\beta$ -Faltblätter, die bei Kanalproteinen eine hydrophile Pore in einer hydrophoben Umgebung erlauben. Die Regulation der Kanalaktivität erfolgt über extra- und intrazellulär lokalisierte Domänen, die auf äußere Reize hin, wie zum Beispiel die Bindung eines Liganden (Acetylcholinrezeptor) oder Potenzialänderungen (spannungsaktivierter Natriumkanal) mit einer Öffnung der Poren reagieren. Da Ionenkanäle nur den Fluss von Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten gestatten, wäre eine unterschiedliche Zusammensetzung von Extrazellulärraum und Zytosol durch die Aktivität dieser Proteine nicht möglich. Diese Aufgabe wird durch die Gruppe der Transporter umgesetzt. Diese werden wiederum in zwei Gruppen unterteilt: Primär aktive Transporter wie zum Beispiel die Natrium-Kalium-ATPase,

die sowohl Kalium (in die Zelle hinein) als auch Natrium (aus der Zelle heraus) gegen deren Gradienten transportiert, nutzen die aus einer ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie. Eine andere Energiequelle, die von Archaeobakterien (Bakteriorhodopsin) und von allen Pflanzen zum Aufbau eines pH-Gradienten genutzt wird, stellt das Licht dar, wobei die Lichtenergie durch ein Chromophor (Retinal) absorbiert wird. Im Gegensatz zu diesen Proteinen wird von den sekundär aktiven Transportern eine Ionensorte entlang ihres elektrochemischen Gradienten befördert, was es einem anderem Ion ermöglicht, gegen sein Gefälle angereichert zu werden. Insbesondere der Natriumkonzentrationsgradient zwischen Zytosol und Extrazellulärraum ist häufig die treibende Kraft für sekundär aktive Transporter (Natrium-Iodidsymporter, Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter, Natrium-Glukose Transporter usw.).

## 1.2 ABC-Proteine

Die Klonierung des CFTR-Gens 1989 ergab, dass dieses Protein zu der Klasse der sogenannten ABC-Transporter gehörte [117]. Der Ursprung dieses Namens war das allen Vertretern dieser Gruppe gemeinsame Motiv einer hochkonservierten ATP-Bindestelle, die zu einer ATP-Hydrolyse fähig ist (**ABC = ATP-Binding-Cassette**; Higgins, 1992, häufig auch als "traffic-ATPases" (Ames, 1992) bezeichnet). Die Klasse der ABC-Transporter ist eine der größten Protein-Superfamilien mit einer durchschnittlichen Sequenzhomologie von 30 % [59]. Nachdem die ersten Proteine dieser Gruppe vorwiegend aus Prokaryonten kloniert wurden [57], sind mittlerweile diverse eukaryotische ABC-Proteine charakterisiert worden. Mit Ausnahme des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulators* (CFTR) und des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) transportieren alle bislang klonierten ABC-Proteine ein Substrat unter ATP-Verbrauch über die Zellmembran. Diese Substrate sind unterschiedlicher Natur, so werden unter anderem Ionen (CysA, PStB), Toxine (HlyB), Antibiotika (MDR) und Zucker (MalK) transportiert. Auch bei der Immunantwort sind ABC-Transporter beteiligt, da das TAP1/2 an der Antigenpräsentation beteiligt ist. Während bei den prokaryotischen Proteinen die ABC-Transporter vorwiegend einen Substratimport bewirken, sind sie bei eukaryotischen Zellen an der Membranpassage in beide Richtungen beteiligt. Die Tab. 1.2-1 gibt einen Überblick über verschiedene ABC-Proteine und ihre Substrate.

Protein	Substrat	Organismus
CFTR	Chloridionen	Vertebraten
Mdr1 (Pgp)	Antitumorsubstanzen u.a.	human
Ste6	Peptide	Hefe
SUR	(indirekt: Kalium)	human
MRP-like	Herbizide, Fungizide	Pflanzen
Mrp (1-7)	konjugierte und nicht konjugierte Pharmaka	human
LmrA	diverse Pharmaka	Lactococcus lactis
TAP1,2	MHC-Peptide	human
ABCX	Haem	Pflanzen
Pdr12	schwache organische Säuren	Hefe
HisP	Histidin	Salmonella typhii

**Tab. 1.2-1: ABC-Proteine: Substrate und Organismen**

Allen ABC-Transportern ist die modulare Zusammensetzung aus Transmembrandomäne und Nukleotidbindedomäne gemeinsam. Die meisten dieser Proteine sind Dimere, so dass der häufigste Aufbau aus einer funktionellen Einheit mit zwei Transmembranabschnitten und zwei zytosolisch lokalisierten Nukleotidbindedomänen besteht. Diese sind strukturell deutlich höher konserviert als die anderen Abschnitte der Proteine. Jede Nukleotidbindestelle (NBD) eines ABC-Transporters enthält die charakteristischen Walker-A und Walker-B Motive [147], die für die ATP-Bindung bzw. Hydrolyse verantwortlich sind. Während die Konsensussequenz des Walker-A Motivs (auch als P-Loop bezeichnet) GXXGXGKS/T lautet, besteht das Walker-B Motiv aus vier aufeinanderfolgenden hydrophoben Aminosäuren und einem Aspartat bzw. Glutamat. Ein weiteres Merkmal der Nukleotidbindedomäne ist das LSGGQ-Motiv (auch C-Motiv oder Signaturmotiv genannt), welches durchschnittlich 11-15 Aminosäuren aufwärts der Walker-B Domäne liegt. Die kürzlich veröffentlichte Struktur der Nukleotidbindestelle der Histidinpermease [64] bestätigte die Vermutung, dass das Lysin aus der Walker-A Region mit der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP koordiniert und die Walker-B Domäne für die Bindung des Magnesiums aus dem MgATP-Komplex verantwortlich ist.



Im Gegensatz zu dem hohen Homologiegrad der Nukleotidbindestellen der einzelnen ABC-Transporter gibt es eine große Variabilität zwischen den Transmembrandomänen, sowohl in der Anzahl, als auch in der Sequenz. Vielen ABC-Proteinen ist eine 6-Transmembranhelices-Struktur pro Monomer gemeinsam, weiterhin verfügt beispielsweise der HlyB über acht (pro Monomer), der FhuB über insgesamt zwanzig und SUR und MRP1 über jeweils 17 Transmembranhelices. Der CFTR stellt neben seiner Einzigartigkeit aufgrund seiner Kanalfunktion auch das einzige Mitglied dieser Familie dar, das zusätzlich über eine große regulatorische Domäne verfügt, die für eine CFTR-Aktivierung phosphoryliert werden muss.

## **1.3 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)**

### **1.3.1 Historie der CFTR-Forschung**

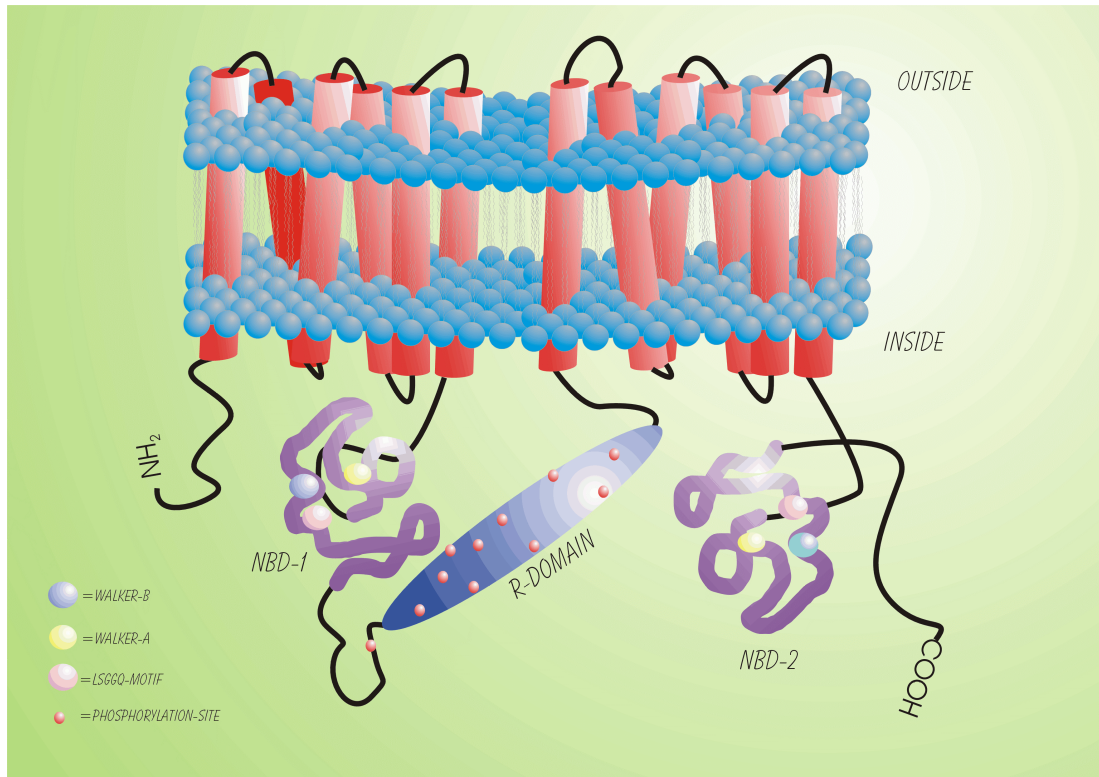
Schon im Mittelalter war eine bereits bei der Geburt manifestierte Krankheit bekannt, die mit einer ausgeprägten Salzsekretion im Schweiß verbunden war und früh zum Tod führte. 1938 beschrieb Dorothy Andersen anhand von Autopsien an Kindern zahlreiche Symptome einer Krankheit, die sie aufgrund der auftretenden Bauchspeicheldrüsedefekte als "cystic fibrosis of the pancreas" bezeichnete. In den folgenden Jahren wurden die weitreichenden Störungen in den verschiedenen Epithelien, insbesondere der Lunge, mit einem sehr zähflüssigen Schleim in Zusammenhang gebracht. Die Bezeichnung "Mukoviszidose", die außerhalb des angelsächsischen Sprachraums vorwiegend verwendet wird, wurde 1945 von Farber vorgeschlagen. 1946 entdeckten Andersen und Hodges, dass diese Krankheit erblich und auf eine autosomal rezessive Mutation zurückzuführen war [4]. Sieben Jahre später wurde der ausgeprägte Salzverlust über den Schweiß als auffälliges Merkmal einer zystischen Fibrose (im Folgenden mit CF abgekürzt) charakterisiert. Es gelang jedoch nicht, die beiden auffälligsten Symptome dieser Krankheit, zäher Schleim in den Epithelien und eine sehr hohe Salzkonzentration, aber keine erhöhte Viskosität, im Schweiß, auf bestimmte zelluläre Defekte zurückzuführen. 1981 berichtete Knowles, dass die Potenzialdifferenz des Nasenepithels bei CF-Kranken deutlich erhöht war [75]. 1982 stellte Quinton erstmals die Vermutung auf, dass eine Chlorid-

permeationsstörung Ursache der Krankheit war [103]. Es war zunächst nicht möglich, ein bestimmtes Protein mit der Krankheit zu assoziieren. Mitte der achtziger Jahre stand fest, dass in vielen Epithelien eine Chloridleitfähigkeit vorhanden ist, die bei gesunden Individuen durch PKA-Stimulierung aktiviert werden kann, was bei CF-Kranken nicht möglich ist. 1989 konnten Riordan et al. das Gen klonieren, welches für das bei der zystischen Fibrose defekte Protein kodierte [117]. Da zu diesem Zeitpunkt lediglich feststand, dass dieses Genprodukt am Chloridtransport beteiligt war, wurde es als "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" bezeichnet. 1990 gelang es Welsh und Gregory, durch Einführung intakter CFTR-Gene in die Atemwegsepithelzellen von CF-Patienten, durch Zugabe von zyklischem AMP (cAMP), welches die Proteinkinase A aktiviert, eine Chloridleitfähigkeit hervorzurufen, wohingegen vor dem Gentransfer die cAMP-Zugabe keinen Effekt hervorrief. Die Aminosäuresequenz belegte, dass das Genprodukt zur Klasse der ABC-Transporter gehört, was zu der Vermutung führte, dass es ebenso wie die anderen Mitglieder dieser Proteinfamilie einen durch ATP-Hydrolyse angetriebenen Transport von Substanzen über die Zellmembran katalysiert. So wurde unter anderem spekuliert, dass diese Substanzen einen separaten Chloridkanal aktivieren. Alternativ wurde auch eine direkte Wechselwirkung und Stimulierung eines benachbarten Chloridkanals vermutet. Drittens wurde schließlich die Hypothese aufgestellt, dass ungeachtet der sehr "untypischen" Struktur (s.u.), dieses Protein selbst ein Chloridkanal ist. Bear et. al. konnten 1992 zeigen, dass die Rekonstituierung von CFTR-Protein in Lipidmembranen zu der Ausbildung einer Chloridleitfähigkeit führte, die für eine Aktivierung die Anwesenheit aktiver Proteinkinasen und Nukleotidtriphosphaten, vor allem ATP, erforderte [13]. Zahlreiche nachfolgende Experimente belegten in den vergangenen Jahren eindeutig, dass der CFTR selbst tatsächlich ein Chloridkanal ist.

### **1.3.2 Struktur**

Der Aufbau des CFTR ist in Abb. 1.3-1 schematisch gezeigt. Das Protein besteht aus einer einzigen Polypeptidkette von 1480 Aminosäuren und besitzt (unglykosyliert) ein Molekulargewicht von 168 kDa. Mit dem zytosolisch lokalisierten N-Terminus (Aminosäure 1-79) ist die Transmembrandomäne 1 verbunden (80-350), die sechs Transmembranhelices besitzt. An diese schließt sich die Nukleotidbindedomäne 1 (NBD1, 433-586) an, auf die die regulatorische Untereinheit (R-Domäne, 634-836)

folgt. An diese sind wiederum sechs Transmembranhelices (860-1150) gekoppelt, worauf die ebenfalls zytosolisch liegende NBD2 (1219-1386) und der C-Terminus folgen.



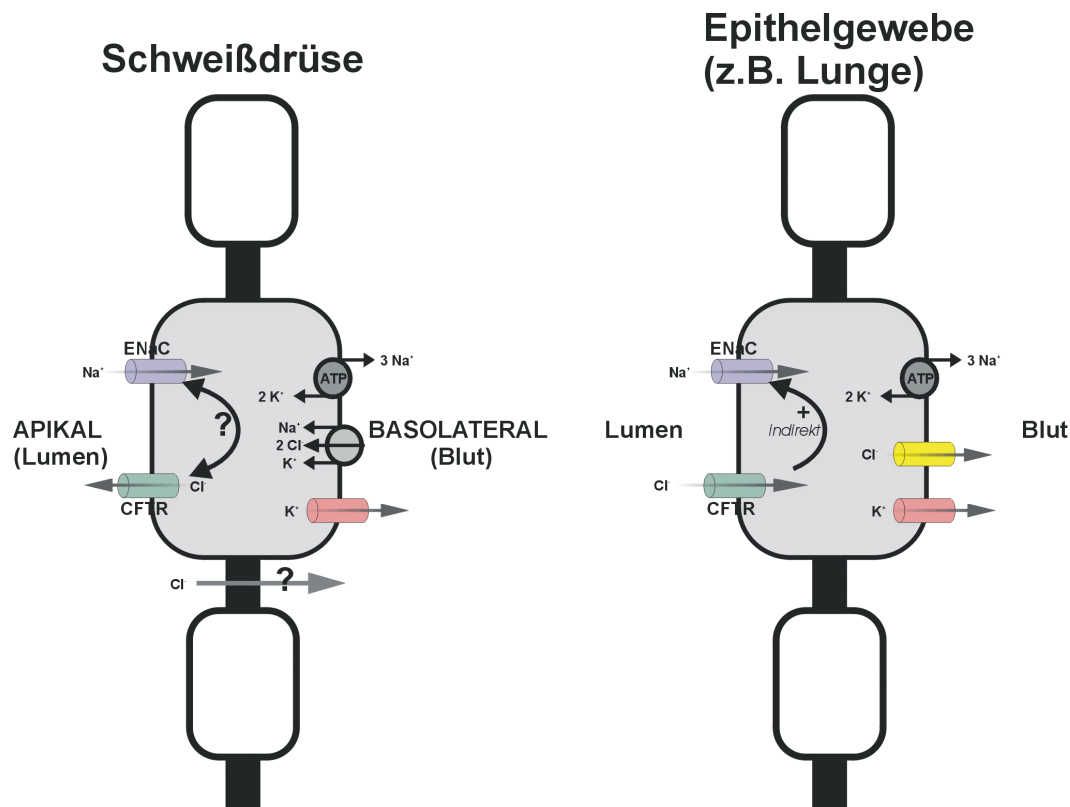
**Abb. 1.3-1: Schematische CFTR-Struktur**

Die beiden Nukleotidbindedomänen NBD1+NBD2 sind an der aufgeklärten HisP-Struktur [64] orientiert, über die regulatorische Domäne liegen bislang keine strukturellen Daten vor.

## 1.4 Physiologie und Pathophysiologie des CFTR

Der CFTR wird in sezernierenden Epithelien des Verdauungstrakts, der Schweißdrüsen, der Atemwege und der Geschlechtsorgane exprimiert. Der Kanal ist sowohl an sekretorischen, als auch an absorptiven Prozessen beteiligt. Unter anderem in den Atemwegen und dem Pankreas ist ein zähflüssiger Schleim Charakteristikum einer zystischen Fibrose. In der Lunge führt dies zu einer erhöhten Anfälligkeit gegen bakterielle Erreger, die aufgrund der durch die Viskosität eingeschränkten Aktivität der epithelialen Zilien zu häufigen Lungenentzündungen führen. Durch diese Zähflüssigkeit ist auch die Sekretion der Bauchspeicheldrüse gestört (Insulin, Verdauungsenzyme). Der Unterschied zwischen der Funktionsstörung der Schweißdrüse (salziger Schweiß, keine erhöhte Viskosität) und anderer Epithelien konnte dadurch erklärt

werden, dass die Sekretion des Primärschweißes räumlich von der Reabsorption der Elektrolyte getrennt ist. So ist der aus dem Endknäuel der Schweißdrüse zunächst abgesonderte Schweiß isoosmolar. Bei der Passage durch den Schweißdrüsenangang zur Hautoberfläche wird nun bei gesunden Individuen ein Großteil der Elektrolyte durch das wasserundurchlässige Epithelgewebe rückresorbiert, so dass ein hypotoner Schweiß entsteht. Bei einem CF-Defekt kann diese Rückresorption jedoch nicht erfolgen, so dass ein übermäßig salziger Schweiß abgegeben wird.



**Abb. 1.4-1 Vergleich des Cl<sup>-</sup>- und Na<sup>+</sup>-Transports von Schweißdrüsen und Epithelzellen:** Dargestellte Transportsysteme: epithelialer Natriumkanal (ENaC, violett); CFTR (grün); Na-K-ATPase (dunkelgrauer Kreis); Na-K-Cl-Kotransporter (hellgrauer Kreis); Kaliumkanal (rosa); vermuteter auswärts rektifizierender Cl-Kanal (ORCC, gelb). Schweißdrüsenmodell nach Reddy [111], Lungeneithel nach Boucher [22].

Nach wie vor gibt es unterschiedliche Hypothesen, wie auf molekularer Ebene die Absorption / Sekretion durch den CFTR reguliert wird und warum dessen Defekt die beobachteten Symptome (s.o.) hervorruft. Das oben abgebildete Modell wird von zahlreichen Autoren favorisiert [22, 23, 78, 123], weist aber Widersprüche auf, die im Zusammenhang mit dem epithelialen Natriumkanal (4.6) diskutiert werden. Nach diesem Modell [20] gelangt Chlorid in der Lunge zu einem Großteil parazellulär in

das Blut und von dort über einen  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter in die Epithelzelle, während das Natrium transzellulär passiert und über die basolaterale Seite in das Blut gelangt. Greger schlug vor, dass die Aktivierung des CFTR durch dessen Phosphorylierung den Wechsel von  $\text{NaCl}$ -Absorption zu Sekretion durch gleichzeitige Inhibition des ENaC bewirkt [49]. Für die Schweißdrüsen wird angenommen [111], dass bei CFTR-Aktivierung (und gleichzeitiger ENaC-Aktivierung) sowohl Natrium, als auch Chlorid transzellulär aus dem Primärschweiß aufgenommen werden.

CFTR ist die unter Kaukasiern häufigste autosomal rezessiv vererbte Krankheit, 1 von 2500 Neugeborenen ist betroffen, und tritt in unterschiedlich schweren Formen auf, was auf die verschiedenen, durch die jeweilige Mutation hervorgerufene Funktionsstörung des Proteins zurückzuführen ist. Es sind in den vergangenen Jahren hunderte verschiedener CFTR-Mutationen bei Menschen mit dieser Krankheit charakterisiert worden, die alle zu einer verminderten Chloridleitfähigkeit in den humanen Epithelien führen. Diese Mutationen werden in vier Klassen unterteilt:

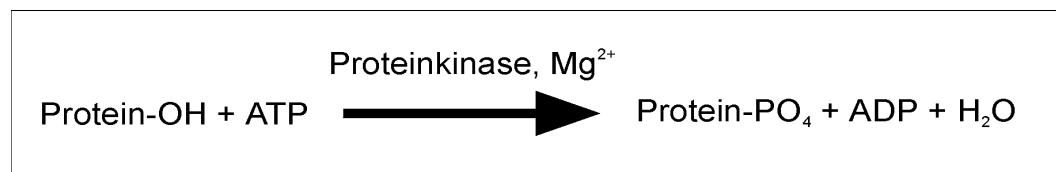
- Produktionsmutanten: Die Mutationen verhindern die Produktion eines intakten Proteins, z.B. aufgrund von Leserasterfehlern bei der Translation.
- Prozessierungsmutanten: Das produzierte Protein gelangt nicht in die Plasmamembran, da es im ER oder Golgi nicht korrekt prozessiert wird. Hierzu gehört die am häufigsten auftretende Deletionsmutante  $\Delta\text{F508}$ .
- Regulationsmutanten: Die Aktivierung durch Proteinkinasen oder die Wechselwirkung der NBDs mit ATP ist gestört.
- Funktionsmutanten: Aufgrund von Mutationen v.a. in der Porenregion ist die Chloridpermeation gestört.

Die klassischen, mit einem CFTR-Defekt verbundenen Symptome, sind der Verschluss des pankreatischen Ausführungsganges, das Verstopfen der Bronchien durch zähen Schleim, erhöhte Salzkonzentration im Schweiß und bei Männern Infertilität aufgrund der Verstopfung des Vas deferens. Von diesen Symptomen stellt die Einschränkung der Lungenfunktion durch Verschleimung und bakterielle Infektionen, die zu Lungenentzündungen führen, das größte Problem dar. Aus diesem Grund gehört die Behandlung mit Antibiotika neben der mechanischen Abhustherapie zu den wichtigsten Bestandteilen einer Behandlung bei Mukoviszidose. Ein weiteres

schwerwiegendes Problem der Patienten ist das Fehlen von Pankreassekreten, weswegen in vielen Fällen auch eine Enzymsubstitution erfolgen muss und auf eine diätetische Ernährung geachtet wird. Durch diese Therapiemaßnahmen konnte die durchschnittliche Lebenserwartung der CF-Patienten, welche in den 50er und 60er Jahren nicht über das Kindesalter hinausging, auf heute über 40 Jahre gesteigert werden. Eine Heilung der Krankheit, z. B. durch Gentherapie, ist allerdings bislang nicht gelungen.

## 1.5 Proteinkinasen

Von allen bekannten Mechanismen der intrazellulären Signalvermittlung ist die reversible kovalente Modifikation durch Phosphorylierung der bedeutsamste. So werden unter anderem wichtige Stoffwechselwege (Glykogenstoffwechsel), die Muskelaktivität (Myosin-Leichte-Ketten-Kinase) und auch der Zellzyklus (Cdc2) über die Aktivität von Proteinkinasen reguliert. Die Bedeutung wird auch daraus ersichtlich, dass schätzungsweise 1 % aller menschlichen Gene für eine Proteinkinase kodieren.




---

**Abb. 1.5-1: Prinzip des Phosphattransfers**

In Gegenwart von ATP und Magnesium überträgt eine Proteinkinase den terminalen Phosphatrest von Adenosintriphosphat auf einen Aminosäurerest mit freier Hydroxylgruppe (Ser, Thr, oder Tyr), so dass ADP und H<sub>2</sub>O freigesetzt werden.

---

Bei der Phosphorylierung wird ein terminaler Phosphatrest ( $\gamma$ -Phosphat) von Adenosintriphosphat auf einen Aminosäurerest übertragen (Abb. 1.5-1). Dieser Transfer hat aufgrund der Einführung zweier negativer Ladungen häufig starke Veränderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb des Proteins zur Folge, die Konformationsänderungen hervorrufen können. In allen, durch Proteinkinasen vermittelten Phosphattransferreaktionen, ist Magnesium ein unverzichtbarer Kofaktor, wobei die durchschnittlich erforderliche Konzentration unter 1 Millimol/l liegt. Die Proteinkinasen können in zwei Klassen unterteilt werden, wobei die Zuordnung anhand des von ihnen phosphorylierten Aminosäurerests erfolgt:

- Tyrosinkinasen (z.B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Insulin)
- Serin/Threoninkinasen (PKA, cGK, PKC, MAP-Kinasen)

Eine der ersten charakterisierten Proteinkinasen war die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). Sie ist aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten zusammengesetzt, wobei für die Freisetzung der katalytischen Untereinheiten die Bindung zweier Moleküle cAMP nötig ist. Die aktiven katalytischen Untereinheiten können nun unter ATP-Verbrauch die Zielproteine phosphorylieren. Die PKA phosphoryliert nur bestimmte Serin- bzw. Threoninreste: Um von der Kinase als Substrat erkannt zu werden, müssen sie sich innerhalb einer bestimmten Sequenz, der sogenannten Konsensussequenz befinden. Hierbei unterscheidet man zwischen einer monobasischen Sequenz, Arginin-X-Serin/Threonin (R-X-S/T) und einer dibasischen, Arginin-Arginin-X-Serin/Threonin (R-R-X-S/T). Diese Motive stellen in mehr als 50 % aller bekannten PKA-phosphorylierten Aminosäuren die Zielsequenz dar. In den meisten Zellen liegt die PKA zytosolisch gelöst vor, darüber hinaus existieren aber auch Isoformen, die in der inaktiven Form über Ankerproteine (AKAPs) an die Zellmembran angeheftet werden, was zu einer erhöhten Selektivität führt. Von einigen Autoren wird auch für die Wechselwirkung von CFTR und PKA eine solche Verankerung der Proteinkinase angenommen [62, 133, 141].

Die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK oder PKG) ist eng mit der PKA verwandt und auch die Substraterkennungssequenz stimmt weitgehend mit der der PKA überein. Neben der Präferenz für zyklisches Guanosinmonophosphat besteht der größte Unterschied darin, dass die katalytische und die regulatorische Domäne auf einer einzigen Polypeptidkette liegen. Bisher konnten zwei Haupttypen charakterisiert werden:

- Eine lösliche Isoform cGK I, die vor allem bei der Relaxation der glatten Muskulatur wichtig ist und über die NO- und Atriopeptinaktivierung reguliert wird.
- Eine membrangebundene Isoform cGKII konnte bisher vorwiegend im intestinalen Gewebe, aber auch in der Niere gefunden werden, in denen sie mit der ebenfalls membrangebundenen Guanylatzyklase kolokalisiert ist.

## 1.6 Regulation der CFTR-Aktivität

### 1.6.1 Regulation durch Phosphorylierung

Schon vor der Identifikation des CFTR-Gens war bekannt, dass in Epithelien eine Chloridleitfähigkeit existiert, die durch die Stimulierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren aktiviert wird, während bei Mukoviszidosepatienten diese Stimulierung zu keiner Chloridleitfähigkeit führt [105, 118]. Da die rezeptorvermittelte Signalkaskade zur Bildung von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) führt, wurde vermutet, dass das cAMP für diesen Effekt verantwortlich ist. Dies wurde durch Versuche mit Adenylatzyklaseaktivatoren (Forskolin) oder Phosphodiesteraseinhibitoren (IBMX), welche den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, in CFTR-exprimierenden Zellen bestätigt. Dieser Effekt war auf die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase zurückzuführen, welche wiederum den CFTR-Chloridkanal phosphoryliert und dadurch eine Kanalaktivität induziert [6, 12, 73]. In Messungen an isolierten Membranpatches wurde gezeigt, dass auch die direkte CFTR-Stimulierung durch die Zugabe von gereinigter katalytischer Untereinheit der PKA zusammen mit ATP möglich ist [137].

Der CFTR verfügt über zehn Serinreste in sogenannten dibasischen Konsensussequenzen (R-R/K-X-S), wobei sich neun dieser Sequenzen innerhalb einer Domäne befinden, welche als regulatorische oder R-Domäne bezeichnet wird (die zehnte dibasische Konsensussequenz liegt vor der NBD1 (S422)). Die Messungen mit einer CFTR-Mutante 10SA, bei der die Serine aller zehn starken Konsensussequenzen zu Alaninresten mutiert waren, zeigten allerdings, dass die Zugabe von PKA nach wie vor zu einer Phosphorylierung führte [31]. Wurden zusätzlich zu diesen dibasischen Erkennungssequenzen das Serin 753 und vier weitere monobasische Konsensussequenzen mutiert, die mit Hilfe der Markierung durch radioaktives [ $\gamma$ -<sup>32</sup>-P]ATP bestimmt wurden, so war keine Stimulierung durch PKA mehr möglich [124].

Der molekulare Effekt der Phosphorylierung auf die CFTR-Kanalaktivität konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass der dephosphorylierte CFTR nicht öffnete, nach Entfernung der R-Domäne hingegen konstitutiv aktiv war [114], was auf einen Mechanismus ähnlich dem "Ball und Kette"-Prinzip der Shaker-Kaliumkanäle hinwies. Winter et al. demonstrierten sowohl



einen inhibitorischen (im unphosphorylierten Zustand), als auch einen stimulatorischen Einfluss der Phosphorylierung der R-Domäne auf die Kanalaktivität [155]. Die Unterschiede zwischen der *in vitro* und der *in vivo* Phosphorylierung [32, 47, 153] haben zu der Vorstellung geführt, dass der Kanal einer ständigen Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen unterworfen ist, wobei die einzelnen Phosphorylierungsstellen unterschiedlich gut zugänglich für die Phosphatasen sind [85]. Die Vergleiche unterschiedlicher Mutanten belegten, dass die Phosphorylierung zwar die Offenwahrscheinlichkeit und vermutlich auch die apparente ATP-Affinität beeinflusst, dieser Einfluss jedoch offenbar nicht inkrementell von dem Grad der Phosphorylierung abhängt (Überblick in [127]).

Da die Phosphorylierung eine notwendige Voraussetzung für die Aktivität des CFTR ist, wurde angenommen, dass die Einführung entsprechender negativer Ladungen durch Mutation der einzelnen Serine in Glutamat- oder Aspartatreste zu einem Protein führen müsste, was in ATP-Anwesenheit konstitutionell aktiv ist. Zwar konnte gezeigt werden, dass sowohl eine 8SE-Mutante [31], als auch 6SD bzw. 8SD-Mutanten [115] ohne vorherige PKA-Applikation durch ATP-Zugabe aktiviert werden konnten, aber eine deutlich verringerte Offenwahrscheinlichkeit aufwiesen. Andererseits kann der Effekt der Phosphorylierung nicht ausschließlich durch die Zunahme der negativen Ladung im Protein erklärt werden (aufgrund ihrer elektrostatischen Einflüsse auf die Proteinstruktur), was unter anderem aus den Unterschieden der CD-Spektren von 8SE-CFTR und phosphoryliertem Wildtyp-CFTR hervorging [37, 38]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des S768 einen inhibitorischen Einfluss auf die Kanalaktivität hatte [153]. Elektrophysiologische Messungen haben zu der Auffassung geführt, dass der CFTR in verschiedenen hoch phosphorylierten Zuständen vorliegt, die sich vor allem hinsichtlich der Beteiligung der beiden Nukleotidbindestellen an der Kanalaktivität unterscheiden. So berichteten Hwang und Mitarbeiter von drei verschiedenen Phosphorylierungsniveaus, von denen nur das hoch phosphorylierte zu einer vollen Involvierung der zweiten NBD führte [66]. Sie vermuteten weiterhin, dass die phosphorylierte R-Domäne zu einer verstärkten Interaktion der beiden NBDs führen würde.

Position	Sequenz	Position	Sequenz
S422 (vor NBD1)	RKTS	S737	RRLS
S660	RRNS	S753	RIS
S670	RFS	S768 (inhib.)	RRQS
S686 (PKA + PKC)	KKQSFK	S790 (PKC)	STRK
S700	KRKNS	S795	RKVS
S712	RKFS	S813	RRLS

**Tab. 1.6-1: PKA-CFTR-Phosphorylierungsstellen**  
 Übernommen aus [47]; Serin 686 kann sowohl durch PKA, als auch PKC phosphoryliert werden [153]. Die Phosphorylierung von S768 hatte stark hemmenden Einfluss auf CFTR-Aktivität [153].

## 1.6.2 Einfluss von anderen Proteinkinasen

Obwohl die PKA die eindeutig wichtigste Kinase für die CFTR-Regulierung darstellt, konnte gezeigt werden, dass auch die Proteinkinase C (PKC) und die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) in der Lage sind, den Kanal sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zu phosphorylieren. Im Gegensatz zu der PKA führt die Phosphorylierung mit der PKC (mit und ohne Calcium) allerdings nicht zu einer starken CFTR-Aktivität. Weiterhin zeigte die Analyse der zugehörigen CD-Spektren ebenfalls keinen Einfluss auf die Kanalkonformation [19, 31, 37]. Die Stimulierung der endogenen PKC in verschiedenen Zelllinien (C127, CHO-Zellen usw.) durch den Einsatz von membranpermeablen Phorbolestern, führte ebenfalls nur zu einer geringfügigen Chloridleitfähigkeit [92]. Allerdings waren die nachfolgenden PKA-vermittelten Stromantworten im Vergleich zu der ausschließlichen PKA-Applikation deutlich vergrößert, weswegen man annimmt, dass die Phosphorylierung durch die PKC eine Vorbedingung für die PKA-vermittelte Phosphorylierung ist [69]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass bei hoher Kinasekonzentration und langer Applikationszeit PKA und PKC die gleichen Aminosäurereste phosphorylieren (Übersicht in [46]).

Für bestimmte Epithelien wird angenommen, dass keines dieser Enzyme für die CFTR-Aktivierung verantwortlich ist, sondern die cGMP-abhängige Proteinkinase II [144]. Trotz gleicher Erkennungssequenzen von cGKI und cGKII kann nur die über einen Myristoylrest in der Membran verankerte Isoform cGKII den CFTR *in vivo*

aktivieren [141]. Dieses membranständige Enzym besitzt einen hohen Verwandtschaftsgrad mit der PKA und wird vorwiegend in Nierenzellen und dem Darmepithel, wo auch der CFTR auftritt, exprimiert. Diese Kollokalisierung wird als Hauptursache der sekretorischen Diarrhöe angenommen. Bei dieser Krankheit produzieren pathogene Stämme von *Escherichia Coli* ein hitzestabiles Enterotoxin, welches an die membranständige Guanylatzyklase der Darmepithelzellen bindet. Dieses führt zu einer Überproduktion von zyklischem Guanosinmonophosphat, welches wiederum an die cGKII binden kann. Die aktivierte Proteinkinase phosphoryliert nun den CFTR, was einen starken Ausstrom von Chlorid zur Folge hat. Hieraus resultiert ein osmotischer Druck, welcher zur Wasserabgabe in den Darm führt, die letztlich in einem gravierenden Flüssigkeitsverlust des Betroffenen endet, welcher unbehandelt innerhalb weniger Tage zum Tode führt. Da bei heterozygoten Individuen die Expression an intaktem CFTR-Protein zwar um 50 % vermindert ist, aber nach wie vor ausreichend vorhanden, sind diese weniger anfällig gegen diese Enterotoxine und auch gegen das Cholera toxin [44]. Daher ist es wahrscheinlich, dass dieser Selektionsvorteil zu der großen Häufigkeit von defekten CF-Genen beim Menschen führte [84, 106].

### 1.6.3 Proteinphosphatasen

Es wird angenommen, dass der CFTR in der Zelle einer ständigen Phosphorylierung und Dephosphorylierung unterliegt und dass diese Dephosphorylierung eine Ursache für die zeitabhängige Verringerung der CFTR-vermittelten Signale in elektrophysiologischen Messungen ist (u.a. [47, 79, 86, 98, 127]). Da dieses Phänomen insbesondere in isolierten Patches auftritt, nimmt man an, dass membranassoziierte Phosphatasen für diesen Effekt verantwortlich sind [15]. Es wurde gezeigt, dass ein Teil der Signalabnahme durch Phosphataseinhibitoren wie Okadasäure, Microcystin und Calyculin aufgehoben werden konnte [65, 109]. Durch den Einsatz rekombinanter Enzyme wurde demonstriert, dass in Patches von NIH 3T3-Fibroblasten die Zugabe von exogener Proteinphosphatase 2A im Gegensatz zur Alkalischen Phosphatase oder der PP1 zu einer Signalabnahme führte [19]. Die Zugabe von exogener PP2C rief in isolierten Patches ebenfalls einen deutlichen Stromrückgang hervor [85, 140]. Aufgrund von *Crosslinking*- und Koimmunopräzipitationsexperimenten wurde vermutet, dass die Proteinphosphatase PP2C mit dem CFTR in der Membran einen regulatorischen

Komplex bildet [166] und die wichtigste Phosphatase für die CFTR-Regulierung darstellt [85]. Zwar wird sowohl für die calciumabhängige PP2B, als auch für die Alkalische Phosphatase angenommen, dass diese *in vivo* nicht an der CFTR-Dephosphorylierung beteiligt sind [47, 85], es konnte an isolierten Patches aber für beide Enzyme ein Effekt gezeigt werden [15, 19, 41, 85]. Lediglich für die PP1 gilt eine Beteiligung an der CFTR-Dephosphorylierung als ausgeschlossen [47, 85, 140].

#### 1.6.4 Regulation über die Nukleotidbindedomänen

Außer durch die Phosphorylierung/Dephosphorylierung wird der CFTR über die beiden Nukleotidbindedomänen (NBD) I und II reguliert. Die Steuerung der Öffnungs- und Schließvorgänge bei Ionenkanälen wird in der englischsprachigen Literatur als "Gating" bezeichnet. Beide NBD-Domänen verfügen über zahlreiche konservierte Sequenzen, welche in anderen ABC-Proteinen nachweislich für die Bindung und Hydrolyse von MgATP verantwortlich sind [119]. Die Komplexierung des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphats des ATP erfolgt über einen Lysinrest (NBD1: K464; NBD2: K1250) in der Walker-A Domäne, dessen Mutation in einer der beiden Nukleotidbindedomänen zu deutlichen Änderungen in der Wechselwirkung mit MgATP führt, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Weiterhin ist in beiden Bindestellen die Walker-B Konsensussequenz vorhanden, die die Koordination des Magnesiums über einen Aspartatrest vermittelt (NBD1: D572; NBD2: D1370). Auch diese Domäne ist an dem Hydrolysemechanismus von ABC-Proteinen beteiligt.

Da Ionenkanäle ihre Substrate entlang des elektrochemischen Gefälles befördern, ist die Energiezufuhr, die durch eine ATP-Hydrolyse ( $\Delta G = -50$  kJ/Mol) erfolgt, hierfür prinzipiell nicht notwendig. Ramjeesingh et al. konnten in biochemischen und elektrophysiologischen Studien jedoch nachweisen, dass beide Domänen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* MgATP hydrolysieren [80], wobei neben strukturellen Unterschieden gezeigt werden konnte, dass die beiden NBDs im intakten Protein auch funktionell verschieden sind.

## 1.7 Expression in *Xenopus*-Oozyten




---

**Abb. 1.7-1** Foto eines Weibchens von *Xenopus laevis*

---

Die Eier des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Abb. 1.7-1) wurden bereits 1971 erstmals zur heterologen Expression von Proteinen genutzt [53]. 1982 gelang es Gunderson et al. und Miledi et al., Proteine neurologischen Ursprungs, Ionenkanäle, Rezeptoren und Ionenpumpen, funktionell in Oozyten zu exprimieren [94].




---

**Abb. 1.7-2** schematische Darstellung einer *Xenopus* Oozyte des Reifestadiums V

---

Die Abb. 1.7-2 zeigt schematisch eine Oozyte des Stadiums V, wie sie für diese Arbeit verwendet wurde. In den vorhergehenden Reifestadien werden unter anderem Reservestoffe angelegt, ribosomale Proteine und RNA gebildet (Stadium II-V), die Vitellinschicht gebildet (S III) und eine Differenzierung des Zellinneren durch die ungleichmäßige Einlagerung dieser Reservestoffe bewirkt. Hieraus entsteht die charakteristische zweifarbige Pigmentierung, wobei die hellere Hemisphäre die vegetale Region kennzeichnet, die reich an Speicherorganellen ist, während die animale

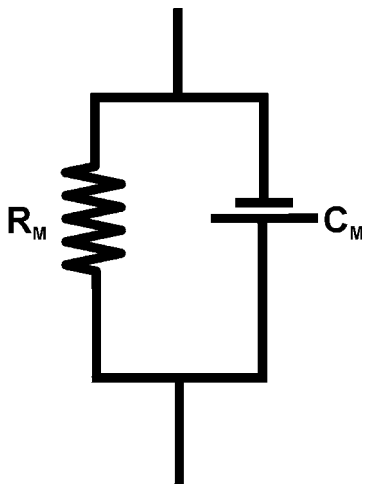
braune Hälfte viele Mitochondrien besitzt und eine geringere Dichte aufweist. Nachdem die Zelle in ihrer Entwicklung das Stadium V beendet hat, geht sie in das laichfähige Stadium VI über, in dem die Pigmentierung des animalen Pols zurückgeht und auch die in den vorhergehenden Stadien gebildeten Membraneinstülpungen (Mikrovilli) abnehmen. Aufgrund der Größe, der Expressionsfähigkeit und der Haltbarkeit der Zellen, stellt das Stadium V das Optimum für elektrophysiologische Messungen dar.

Insbesondere für die Charakterisierung von elektrogenen Membranproteinen hat sich das Oozytenexpressionssystem in den vergangenen Jahren etablieren können. So ermöglicht die durchschnittliche Größe von 1-1,4 mm (Durchmesser von Stadium V) eine einfache Mikroinjektion von Nukleinsäure des zu untersuchenden Gens, entweder von mRNA (Injektion in das Zytosol) oder DNA (Injektion in den Zellkern). Darüber hinaus ist auch die Handhabung und Selektion der Zellen aufgrund dieser Größe einfach. Der größte Vorteil von *Xenopus-Oozyten* liegt jedoch in ihrer hohen und unselektiven Translationseffizienz und der Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation (Glykosylierung, Hydroxylierung, Phosphorylierung). Dies ermöglicht die Überexpression von Membranproteinen, wobei selbst oligomere Proteine korrekt in der Membran zusammengesetzt werden (Acetylcholinrezeptor, epithelialer Natriumkanal). Weiterhin exprimiert die Oozyte nicht nur tierische, sondern auch pflanzliche (Sukrosetransporter [95]) und archebakterielle (Bakteriorhodopsin, [97]) Membranproteine in ihrer Plasmamembran.

## 1.8 Elektrophysiologie

Während die zytosolischen Proteine funktionell häufig über biochemische Methoden charakterisiert werden, indem beispielsweise die Konzentrationsänderung eines Reaktionsproduktes verfolgt wird, ermöglichen elektrogene Membranproteine eine einfache und direkte Detektion ihrer Aktivität durch die von ihnen verursachte Leitfähigkeitserhöhung der Zellmembran, in der sie sich befinden. Eine Zellmembran setzt sich aus Proteinen und Lipiden zusammen, wobei die Membran aus physikalischer Sicht ein Dielektrikum darstellt, und somit eine Kapazität  $C$  (durchschnittlich  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) besitzt. Die in der Membran vorhandenen Proteine vermitteln hingegen eine bestimmte Leitfähigkeit, die dazu führt, dass eine Plasmamembran als

sogenanntes RC-Glied betrachtet werden kann (Abb. 1.8-1). Die Aktivierung von elektrogenen Membranproteinen, insbesondere von Ionenkanälen, bewirkt eine erhebliche Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran, die bei entsprechender experimenteller Anordnung verfolgt werden kann. Werden also selektiv bestimmte Membranproteine aktiviert, so ist es möglich, aufgrund der resultierenden Leitfähigkeiten, eindeutige Rückschlüsse auf deren Eigenschaften zu ziehen. Für Untersuchungen an *Xenopus-Oozyten* sind die Strom- bzw. Leitfähigkeitsmessungen bei einem festgelegten Potenzial die meistverwendeten Methoden.

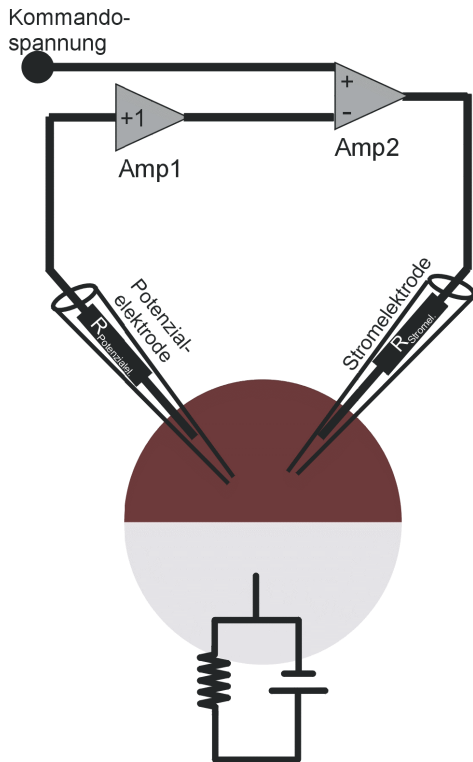


**Abb. 1.8-1 Ersatzschaltbild für die elektrischen Eigenschaften einer Zellmembran**  
Gezeigt sind die Kapazität  $C_M$  und der Widerstand  $R_M$  der Membran

### 1.8.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Zur Charakterisierung hat sich die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (two-electrode voltage-clamp, TEVC) bewährt. In die Zelle wird eine Potenzialelektrode eingestochen, die die anliegende Spannung gegen eine Referenzelektrode misst. Bei der Aktivierung eines elektrogenen Proteins ändert sich die Leitfähigkeit der Membran, was zu einer Änderung des Membranpotenzials führt. Die Differenz zwischen vorgegebener und gemessener Spannung wird mit Hilfe eines Differenzverstärkers bestimmt und über eine zweite intrazelluläre Elektrode (Stromelektrode) als Strom in die Zelle injiziert. In den meisten Fällen werden hierfür Silber / Silberchloridelektroden verwendet, die in einer Glaskapillare mit kleiner Öffnung von einer Lösung mit hoher Chloridkonzentration umgeben sind (3M KCl). Dies gewährleistet die Aufrechterhaltung eines konstantes Gleichgewichtspotenzials. Wenn während der Messung Badlösungen mit unterschiedlicher Chloridkonzentrationen verwendet werden,

ist es erforderlich, die Referenzelektrode separat in einem mit KCl gefüllten Behälter zu platzieren, der über eine Salzbrücke leitend mit der Messkammer verbunden ist.



**Abb. 1.8-2 Schaltbild für die Spannungs-klemme der ganzen Oozyte:**  
vereinfachte Darstellung ohne Berücksichtigung der Referenzelektrode(n). Das gemessene Potenzial wird vom Verstärker mit der Sollspannung verglichen und die Differenz als Strom über die zweite Elektrode in die Zelle injiziert.

Mathematisch lässt sich die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme für die Konfiguration mit einer Badelektrode wie folgt beschreiben: Die zu klemmende Spannung  $V_{Klemm}$  setzt sich aus der Sollspannung  $V_{soll}$ , dem apparenten Membranwiderstand  $R_{Membran}$  und dem Widerstand der Stromelektrode,  $R_{Stromelektrode}$ , unter Miteinbeziehung eines Verstärkungsfaktors  $\mu$  zusammen:

$$V_{Klemm} = \frac{V_{soll} \cdot \mu K}{(\mu K + 1)} \quad \text{mit} \quad K = \frac{R_{Membran}}{R_{Membran} + R_{Stromelektrode}}$$

Um eine möglichst genaue Spannungsklemme gewährleisten zu können, sollte dementsprechend der Elektrodenwiderstand möglichst gering (0,5-1 M $\Omega$ ) und der Verstärkungsfaktor möglichst hoch sein. Die Größe des Transmembranstroms ist der in solchen Messungen bestimmte Parameter. Da die Spannung festgelegt ist, kann mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes hieraus die Leitfähigkeit bestimmt werden:

$$G_{Membran}(t) = 1/U * I(t)$$



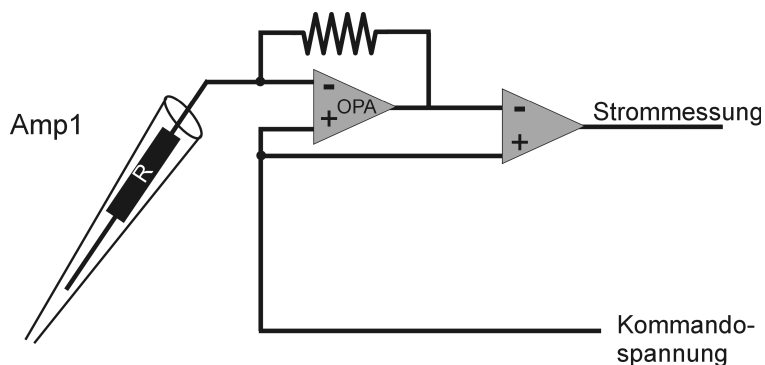
Der apparente Membranwiderstand setzt sich in der Praxis aus der Summe des tatsächlichen Membranwiderstands und dem Serienwiderstand zusammen, welcher unter anderem von dem Abstand der Referenzelektrode(n) zur Plasmamembran abhängt. Dies kann dazu führen, dass bei sehr hohen Leitfähigkeiten ( $>100 \mu\text{S}$ , entspricht einem Widerstand von  $<10 \text{ k}\Omega$ ), wie sie bei CFTR-Aktivierung leicht auftreten können, der gemessene Strom nicht mehr die Membranleitfähigkeit, sondern den Serienwiderstand widerspiegelt. Nimmt man beispielsweise einen Serienwiderstand von  $10 \text{ k}\Omega$  an, wie er insbesondere bei der Verwendung von nur einer Badelektrode realistisch ist, so kann die maximal bestimmbare Leitfähigkeit  $100 \mu\text{S}$  nicht überschreiten (4.6).

Um Messfehler aufgrund der Serienwiderstände zu vermeiden, und zu gewährleisten dass die Spannung ausschließlich über die Potenzialelektrode abfällt, ist es daher nötig, die Stromelektrode mit einer separaten Referenzelektrode zu versehen, über die der Strom abfließen kann. Beide Referenzelektroden (bzw. die Salzbrücken) sollten möglichst nah an die Oozyte herangebracht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind zwar ebenfalls mit nur einer Badelektrode durchgeführt worden, da allerdings nur qualitative Aussagen hinsichtlich der Expression gemacht wurden, konnte auf die Anbringung einer zweiten Referenzelektrode verzichtet werden.

### **1.8.2 Die Patch-clamp-Technik**

Im Gegensatz zu der Ganzzellmessung ermöglicht die Messung am isolierten Membranpatch die Auflösung sehr kleiner Ströme im Picoampèrebereich, wobei nur eine Elektrode für Spannungsmessung und Strominjektion erforderlich ist. Bei dieser Methode wird ein kleines Membranfragment von der Zelle abgezogen, welches entweder nur einen Durchmesser von  $1\text{-}2 \mu\text{m}$  hat und nur wenige der zu untersuchenden Proteine enthält (Einzelkanalmessungen), oder ein deutlich größeres Fragment mit einem Durchmesser von über  $18 \mu\text{m}$ , in dem etliche tausend Membranproteine vorhanden sein können (Makropatch oder "giant patch"). Bei beiden Methoden wird zunächst über eine entsprechend vorbehandelte Glaspipette ein dichter elektrischer Kontakt zur Zelloberfläche hergestellt, wobei der Abdichtwiderstand nicht unter  $1 \text{ G}\Omega$  sein sollte. Das so elektrisch isolierte

Fragment wird als Membranfleck ("patch") bezeichnet und kann unter Aufrechterhaltung des hohen Widerstandes von der Zelle abgerissen werden. Da sich nun die intrazelluläre Seite der Plasmamembran außen befindet, wird das so entstandene Fragment auch als "*excised inside-out patch*" bezeichnet. Durchbricht man vor dem Abziehen des Patches von der Zelle kurz die Membran nach innen, so ist es möglich, einen sogenannten *outside-out* Patch zu erzeugen, bei dem die intrazelluläre Seite dem Pipetteninneren zugewandt ist. Der Vorteil bei Messungen mit *inside-out*-Patches im Vergleich zu den Ganzzellmessungen ist, neben der erheblich besseren Zeitauflösung aufgrund der deutlich verringerten Oberfläche, vor allem die Zugänglichkeit der zytosolischen Membranseite. Zum Beispiel beim CFTR sind die regulatorischen Domänen intrazellulär lokalisiert, so dass sie bei Ganzzellmessungen nur indirekt stimuliert werden können. Im *excised inside-out* Patch hingegen sind diese Domänen direkt zugänglich.



**Abb. 1.8-3: Schaltbild für die Messung am isolierten Makropatch:**

Durch den Rückkopplungswiderstand  $R_f$  wird die am Operationsverstärker OPA bestimmte Spannungsdifferenz (Soll / Ist) als Strom über die Pipette an die Membran geführt. Gleichzeitig wird die Spannungsdifferenz als verstärktes Mess-Signal ausgegeben. Zur Vereinfachung ist die Referenzelektrode nicht gezeigt.

Messtechnisch beruht die Patch-clamp-Technik, ebenso wie die Zwei-Elektroden-Voltage-clamp Methode, auf der Strommessung unter Aufrechterhaltung einer definierten Spannung. Um dieses mit einer einzigen Elektrode durchführen zu können, ist ein anderer Regelkreis notwendig (Abb. 1.8-3). Auch von dem Patch-clamp Verstärker wird die Differenz zwischen Pipetten- und Sollspannung gemessen, wobei der Eingangswiderstand des Operationsverstärkers (OPA) so hoch ist, dass praktisch kein Strom fließt. Der Ausgang des Verstärkers ist über einen Rückkopplungswiderstand  $R_f$  an die Pipette gekoppelt, was zu einem Strom durch  $R_f$  in die Pipette führt,

solange eine Spannungsdifferenz zwischen Pipetten- und Sollspannung besteht. Ein zweiter OPA misst den Spannungsabfall an dem Rückkopplungswiderstand, gemessen wird letztlich die Differenz zu der Kommandospannung, aus der anhand der bekannten Größe von  $R_f$  auf den Strom geschlossen werden kann.

### 1.8.3 Charakterisierung von Ionenkanälen

Ein einzelner Ionenkanal kann als eine Leitfähigkeit angenommen werden, die bei definierten Bedingungen im offenen Zustand im zeitlichen Mittel konstant ist. Diese Leitfähigkeit ist vor allem von der Konzentration der permeierenden Ionensorte auf beiden Seiten der Membran und der angelegten Spannung abhängig. Nimmt man zur Vereinfachung an, dass unter definierten Messbedingungen ein Ionenkanal vor allem in zwei unterscheidbaren Zuständen, nämlich offen (O) oder geschlossen (C), vorliegt, die sich bei Einzelkanalmessungen in Rechtecksignalen widerspiegeln, so kann das Kanalverhalten wie folgt charakterisiert werden.

Aus dem Verhältnis der Zeit, die sich der Kanal in einem offenen Zustand befindet, zu dem Zeitraum, in dem er geschlossen ist, lässt sich auf die Offenwahrscheinlichkeit  $P_O$  schließen. Darüber hinaus geben die mittleren Offenzeiten  $\tau_{\text{offen}}$  und Geschlossenzeiten  $\tau_{\text{geschlossen}}$  auch die Übergangsraten in den jeweils anderen Zustand wieder und ermöglichen so kinetische Aussagen.

$$P_O = \frac{\tau_{\text{offen}}}{\tau_{\text{offen}} + \tau_{\text{geschlossen}}}$$

Dieser Wert beschreibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein bestimmter Kanal unter den jeweiligen Umständen, die beispielsweise von dem Phosphorylierungsgrad abhängen können, geöffnet ist. Setzt sich der gemessene Strom aus dem Beitrag von mehr als einem Kanal zusammen, so kann bei bekannter Offenwahrscheinlichkeit auf die Anzahl der Kanäle geschlossen werden, da sich der Gesamtstrom additiv aus den Einzelströmen der Kanäle zusammensetzt, wenn eine Interaktion der Kanäle ausgeschlossen wird.

$$I_{\text{gesamt}} = I_{\text{Einzelkanal}} * N * P_O \quad (N = \text{Kanalanzahl})$$

Im umgekehrten (und für elektrophysiologische Messungen wichtigeren) Fall kann bei einer gemessenen Stromänderung, unter der Annahme einer konstanten Anzahl von im Patch vorhandenen Kanälen, auf die Offenwahrscheinlichkeit geschlossen werden. Wenn sich viele Kanäle gleichzeitig in einem Patch befinden, ist es nicht mehr möglich, die oben beschriebene Statistik zu erstellen, so dass die Öffnungs- und Schließrate nicht mehr direkt bestimmt werden kann.

Allerdings ist es auch in Makropatchmessungen möglich, kinetische Aussagen zu treffen, die den Vorteil haben, die verschiedenen vorliegenden Zustände, zum Beispiel verschiedene Phosphorylierungsniveaus mit unterschiedlichen Offenwahrscheinlichkeiten, auch statistisch zu repräsentieren. Hierfür bestimmt man die Relaxation nach einer raschen Störung des Gleichgewichts, wie zum Beispiel nach dem Entzug von ATP, was das Schließen der Kanäle zur Folge hat. Die zeitabhängige makroskopische Änderung des Stroms ermöglicht dann die Bestimmung einer Exponentialfunktion, aus deren Zeitkonstante auf die, allerdings nur apparente, das heißt sich aus der Summe aus Hin- und Rückreaktion zusammensetzende, Relaxationsrate geschlossen werden kann. Darüber hinaus ist das Signal- zu Rauschverhältnis bei dieser Methode deutlich besser, weswegen auch bei hoher Filterfrequenz (kHz) eine sehr gute Signalauflösung möglich ist, während bei Einzelkanalmessungen zur Auflösung von unterschiedlichen Einzelkanalströmen mit Filterfrequenzen von 10-100 Hertz gearbeitet wird [68, 79, 107].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

#### RNA-Injektion

---

Injektionsapparatur	Mikroinjektor Nanoliter Injector A203XVZ, WPI der Firma Drummond Scientific Company
Pipettenziehgerät	Vertical Pipette Puller Model 700D von Fa. David Kopf Instruments , USA
Glaskapillare	(3,5", Drummond #3-00-203-G/X der Firma Drummond Scientific Company)

#### Voltage-clamp

---

Binokular	Leica Zoom 2000
Glaskapillaren	Borosilikatglas von Clark Electronic Instruments, Pangborne, England, gefertigt mit Pipettenziehgerät, das von der institutseigenen Werkstatt hergestellt wurde
Messstand mit Faraday-Käfig	institutseigene Werkstatt
Voltage-clamp-Verstärker	Gene Clamp 500 von Axon Instruments (Foster City, USA)
Erfassung der Messdaten	a) x/t-Schreiber von Kipp & Zonen b) Software ISO2 (MFK-Computer, Niedernhausen, Deutschland)
Software zur Regelung der Kommandospannung	ISO2

#### Patch-clamp

---

Mikroskop (invers)	Televal 31 von Zeiss (Jena)
Glaskapillaren	Borosilikatglas von Clark Electronic Instr., Pangborne, England, gezogen mit Pipette Puller der Firma Narishige, Tokio, Japan

Verstärker	EPC7 von List Instruments / Axon 200B mit TL-1 bzw. Digidata 1322 Interface (Axon)
Erfassung der Messdaten	a) x/t-Schreiber von Kipponen b) Software ISO2 von MFK; KAN1 von MFK pClamp, Version 6 bzw. 8.1 von Axon
Software zur Regelung der Kommandospannung	ISO2, ClampEx
♦ außerdem Atom-Absorptions-Spektrometer AAS500 der Firma Perkin Elmer zur Überprüfung des Magnesiumgehalts der Patch-clamp Badlösungen	

## 2.2 Eingesetzte Substanzen

<u>Substanz (Trivialname)</u>	<u>Hersteller</u>
♦ 3-Aminobenzoesäure-Ethylester - Methansulfonat (Tricain)	Fluka, Neu-Ulm
♦ 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma, Deisenhofen
♦ Adenosindiphosphat - freie Säure-	Boehringer, Mannheim
♦ Adenosintriphosphat (ATP) - Magnesiumsalz-	Sigma, Deisenhofen
♦ Adenosintriphosphat -TRIS-Salz-	Sigma, Deisenhofen
♦ Adenylylimidodiphosphat (AMP-PNP) - Tetralithiumsalz-	Roche
♦ Bariumchlorid	Merck, Darmstadt
♦ Cadmiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
♦ zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	Sigma, Deisenhofen
♦ zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)	Sigma, Deisenhofen
♦ Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
♦ Forskolin	Sigma, Deisenhofen
♦ Kollagenase A	Sigma, Deisenhofen
♦ Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
♦ N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2- - Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
♦ Penicillin G	Sigma, Deisenhofen
♦ Proteinkinase A -katalytische Untereinheit-	Promega, Wisconsin (USA)

◆ Proteinkinase-Inhibitorpeptid (PKI)	Life Technologies
◆ Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
◆ Tetraethylammoniumchlorid (TEA-Cl)	Sigma, Deisenhofen
◆ N-Methyl- D-glucamin (NMG)	Merck, Darmstadt
◆ D,L -Asparaginsäure	Sigma, Deisenhofen
◆ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
◆ Diaminocyclohexantetraessigsäure (CDTA)	Sigma, Deisenhofen
◆ Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
◆ Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
◆ Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
◆ Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
◆ Natriumgluconat	Sigma, Deisenhofen
◆ MOPS	Sigma, Deisenhofen
◆ Amiloridhydrochloriddihydrat (Amilorid)	Sigma, Deisenhofen
◆ Luciferase Assay Kit	Boehringer, Mannheim

### **Molekularbiologie:**

◆ Quik Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, California (USA)
◆ DNA- Mini und Midipräparation	Genomed, Bad Oeynhausen
◆ mMessage mMachine Kit	Ambion, Austin (Texas)

### **Zusätzlich verwendete Software:**

Zur Analyse der erfassten Daten diente neben Clampfit8 (Axon Instruments, USA) vorwiegend Microcal Origin. Um die freie Magnesiumkonzentration unter Verwendung unterschiedlicher Chelatoren bestimmen zu können, erfolgte die Berechnung in MaxSlide (C. Patton, Stanford Univ.) und CAMG, weitere verwendete Programme waren vor allem Corel Draw (Corel, USA), WinWord und Excel (Microsoft).

## **2.3 Verwendete Lösungen**

### **2.3.1 Präparation und Verwahrung der Oozyten**

Im Anschluss an die nachfolgend beschriebene Entnahme und Reinigung verblieben die Oozyten sowohl vor, als auch nach der Separation in Oozyten-Ringerlösung, welcher Penicillin und Streptomycin zugesetzt waren (9,5 mg/l bzw. 10 mg/l). In

einigen Oozytenpräparationen wurde während des Kollagenaseverdaus zusätzlich Trypsininhibitor in einer mikromolaren Konzentration zugegeben, da berichtet wurde, dass dieser Serinproteaseinhibitor Zellmembranschäden verhindern und somit eine erhöhte Haltbarkeit der Oozyten bewirken soll [146]. Dieses ließ sich bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht bestätigen.

### **OOZYTEN-RINGERLÖSUNG**

Der Verdau und die Lagerung der Oozyten erfolgte in modifizierten Oozyten-Ringerlösungen, welche so zusammengesetzt waren, dass sie der Extrazellulärflüssigkeit des Bauchraums der Krallenfrösche, sowohl hinsichtlich ihrer ionalen Zusammensetzung, als auch im pH-Wert und der Osmolarität entsprachen.

Für den Kollagenaseverdau des Bindegewebes und der Follikelschicht wurden zeitweise sowohl calciumhaltige als auch calciumfreie (mit EDTA versetzte) Lösungen verwendet, da hierdurch, ebenso wie bei dem Trypsininhibitor, eine Proteasehemmung und somit auch Haltbarkeitsverbesserung der Zellen erzielt werden sollte. Über einen Zeitraum von zwei Jahren wurden die so behandelten Oozyten von bis zu sechs unabhängig arbeitenden Personen miteinander verglichen. Da bis auf wenige Ausnahmen die calciumfrei verdauten Zellen etwas haltbarer waren, wurde von diesem Zeitpunkt an auf einen calciumhaltigen Kollagenaseverdau verzichtet.

**Oozyten-Ringerlösung:** NaCl 110 mM; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 2 mM; HEPES 5 mM, pH 7,6 (NaOH, ca. 9,5 mM), 220 mosmol/l.

### **2.3.2 Voltage-clamp**

Für die Voltage-clamp Messungen wurden ebenfalls modifizierte Ringerlösungen verwendet, denen zur CFTR-Aktivierung entweder 250 µM IMBX und 10 µM Forskolin oder 100 µM cAMP bzw. 100 µM cGMP beigelegt wurde.



### 2.3.3 Patch-clamp

#### A) PIPETTENLÖSUNG

Die Pipettenlösung, welche in *inside-out* Makropatchmessungen der Extrazellulärflüssigkeit entspricht, war so zusammengesetzt, dass der Patch eine minimale Leckleitfähigkeit besaß und die Lösung gleichzeitig möglichst wenige Bestandteile enthielt.

**CFP2:** NMG 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; HEPES 10 mM; pH 7,4 (HCl, ca. 148,5 mM); ca. 285 mosmol/l.

Für einige Messungen wurde eine Pipettenlösung mit Cadmium, für die Stabilität des Gigaseals, und Barium, das potenzielle Kaliumströme unterdrücken sollte, eingesetzt. Da eine Sealverbesserung nicht beobachtet wurde und keine Badlösung Kalium enthielt, wurde auf diese Zusätze verzichtet. Somit waren in der Pipettenlösung keine zweiwertigen Kationen außer Magnesium vorhanden, welches von der extrazellulären Seite nicht mit dem Chloridkanal interagiert. Die Verwendung der oben beschriebenen Pipettenlösung ermöglichte Makropatch-Messungen von mehr als zwei Stunden ohne deutliche Abnahme des Seal-Widerstandes.

#### B) BADLÖSUNGEN

Im Gegensatz zu der Pipettenlösung, welche in nahezu allen in dieser Arbeit gezeigten Messungen gleich war, variierte die Zusammensetzung der Badlösung aufgrund der unterschiedlichen Fragestellungen stark. Daher sind die Lösungen nachfolgend gemäß der jeweilig bearbeiteten Aufgabe tabelliert. Der pH-Wert aller Badlösungen wurde, durch HEPES gepuffert, auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität der Badlösung betrug in der Regel 280-290 mosmol/l und überschritt einen Wert von 300 mosmol/l nicht, so dass durch Osmolaritätswechsel [148] hervorgerufene Artefakte ausgeschlossen werden konnten.

Als Standardbadlösung diente eine mit **BS2** bezeichnete Lösung:

NMG 160 mM; HEPES 10 mM; EGTA 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM.

Diese wurde mit D,L-Asparaginsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, was eine Osmolarität von ca. 290 mosmol/l ergab. Die Aktivierung der CFTR-Chloridkanäle erfolgte durch entsprechende Zusätze zu dieser Lösung, gegebenenfalls war eine erneute Einstellung des pH-Werts notwendig:

- ♦ MgATP 10  $\mu$ M-5 mM
- ♦ cGMP 10-20  $\mu$ M (bei Koexpression von cGKII)
- ♦ PKA kat. Untereinheit 100 u / ml (= ca. 50 nM)

Bei der in einigen Messungen eingesetzten ATP-Konzentration von 25 mM wurde die Lösung vor der Einstellung des pH-Wertes mit Asparaginsäure zuerst mit MgATP versetzt, um zu hohe Osmolaritäten zu vermeiden.

Zur Unterscheidung zwischen Vesikel und *inside-out* Patch wurde die Badlösung wie folgt angesetzt. Alternativ wurde eine EGTA-freie Badlösung verwendet, die über 2 mM zugesetztes Calciumchlorid verfügte.

**BSCa:** NMG 160 mM; HEPES 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; EGTA 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; pH 7,4 (Asparaginsäure, ca. 140 mM)

Das enthaltene Calcium aktivierte die endogenen, calciumaktivierten Chloridkanäle [93], wenn die intrazellulär lokalisierten Bindungsstellen zugänglich waren, was die *inside-out* Konfiguration des Patches bestätigte. Die freie Ca-Konzentration von ca. 22  $\mu$ M war sättigend bezüglich der Kanalaffinität. Weiterhin ermöglichte diese Lösung die Bestimmung der Lösungswechselgeschwindigkeit, da die Chloridkanäle sofort auf eine Calciumwegnahme reagierten und die Geschwindigkeit der Stromabnahme somit direkt proportional zum Lösungswechsel war.

**BS2 Cl:** NMG 160 mM; EGTA 5 mM; HEPES 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7.4 (HCl, ca. 145 mM)

Diese Lösung wurde sowohl zur Bestimmung der Geschwindigkeit des Lösungsaustauschs (bei aktivierten Chloridkanälen) in der Messkammer, als auch zur Untersuchung des verzögerten Öffnens bzw. Schließens der Kanäle verwendet.

### **C) MAGNESIUMABHÄNGIGKEIT DES CFTR**

Die Lösungen, welche zur Untersuchung der Magnesiumabhängigkeit des CFTR verwendet wurden, enthielten zumeist EDTA, was eine genaue Einstellung der freien Magnesiumkonzentration im Bereich von etwa 0,5  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M ermöglichte. Für die Messungen, in denen eine verhältnismäßig hohe MgATP-Konzentration bei niedriger freier Magnesiumkonzentration beabsichtigt war, kam zusätzlich eine Lösung ohne Magnesiumchelator zum Einsatz. Da das ATP selbst Magnesium mit einer

Affinität von  $10^4$  M bindet, ermöglichte dies die Betrachtung eines gänzlich anderen Bindegleichgewichtes als unter Verwendung von EDTA (höchste MgATP-Konzentration in den Messungen: 20  $\mu$ M) oder CDTA (höchste MgATP-Konzentration: <10  $\mu$ M). Um eine nahezu Mg-freie Badlösung zu erhalten (errechnete freie Mg-Konzentration unter 1 pM), wurde der Komplexbildner CDTA verwendet. Ikuma und Welsh berichteten [67], dass diese Substanz in einem Teil ihrer Messungen zu irreversiblen Signalverlust führte, was in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Die im Vergleich zu EDTA um zwei Größenordnungen höhere Komplexbildungskonstante erlaubte die Einstellung von freien Magnesiumkonzentrationen im Bereich zwischen 0,1 nM und 50 nM. Die folgende Lösung stellte die Basis für die Mg-Messungen dar und wurde entsprechend mit TRIS-ATP und Magnesiumsulfat auf die gewünschte ATP und Magnesiumkonzentration eingestellt.

NMG 160 mM; HEPES 10 mM; EGTA 5 mM; HCl 4 mM, pH 7,4 (Asparaginsäure)

#### **D) UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG ENaC / CFTR**

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung von epithelialelem Natriumkanal (ENaC) und dem CFTR musste zwischen der Aktivierung des CFTR-Chloridkanals, des ENaCs und der gleichzeitigen Aktivierung beider Kanäle unterschieden werden können. Da der ENaC im Gegensatz zum CFTR konstitutiv aktiv ist und keine potenten, intrazellulär wirkenden Inhibitoren bekannt waren (Amilorid wirkt nur von der extrazellulären Seite, wie auch in dieser Arbeit bestätigt wurde, nicht gezeigt), musste ein Wechsel zwischen natriumfreier und natriumhaltiger Lösung erfolgen. Da, unabhängig von der Expression des ENaC, hierdurch transiente Stromänderungen zu beobachten waren, welche vermutlich [101] auf Änderungen in den Diffusionspotenzialen zurückzuführen waren, wurde der Einsatz verschiedener natriumhaltiger Badlösungen getestet. Weder MES, noch Gluconat, noch Sorbitol erwiesen sich als geeignet, weswegen weiterhin mit der abgewandelten BS2-Lösung gearbeitet wurde. Wu et al. berichteten über eine Notwendigkeit hoher Ionenstärke in der Badlösung für eine Aktivierung des CFTR [157]. Die endogenen Natriumkanäle wurden normalerweise erst bei Haltepotenzialen von mehr als +20 mV geöffnet [112], so dass eine einfache Unterscheidbarkeit zu den heterolog exprimierten epithelialen Natriumkanälen möglich war.

**BS2Na:** NaOH 160 mM; EGTA 5 mM; HEPES 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; pH 7,4 (Asparaginsäure)

Diese Lösung wurde zur gleichzeitigen Aktivierung des CFTR mit 500  $\mu$ M MgATP versetzt.

Um mögliche Aspartat-induzierte Effekte zu vermeiden, wurde die Lösung folgendermaßen modifiziert eingesetzt:

**Na-Gluconat:** Na-Gluconat 145 mM; EGTA 5 mM; HEPES 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; pH 7,4 (NaOH).

## 2.4 Expression des CFTR in *Xenopus*-Oozyten

### 2.4.1 Herstellung der cRNA zur Injektion

Die für den humanen CFTR codierende DNA wurde in einer zur Expression in *E. Coli* geeigneten Vektor (zumeist pSP64, alternativ pTLN) eingebracht, wobei außerdem u. a. nicht translatierte Regionen des  $\beta$ -Globingens eingefügt wurden, um die Expression zu verbessern [146]. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von D. Ollig mit dem *Ambion cRNA message machine kit* zur cRNA-Herstellung eingesetzt. Diese RNA konnte anschließend den Oozyten injiziert werden. Die ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten CFTR-Mutanten K1250A / K1250Q wurden freundlicherweise von J. Riordan (Mayo Clinic, Scottsdale, USA) zur Verfügung gestellt. Das zur heterologen Expression in ptj100 umklonierte Gen für die cGMP-abhängige Proteinkinase II, das analog dem CFTR in cRNA transkribiert wurde, wurde uns freundlicherweise von Susanne Lohmann (Universität Würzburg) überlassen.

Das Fusionsprotein Bakteriorhodopsin-PKA (BR-PKA) wurde freundlicherweise von G. Nagel hergestellt. Hierbei wurde die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A an ihrem Aminoterminus mit dem Carboxyterminus des Bakteriorhodopsin gekoppelt, so dass sich dieses in die Plasmamembran einlagern sollte (Abb. 2.4-1).

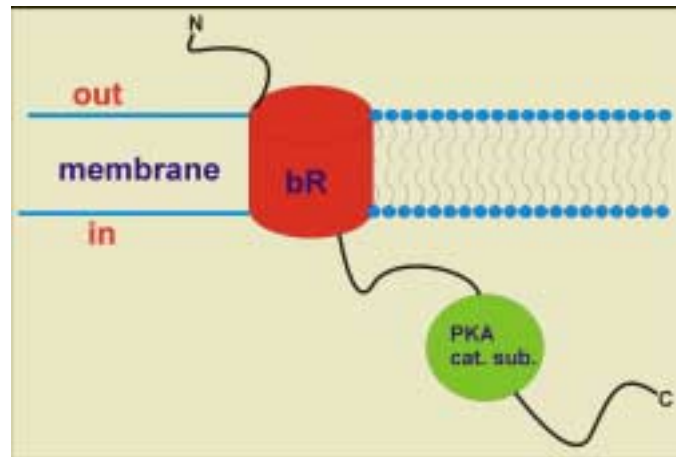


Abb. 2.4-1: Fusionsprotein aus Bakteriorhodopsin (rot) und der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (grün)

## 2.4.2 Gewinnung der Oozyten aus *Xenopus laevis*

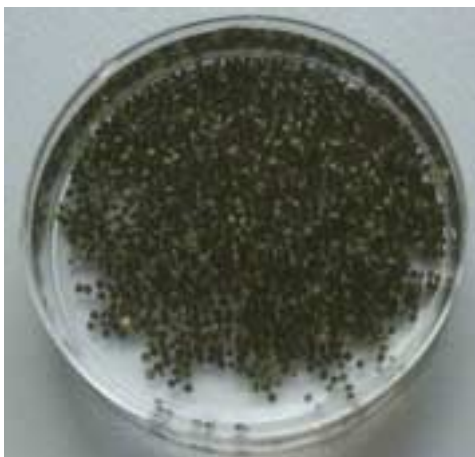


Abb. 2.4-2: Für die Mikroinjektion geeignete Oozyten nach dem Kollagenaseverdau

Die zur heterologen Expression vorgesehenen Oozyten wurden aus dem Ovar von betäubten weiblichen Krallenfröschen von *Xenopus laevis* (Abb. 1.7-1) entnommen. Hierzu wurden diese unter Verwendung des Anästhetikums Tricain (3-Aminobenzoessäureethylester, 0,2 %) narkotisiert, bis eine vollständige Erschlaffung der Muskulatur zu beobachten war und auch keinerlei Reflexe mehr vorhanden waren. Nun wurde der Frosch mit Wasser abgespült, um das Tricain zu entfernen und rücklings auf einem Behälter mit Eis gelegt.

Das Eis hielt die Betäubung aufrecht und verminderte die Durchblutung, was bei möglichen Verletzungen von Adern den Blutverlust verringerte. Anschließend erfolgte ein kleiner Schnitt (ca. 15 mm) in die Bauchdecke, dann wurden die unter der Epidermis befindliche Faszies und der Muskel in gleicher Weise aufgetrennt.

Unter Verwendung einer stumpfen Pinzette war nun die einfache Entnahme möglichst unverletzter Ovarlappen möglich. Abschließend wurde die Wunde durch zwei Nähte mit selbstverdauendem Faden wieder geschlossen. Nach der Operation wurde der Frosch in ein separates Glasbecken gesetzt, in dem er für einige Tage verblieb. Anschließend erfolgte für einen Zeitraum von ca. 1 Monat der Aufenthalt in einem Quarantänebecken. Derartig behandelte Frösche konnten bis zu acht Mal (Abstand zwischen den Operationen ca. sechs Monate) operiert werden, bevor das Gewebe zu vernarbt für eine ausreichende Produktion von Ovar wurde. Das entnommene Ovargewebe wurde nun mit einer kleinen Schere vorsichtig in kleinere Teile zerschnitten, die danach in eine Oozyten-Ringerlösung (s.o.) mit Kollagenase A (2 mg / ml) gelegt wurden. Bei ca. 18°C wurde unter Verwendung eines Schüttlers für 2-3,5 h verdaut, um das Bindegewebe zu entfernen und die Zellen zu vereinzeln. War dieser Verdauungsprozess abgeschlossen, erfolgten mehrere Waschvorgänge mit Oozyten-Ringerlösung. Hiernach war eine einfache Selektion geeigneter, d. h. gleichmäßig geformter und pigmentierter Oozyten des Stadiums V (Abb. 2.4-2) möglich.

Zur Injektion von cRNA ausgewählte Oozyten wurden in eine Petrischale mit Rillen zu ihrer Fixierung überführt. Die wassergelöste cRNA (Konzentration durchschnittlich 1 µg / µl) wurde mit einer fein ausgezogenen Glaskapillare aufgenommen, welche mit Mineralöl gefüllt auf den Mikroinjektor aufgesetzt worden war. Die Öffnung der Kapillare sollte hierbei so beschaffen sein, dass einerseits der Durchmesser groß genug war, um RNA quantitativ in die Zelle zu injizieren, und andererseits eine möglichst geringe Verletzung der Zelloberfläche hervorgerufen wurde. Ein Durchmesser von ca. 30 µm erwies sich als ideal. Dieses ließ sich durch das Abbrechen einer sehr fein ausgezogenen Spitze oder alternativ durch Abschneiden und anschließendes Schleifen auf einer entsprechenden Schleifplatte erreichen. Die erste Variante war weniger arbeitsintensiv, dafür war in den meisten Fällen die Pipettenspitze scharfkantig. Um die cRNA einzubringen, wurde die Pipette nun vorsichtig in die Zelle eingeführt und mit Hilfe des Pumpenvortriebs die gewünschte Menge an RNA, in der Regel zwischen 10 - 50 nl, injiziert. Da bislang keine verlässlichen Daten über die optimale Position zur Injektion vorlagen, war ein platziertes Einstechen nur in den Fällen erforderlich, in denen dieselbe Zelle zeitlich versetzt zweimal injiziert wurde (s. ENaC/CFTR-Wechselwirkung). In diesen Fällen erfolgten die Injektionen am vegetalen Pol. Zur Expression verblieben die Zellen in einer Penicillin /

Streptomycin-haltigen Lösung bei einer Temperatur von 16-18°C. Teilweise erfolgte nach zwei Tagen die Überführung in einen auf 13°C temperierten Brutschrank, um bei bereits ausreichender Expression die Haltbarkeit der Zellen zu erhöhen.

## **2.5 Elektrophysiologie**

### **2.5.1 Voltage-clamp**

Entsprechend dem in der Einleitung dargestellten Messprinzip waren zur verlässlichen Detektion hoher Ströme im Voltage-clamp sorgfältig hergestellte Glaselektroden nötig. Der elektrische Kontakt wurde über einen gleichmäßig chlorierten Silberdraht erzeugt. Die Elektroden sollten nach dem Ziehen mit einem Pipettenziehgerät so beschaffen sein, dass sie mit Kaliumchlorid gefüllt einen Widerstand von max. einem Megaohm (Stromelektrode) bzw. zwei Megaohm (Potenzialelektrode) aufwiesen. Insbesondere bei zu hohem Widerstand der Stromelektrode hätte, dem Ohmschen Gesetz folgend, die angelegte Spannung bei großen Signalen sehr hoch sein müssen, was zu Messartefakten geführt hätte.

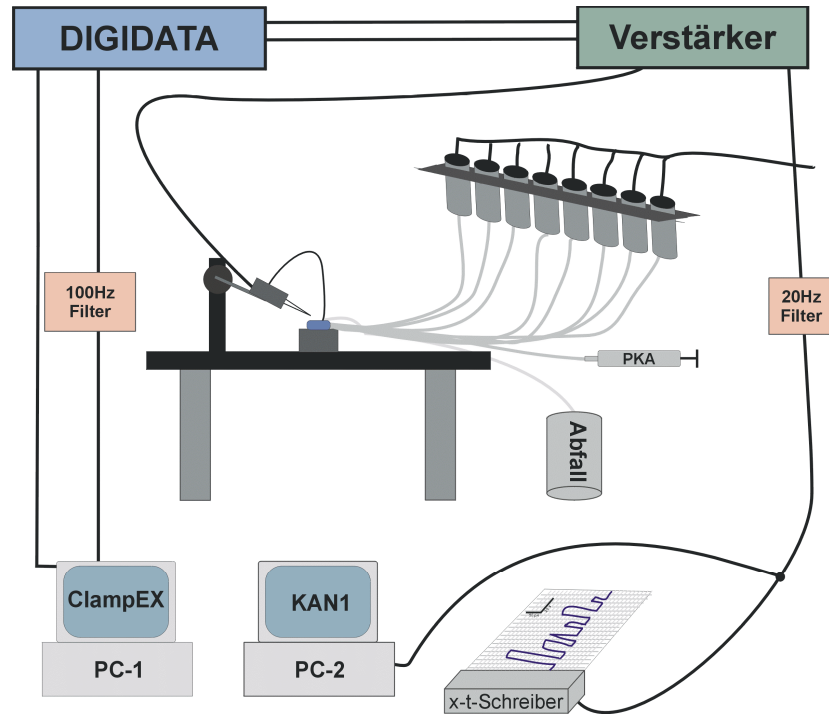
Zur Messung wurde die Zelle in einer entsprechenden Messkammer so positioniert, dass sie einerseits bei Perfusion mit den verschiedenen Badlösungen nicht wegdiffundieren konnte und andererseits frei zugänglich für die Elektroden war. Der Flüssigkeitsstand sollte die Zelle nur knapp bedecken, damit die Geschwindigkeit des Lösungswechsels maximal war. Die beiden so präparierten Glaselektroden wurden auf die entsprechenden Pipettenhalter aufgeschraubt. Nun wurden diese mit Hilfe der Stellschrauben so positioniert, dass sie sich unterhalb der Badoberfläche in der Nähe der Membran befanden. Idealerweise sollte der Winkel zwischen den Pipetten ca. 120° betragen, um die Spannungsklemme über die gesamte Zellmembran zu gewährleisten. Nachdem die Elektroden der Membran angenähert wurden, erfolgte der Abgleich der Potenzialabweichungen unter der Bedingung der Stromklemme. Anschließend wurden die Elektroden vorsichtig in die Zelle eingestochen. Nun ließ sich das Ruhepotenzial der Oozyte ablesen, wonach die Umschaltung in den Modus der Spannungsklemme erfolgte. Daraufhin wurde die gewünschte Haltespannung, zu meist -40 mV, angelegt.

Aufgrund der zugefügten Beschädigung der Membran durch die Elektroden war es bisweilen nötig, vor der Messung die Zelle einige Minuten wieder abdichten zu lassen, was an dem verminderten Leckstrom überprüft werden konnte. Die eigentliche Messung erfolgte durch die Applikation von Lösungen, welche den CFTR-Chloridkanal aktivierten und aufgrund des Konzentrationsunterschiedes zwischen Intra- und Extrazellulärraum, sowie der angelegten Haltespannung, zu einem messbaren Strom führten. Die Aufzeichnung dieser Signale erfolgte mittels angeschlossenem x-t-Schreiber und einem zusätzlichen Personal Computer, der über die notwendige Software verfügte. Die Filterfrequenz bei kontinuierlicher Datenaufzeichnung betrug 20 Hz (Samplingfrequenz 50 Hz), während bei Applikation kurzer Spannungspulse mit 100 Hz gefiltert und mit 250 Hz aufgezeichnet wurde.

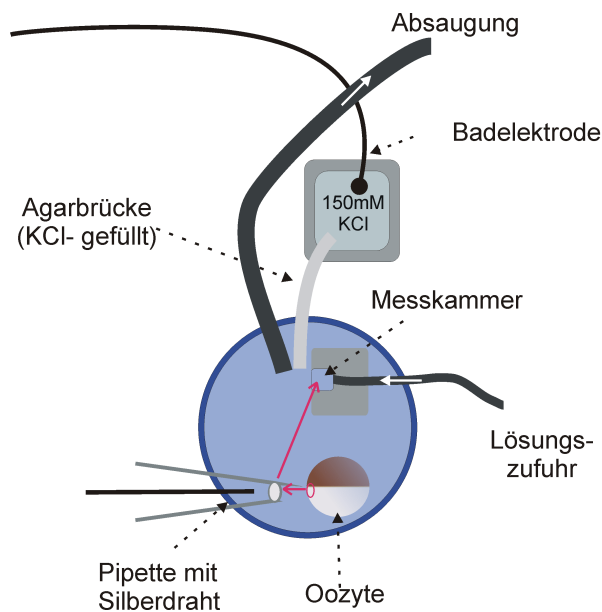
### **2.5.2 Patch-clamp**

Die für die Makropatch-Experimente erforderlichen Glaspipetten wurden mit Hilfe eines Narishige-Pipettenziehgerätes aus Borosilikatglas durch Wahl geeigneter Temperatur und Zuggewichte so hergestellt, dass der Pipettenspitzendurchmesser zwischen 16 und 24  $\mu\text{m}$  lag. Anschließend erfolgte das vorsichtige Abschmelzen des scharfen Glasrandes unter einem Binokular durch Annäherung an einen Glühdraht, um eine möglichst glatte Pipettenspitze zu erzeugen. Um Patch-clamp-Messungen an der Oozytenmembran durchführen zu können, musste zuerst die Vitellinschicht, welche die Zelle umgab und somit einen direkten Kontakt zwischen Pipette und Membranoberfläche verhinderte, entfernt werden. Unter einem Mikroskop wurde diese Vitellinschicht mit Hilfe zweier scharf geschliffener Uhrmacherpinzetten von der Zelle abgezogen. Hiernach war die Zelle sehr empfindlich, so dass sowohl Kontakt mit der Luft, als auch übermäßige Scherkräfte zu vermeiden waren. Die devitellierte Zelle wurde, wie in Abb. 2.5-2 schematisch dargestellt, in eine auf dem Mikroskop-Objektstisch des Messplatzes aufgebrachte Schale platziert. Die frisch gezogene Patchpipette wurde mit der entsprechenden Lösung unter Verwendung einer Spritze mit fein ausgezogener Plastikspitze soweit gefüllt, dass der in der Elektrode befindliche chlorierte Silberdraht, nach dem Aufstecken der Glaskapillare, ausreichenden Kontakt mit dieser Lösung hatte. Dieser Silberdraht musste über eine unbeschädigte Oberfläche verfügen, was sich durch das sogenannte Hitzepolieren des Randes des Borosilikatglases mit Hilfe eines kleinen Bunsenbrenners bewerkstelligen ließ.





**Abb. 2.5-1: Aufbau des Patch-clamp-Arbeitsplatzes** (nicht gezeigt ist das Binokular)



**Abb. 2.5-2 Abbildung des Mikroskopisches vom Patch-clamp-Setup** in Aufsicht dargestellt

Das Messschälchen konnte wahlweise mit der anschließend verwendeten Badlösung, aber auch mit der Pipettenlösung gefüllt sein, wobei letztere den Vorteil hatte, dass die Lösung, die sich in der Pipette befand, beim Eintauchen in das Schälchen nicht

durch eine andere Lösung verunreinigt wurde. Wie beim Voltage-Clamp Messplatz wurde die Badelektrode nicht direkt in das Messschälchen getaucht, sondern in eine separate Kammer, die mit Kaliumchlorid gefüllt und über eine mit Agar-Agar gefüllte Salzbrücke leitend mit der Messkammer verbunden war. Bei direktem Kontakt der Badelektrode wäre es zu chloridabhängigen Potenzialänderungen gekommen, da die während der Messung verwendeten Badlösungen unterschiedlich zusammengesetzt waren. Vor der Annäherung an die Zellmembran musste der vor allem durch Übergangspotenziale und Leckkontakte zustandegekommene Pipettenoffset abgeglichen werden. Um Kontaminationen der Pipettenlösung zu vermeiden, war es sinnvoll, einen leichten Überdruck an die Patchpipette anzulegen, so dass keine Partikel aus dem Bad in die Pipette diffundieren konnten. Die Pipette wurde nun direkt an die Membran herangeführt, wobei der Wechsel zu einem geringen Unterdruck erfolgte, welcher das Abdichten beschleunigte. Mit Hilfe der angeschlossenen Steuersoftware wurde ein Spannungspuls von ca. 2 mV erzeugt. Das Abdichten der Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran ließ sich anhand der Zunahme des Pipettenwiderstandes verfolgen. Häufig war außerdem ein Einstülpen der Zellmembran in die Pipette zu beobachten. Erreichte der Pipettenwiderstand Werte von minimal etwa einem Gigaohm, wurde die Pipette vorsichtig von der Membran abgezogen, nachdem der Unterdruck aufgehoben war. In Experimenten, in welchem neben dem CFTR-Chloridkanal auch noch das Fusionsprotein BR-PKA koexprimiert wurde, war aus den unter 3.3.2 geschilderten Gründen ein höherer Abdichtwiderstand als ca. 100 M $\Omega$  nicht zu erwarten. Daher konnte auf einen elektrisch dichten Kontakt zwischen Zellmembran und Pipette nur dadurch geschlossen werden, dass ein verhältnismäßig hoher Widerstand von ca. 100 M $\Omega$  sich auch bei längerem Warten nicht weiter erhöhte.

Nun wurde die Pipette sehr vorsichtig in die eigentliche Messkammer überführt, gegebenenfalls musste die Oozyte noch aus dem Messschälchen entfernt werden, um Kontaminationen durch Zellbestandteile zu vermeiden. Das Applizieren der Badlösung bei gleichzeitigem Anschalten der Absaugung bewirkte in der Regel eine weitere Zunahme des Abdichtwiderstandes. Häufig fand beim Abziehen der Pipette, unabhängig von der Zugrichtung, ein ungewolltes Schließen der Zellmembran dahingehend statt, dass ein sogenanntes Vesikel entstand. Dieses verhinderte den gewünschten freien Zugang zur zytoplasmatischen Seite, weswegen dieses Vesikel wieder geöffnet werden musste, was sich beispielsweise durch einen sehr kurzen Luftkontakt

der Pipette bewirken ließ. Das Vorhandensein eines *inside-out* Patches konnte am einfachsten durch die kurzzeitige Applikation einer Badlösung, die die endogenen, calciumaktivierten Chloridkanäle öffnete, überprüft werden. Anschließend begann die eigentliche Messung, wobei die Aufzeichnung sowohl durch einen angeschlossenen x-t-Schreiber, als auch einen einfachen Computer erfolgte, der über einen A/D-Wandler verfügte und kontinuierlich die Messdaten mit geringer Samplingrate (50 Hz, Filterfrequenz 20 Hz) aufzeichnete. Zusätzlich wurde ein weiterer Computer verwendet, der über die Steuerungssoftware verfügte und vor allem für die Erzeugung der Spannungspulse und der resultierenden Stromantworten verwendet wurde. Die Filterfrequenz der mit ClampEx erhaltenen Daten variierte zwischen 50 Hz und 1 kHz, wobei darauf geachtet wurde, dass die Aufnahmefrequenz minimal 2,5fach höher als die Filterfrequenz war, um Aliasingeffekte zu vermeiden.

## **2.6 Weitere Methoden**

### **2.6.1 Luciferase-Assay**

Ein großer Teil der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse befasste sich mit konzentrationsabhängigen Effekten von ATP und ATP-Analoga. Um ATP-Konzentrationen in den verschiedenen Lösungen exemplarisch bestimmen zu können, wurde ein Luciferase-Test verwendet. Hierbei wird das Benzothiazolderivat Luciferin mit MgATP adenyliert und unter Verbrauch von Luftsauerstoff durch das Enzym Luciferase (aus der amerikanischen Feuerfliege) oxidiert. Das oxidierte Luciferin emittiert nun grünes Licht (Maximum bei 562 nm), welches mit Hilfe eines Luminometers detektiert werden kann, wobei die Lichtintensität proportional zu der anwesenden ATP-Menge ist und somit ist die jeweilige ATP-Konzentration unter Verwendung von Eichgeraden bestimmbar.

### **2.6.2 Atom-Absorptions-Spektroskopie**

Diese Methode diente in der vorliegenden Arbeit lediglich zur Überprüfung des Magnesiumgehaltes der verwendeten Lösungen. Aus diesem Grund wird hier auf eine Beschreibung der Methodik verzichtet. Die interessierende Lösung wurde

gegebenenfalls soweit verdünnt, dass die Absorption in dem Bereich der zuvor aufgenommenen Eichgerade lag. Somit konnte die Magnesiumkonzentrationsbestimmung unter Verwendung der Steigung der Eichgerade erfolgen.

### 2.6.3 Mutagenese und Transformation

Die Herstellung der D1370N-Mutante erfolgte unter Verwendung des "Site directed Mutagenesis Kits"© von Stratagene, nachfolgender Transformation geeigneter Bakterienstämme und abschließender Herstellung von cRNA. Vorhergehende Experimente mit Hilfe der so genannten "Overlap-Extension PCR" hatten aufgrund von Problemen mit der Ligation der erzeugten DNA in das Plasmid nicht zu dem gewünschten Produkt geführt. Gemäß der Vorschrift wurde zunächst der Vektor (pSP64), der das CFTR-Wildtyp-Gen enthielt, zusammen mit zwei Oligonukleotidprimern in dem Reaktionsansatz eingesetzt.

#### **Ansatz:**

1µl DNA (pSP64 mit CFTR-Wildtypgen)

5 µl reaction buffer

1 µl Primer 1 (10 µM)

(5'- GTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCGGCTTAATCAACCCAGTG-3')

1 µl Primer 2 (10 µM)

(5'-CACTGGGTTGATTAAGCCGCAAGATCTTCGCCTTACTGAGAAC-3')

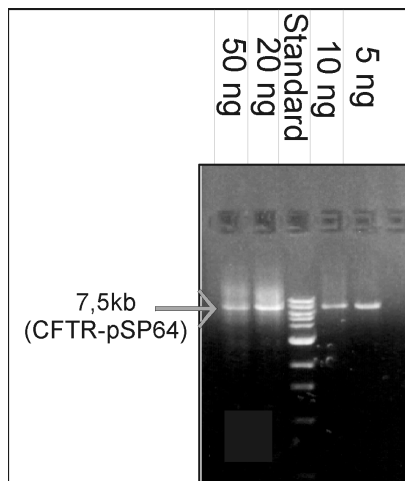
1 µl dNTP-Mix (500 µM)

+ 41 µl H<sub>2</sub>O

+ 1 µl PfuTurbo© Polymerase

#### **PCR-Protokoll:**

Segment	Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	30 sec
2	17	95°C	30 sec
		55°C	1 min
		68°C	15 min

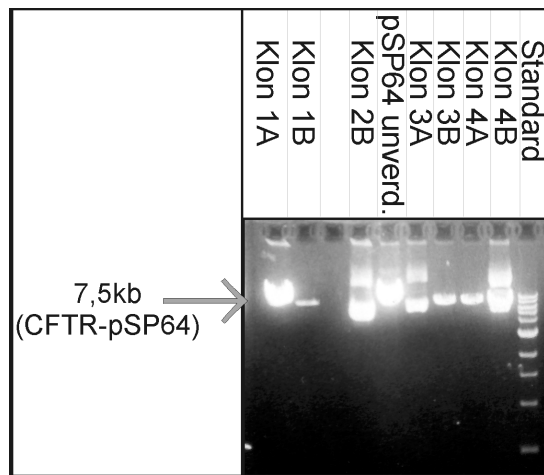


**Abb. 2.6-1 Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Produkte**

Die Mengenangaben beziehen sich auf die eingesetzte Plasmidmenge, die Produktbande liegt bei ca. 7,5 kb

Die beiden Polynukleotide waren jeweils komplementär zu den gegenüberliegenden Strängen des Vektors und beinhalteten die Region, die für das Aspartat 1370 kodierte, wobei das in dem Basentriplett enthaltene Guanin des kodierenden Stranges an Position 4128 durch Adenin ersetzt worden war, so dass dieses Triplett für ein Asparagin kodierte. Die Primer werden in dem ersten Zyklus von der Pfu Polymerase verlängert, so dass Tochterstränge mit der gewünschten Mutation entstehen. Durch einen Verdau mit der Endonuclease Dpn I, die für methylierte DNA spezifisch ist und deswegen nur die Eltern-DNA abbaut, stand für die nachfolgenden Amplifikationszyklen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion nur die mutierte DNA als Template zur Verfügung. Mit der so erzeugten DNA (Abb. 2.6-1) konnte nun die Transformation erfolgen.

Zur Transformation wurden die superkompetenten E.Coli Zellen (*Epicurian Coli XLI-Blue*) mit der DNA vermischt und durch kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42°C wurde die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen induziert. Anhand der durch das Plasmid vermittelten Ampicillinresistenz konnten nur die transformierten Klone auf dem mit Ampicillin hergestellten LB-Medium anwachsen. Von den gewachsenen Klonen wurden drei ausgewählt und einer Minipräparation unterzogen. Hierfür wurden die jeweiligen über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen aufgeschlossen und die DNA mit Isopropanol gefällt und gewaschen (Genomed Kit©). Die aufgereinigte DNA einem Kontrollverdau mit NcoI unterzogen, auf ein Agarosegel aufgetragen und hinsichtlich des Bandenmusters mit verschiedenen Kontrollen verglichen (Abb. 2.6-2).



**Abb. 2.6-2: Agarosegel der NcoI-verdauten DNA nach der Transformation** Aufgetragen sind zusätzlich Standard und das ungeschnittene Plasmid pSP64.

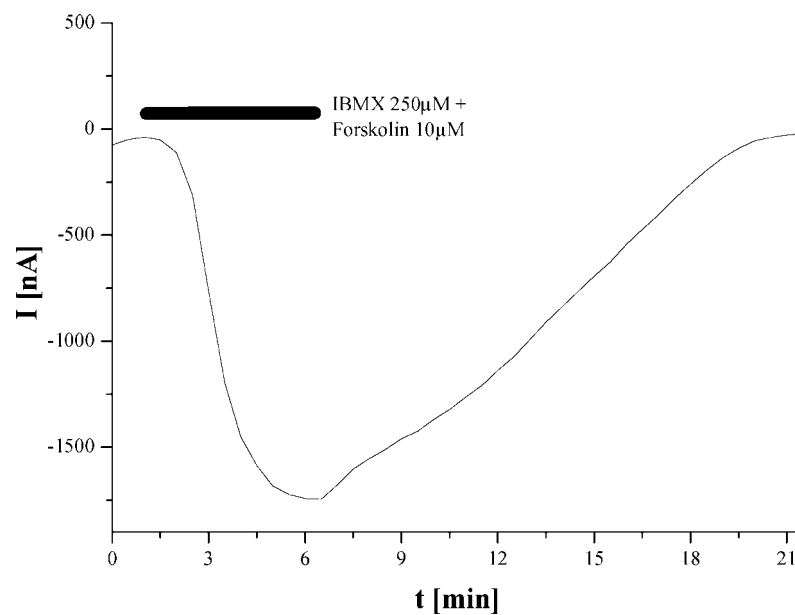
Danach wurden die Klone 1B; 3B und 4A ausgewählt und eine Midipräparation (gleiche Vorgehensweise wie bei der Minipräparation) mit dem entsprechenden Kit von Genomed durchgeführt. Ein Teil der so hergestellten DNA wurde zur Sequenzierung eingeschickt, die eine Einführung der Mutation bestätigte und keine ungewünschten Mutationen in dem sequenzierten Bereich zeigte. Somit konnte anschließend die RNA-Synthese durchgeführt werden. Hierfür wurde das mMessage mMachine Kit© von Ambion genutzt. Für diese *in vitro* Reaktion musste die DNA zunächst linearisiert (mit SAP1) und aufgereinigt werden. Anschließend wurde gemäß der Anleitung ein Ansatz mit Desoxynukleotiden, Reaktionspuffer, aufgereinigter DNA und RNA-Polymerase vorbereitet und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reinheit und die Konzentration der synthetisierten RNA (0,9 µg/µl) wurde abschließend mit Hilfe eines Photometers und durch ein Agarosegel überprüft. Die RNA konnte nun den Oozyten injiziert werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Grundlagen der CFTR-Charakterisierung

#### 3.1.1 Aktivierung im Zwei-Elektroden-Voltage-clamp

Für die Aktivierung des CFTR ist die Phosphorylierung eine notwendige Voraussetzung. Aus diesem Grund war es erforderlich, zu Beginn der Ganzzellmessung die in der Oozyte vorhandenen Proteinkinasen zu stimulieren. Da die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) als wichtigste Kinase im Hinblick auf den CFTR gilt (u.a. [127]), erfolgte deren Aktivierung unter Verwendung der membrangängigen Substanzen IBMX und Forskolin [12, 34, 36].

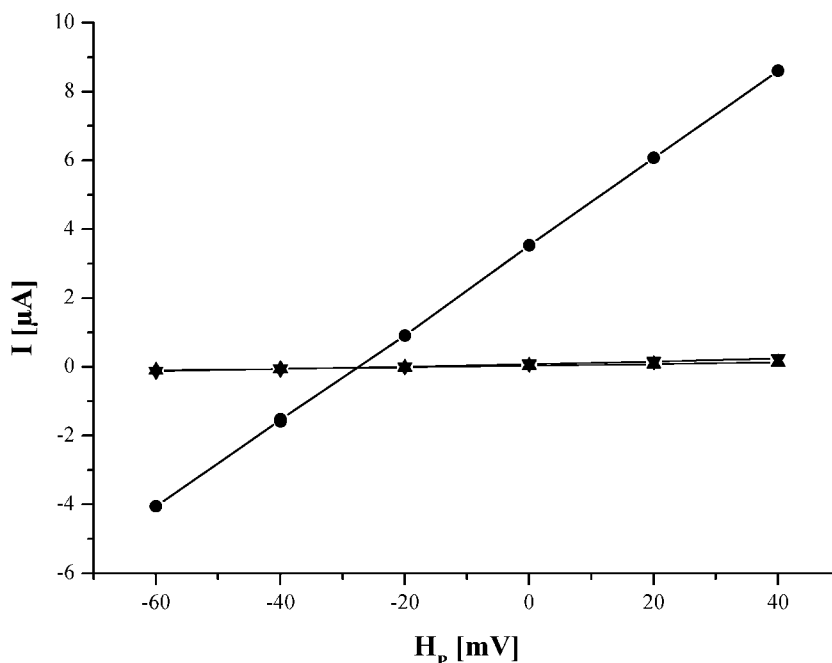


**Abb. 3.1-1: Aktivierung von CFTR im Voltage-clamp an der ganzen Oozyte**

Die Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  IBMX und 10  $\mu\text{M}$  Forskolin induzierte in CFTR-exprimierenden Zellen bei -40 mV einen deutlichen Chloridausstrom. Die Badlösung enthielt 124 mM Chlorid.

Bei den Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) erfolgte nach dem Einstecken der Elektroden und der Einstellung der Haltespannung auf -40 mV die Applikation der IBMX / Forskolin-haltigen Badlösung. Zumeist hatte sich das Membranruhepotenzial der Oozyten nach drei Tagen in Oozyten-Ringerlösung auf einen Wert von ca. -20 bis -40 mV eingestellt. Bei der üblichen

ionalen Zusammensetzung der Oozyte ( $[K^+] = 76-148 \text{ mM}$ ;  $[Na^+] = 4-23 \text{ mM}$ ;  $[Cl^-] = 24-62 \text{ mM}$ , [148]) war bei diesem Potenzial ein Chloridausstrom zu erwarten, was die Abb. 3.1-1 bestätigt. Aus der Abbildung lässt sich außerdem erkennen, dass der Prozess der Aktivierung in der ganzen Zelle langsam verlief, da erst nach ca. fünf Minuten ein Maximum des Stroms erreicht war, was vermutlich auf die indirekte Aktivierung über IBMX und Forskolin zurückzuführen ist. Weiterhin lief nicht nur die Aktivierung sehr langsam ab, auch die Inaktivierung nach IBMX / Forskolin-Wegnahme war bei einem Großteil der Messungen erst nach 10 bis 20 Minuten abgeschlossen. In 3.4.1 werden Alternativen zur beschleunigten Aktivierung und Deaktivierung im Zwei-Elektroden-Voltage-clamp Experiment vorgestellt.



**Abb. 3.1-2: Strom-Spannungskennlinie im Voltage-clamp**

die Kennlinie mit (▲) ist vor der CFTR-Aktivierung, die mit (▼) danach und die Kennlinie mit (●) während der Zugabe von IBMX/Forskolin bestimmt worden. Die Badlösung enthielt 124 mM Chlorid. Die Leitfähigkeit nahm bei CFTR-Aktivierung von 2 µS auf 126 µS zu.

Die Spannungsabhängigkeit der gemessenen Ströme war ein weiterer Beleg, dass es sich bei den beobachteten Signalen um CFTR-vermittelte Chloridströme handelte. In Abb. 3.1-2 sind die Strom-Spannungskennlinien vor, während und nach der Aktivierung durch IBMX / Forskolin im TEVC gezeigt. Der Strom war über den gesamten dargestellten Bereich linear von der Haltespannung abhängig. Unter Berücksichtigung des Umkehrpotenzials von -25,5 mV würde sich, unter der Annahme einer



reinen Chloridleitfähigkeit, eine intrazelluläre Chloridkonzentration von 46 mM ergeben, was unter Berücksichtigung der mehrtägigen Lagerung in einer Lösung mit 124 mM Chlorid, mit den Angaben in der Literatur übereinstimmt [148].

### 3.1.2 Abschätzung der CFTR-Expression in *Xenopus*-Oozyten

Voraussetzung für alle Patch-clamp-Messungen war die Expression einer ausreichenden Anzahl von CFTR-Chloridkanälen in der Plasmamembran der untersuchten Oozyten und soll aus diesem Grund nachfolgend belegt werden. Stark vereinfacht ließ sich die zu erwartende Chloridleitfähigkeit im Patch-clamp-Experiment aus den TEVC-Messungen abschätzen. Hierzu war die Gesamtleitfähigkeit der Zelle bei Aktivierung des CFTR in Beziehung zur Zelloberfläche zu setzen und anschließend auf die geschätzte Größe eines isolierten Makropatches umzurechnen. Die Leitfähigkeit im TEVC nach Aktivierung des CFTR betrug für die unter Abb. 3.1-1 abgebildete Messung 126  $\mu\text{S}$ ; die basale Membranleitfähigkeit vor und nach Aktivierung ca. 2  $\mu\text{S}$ . Da diese unspezifische Leitfähigkeit als Maß für die Integrität der Oozytenmembran gelten konnte und Werte von mehr als 10  $\mu\text{S}$  darauf schließen ließen, dass die Zelle nicht mehr intakt war, wurden nur solche Zellen zur Auswertung verwendet, deren endogene Leitfähigkeiten weniger als 5  $\mu\text{S}$  betragen.

Unter Anwendung geeigneter Spannungsprotokolle [150] ließ sich die durchschnittliche Membrankapazität zu 220 nF (bei einer Oozyte mit einem Durchmesser von 1,2 mm) bestimmen. Bei diesen Protokollen konnte der kapazitive Anteil eines Stroms von dem resistiven Anteil unterschieden werden. Da die Membrankapazität direkt abhängig von der Membranoberfläche ist, konnte hieraus, unter der Annahme der für biologische Membranen üblichen spezifischen Kapazität von 1  $\mu\text{F} / \text{cm}^2$ , eine durchschnittliche Membranoberfläche von 22,5  $\text{mm}^2$  bestimmt werden. Die Diskrepanz zu der, aufgrund des Zelldurchmessers zu erwartenden Oberfläche ( $8 \cdot \pi \cdot r^3 = 5,4 \text{ mm}^2$ ), wies auf zahlreiche Membraneinfaltungen hin [91], die aber bei der Oberflächenabschätzung des isolierten Makropatches unberücksichtigt blieben. Da der übliche Durchmesser der in dieser Arbeit verwendeten Patchpipetten 18  $\mu\text{m}$  betrug, errechnete sich die durchschnittliche Patchoberfläche zu 508  $\mu\text{m}^2$  (Annahme einer Halbkugel-Oberfläche). Anschließend wurde das Verhältnis aus Zelloberfläche

(22,5 mm<sup>2</sup>) und Gesamtzelleitfähigkeit (126 μS) in Beziehung zur Patchoberfläche gesetzt, um die Anzahl der im Patch vorhandenen Kanälen abschätzen zu können:

$$\text{Leitfähigkeit im Patch: } g_{\text{Patch}} = \frac{g_{\text{gesamt}} * A_{\text{Patch}}}{A_{\text{gesamt}}} = \frac{126 \mu\text{S} * 508 \mu\text{m}^2}{23 \text{mm}^2} = 2,8 \text{ nS}$$

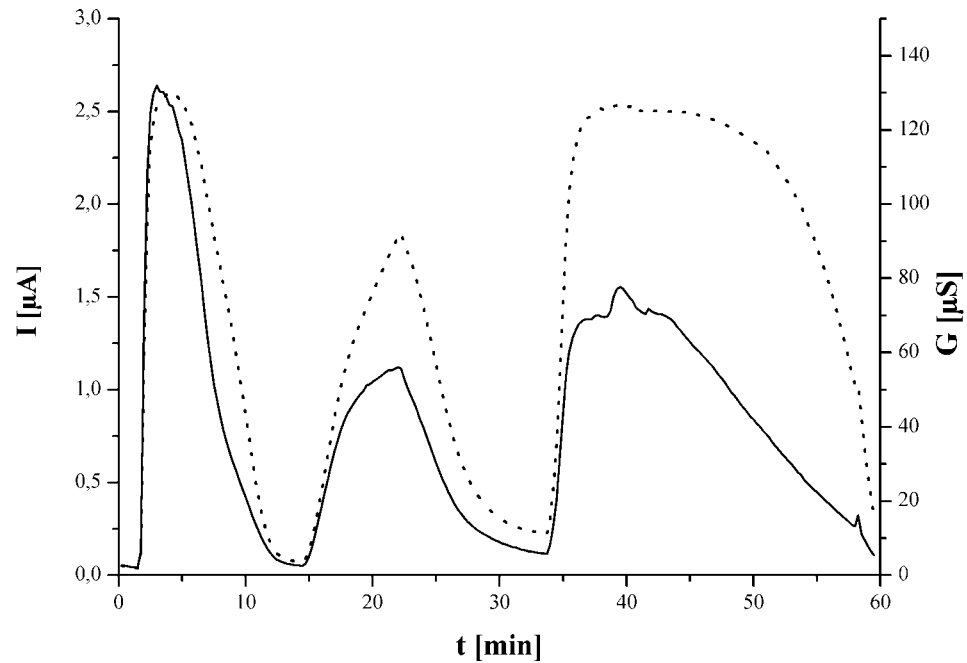
Dies ergab eine durchschnittlich zu erwartende Gesamtleitfähigkeit im Patch von ca. 2,8 nS. Bei der angegebenen Ganzzellfähigkeit von 126 μS muss berücksichtigt werden, dass dieser Wert durch den Serienwiderstand des Voltage-clamp-Setups limitiert sein kann, wenn, wie es bei der gezeigten Messung der Fall war, nur eine Referenzelektrode verwendet wird [99]. Für eine Abschätzung kann dies jedoch vernachlässigt werden. Die Einzelkanalleitfähigkeit des CFTR beträgt zwischen 5-10 pS [51, 52, 135, 137]. Da Leitfähigkeiten additiv sind, berechnet sich die Anzahl der im Patch zu erwartenden aktivierten CFTR-Moleküle zu

$$N = \frac{g_{\text{Patch}}}{g_{\text{Einzelkanal}}} = \frac{2,8 \text{ nS}}{5 \text{ pS}} = 560.$$

Die tatsächlich vorhandene Zahl an Kanälen in einem Patch muss aber erheblich größer gewesen sein, da weder unter den Bedingungen der Ganzzellmessung im Voltage-clamp, noch im isolierten Makropatch, die Mehrzahl der Kanäle geöffnet waren [13, 137]. Dieser Parameter wird durch die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_O$ ) berücksichtigt, er gibt das Verhältnis an offenen Kanälen im Vergleich zur Gesamtzahl der vorhandenen Kanälen an. Aus Einzelkanalmessungen wurde dieser Wert für den partiell phosphorylierten CFTR mit  $P_O = 0,2 - 0,5$  abgeschätzt [28, 43, 134], was eine doppelte bis fünffache Zahl an Kanälen im Vergleich zu der errechneten Anzahl in diesem Membranareal ergibt.

### 3.1.3 Verschiebung des Umkehrpotenzials

Im Gegensatz zu sekundär aktiven Transportern, die Leitfähigkeiten von weniger als 10 μS aufweisen, muss bei Ganzzellmessungen mit dem CFTR (Leitfähigkeiten über 100 μS) beachtet werden, dass bei längeren Messungen im TEVC deutliche Änderungen der intrazellulären Chloridkonzentration auftreten, sofern nicht sehr nahe dem Umkehrpotenzial gemessen wird. Dies konnte experimentell folgendermaßen gezeigt werden:



**Abb. 3.1-3 Abnahme des Chloridstroms aufgrund der Abnahme von  $[Cl^-]_{intrazellulär}$**   
 Dargestellt sind die gemessenen Ströme bei  $-40$  mV (schmale durchgezogene Linie) im Vergleich zu der zeitgleich ermittelten Leitfähigkeit (gestrichelt, bestimmt aus linearem IV-Bereich) bei wiederholter CFTR-Stimulierung.

Über einen Messzeitraum von 40 Minuten wurden die CFTR-Kanäle dreimal aktiviert und anschließend deaktiviert (durch Stimulierung der endogenen Proteinkinasen), wobei in regelmäßigen Abständen (15 Sekunden) unterschiedliche Haltespannungen angelegt wurden, woraus die jeweilige Leitfähigkeit bestimmt wurde. Zwischen diesen Spannungspulsen betrug die Haltespannung  $-40$  mV. Die Abb. 3.1-3 zeigt, dass die maximale Leitfähigkeit bei Aktivierung des CFTR im Gegensatz zur Stromamplitude im Verlauf der Messung nicht abnahm. Aus den Strom-Spannungskennlinien zu Beginn und am Ende der Messung konnten Umkehrpotenziale von  $-20$  mV bzw.  $-28$  mV bestimmt werden. Unter der Annahme einer reinen Chloridleitfähigkeit, ergab dies eine Abnahme der intrazellulären Chloridkonzentration von anfänglich  $58$  mM zu  $41$  mM nach 40 Minuten. Aus dieser Chloridverarmung resultierte ein verringerter elektrochemischer Gradient, was die Ursache für die beobachtete Stromabnahme bei dem Haltepotenzial von  $-40$  mV war.

Dies konnte auch rechnerisch bestätigt werden: Da die Anzahl an verschobenen Ladungen  $\Delta Q$  sich aus dem Produkt des gemessenen Stroms  $I$  und der Dauer  $t$  dieses Stromflusses ergibt ( $\Delta Q = I \cdot t$ ), konnte unter Verwendung der Abb. 3.1-3 aus dem

Flächenintegral die in 40 Minuten verschobenen Ladungen zu  $1,81 \cdot 10^{-3} \text{C}$  bestimmt werden:

Mit  $N = Q/F$  ( $F = \text{Faradaykonstante} = 96485 \text{ [C/mol]}$ )

ergab sich die Zahl der verschobenen Chloridionen zu  $N = 1,88 \cdot 10^{-8} \text{ Mol}$ .

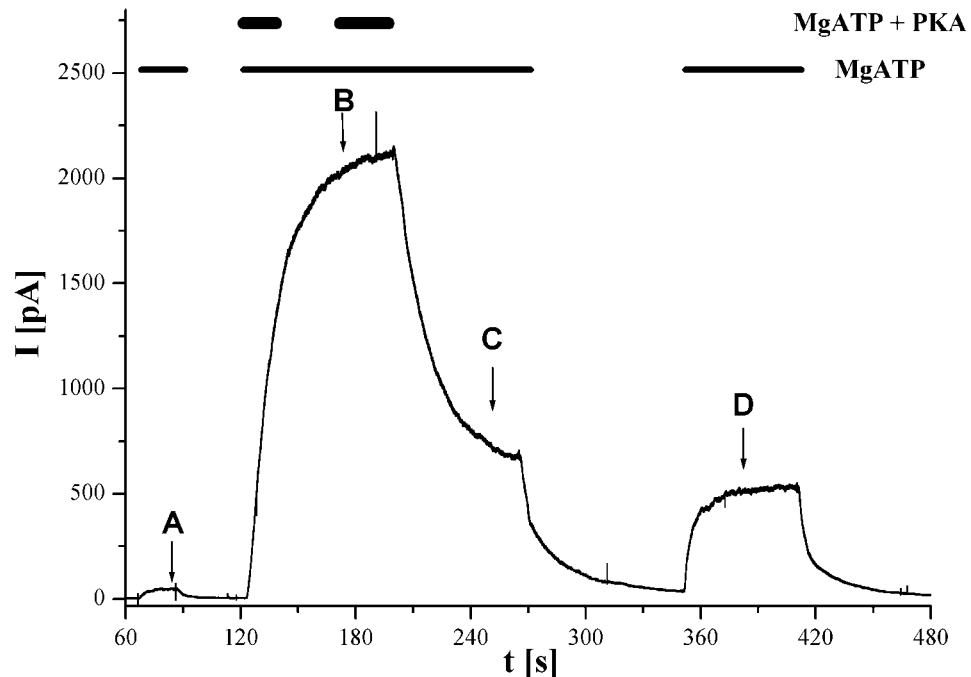
Unter der Annahme eines Oozytendurchmessers von 1,2 mm, ergab sich ein Zellvolumen von 1  $\mu\text{l}$ . Die Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration berechnete sich demnach zu 18,8 mM, ein Wert, der den, mit Hilfe der Umkehrpotenziale errechneten, bestätigt.

Bei dieser Abschätzung wurde nicht berücksichtigt, dass bei einer Spannungsklemme der Fluss von Anionen aus der Zelle dadurch kompensiert wird, dass aus der Stromelektrode Chloridionen in die Zelle strömen und gleichzeitig Kaliumionen in die Elektrode diffundieren können. Daraus folgt, dass der Strom nur anteilig von Chloridionen getragen wird, während der andere Teil (aufgrund der vergleichbaren Ionenbeweglichkeiten von  $\text{K}^+$  ( $73,5 \text{ } \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) und  $\text{Cl}^-$  ( $76,3 \text{ } \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) etwa im Verhältnis 1/1) durch den Kaliumfluss in die Elektrode verursacht wird. Die Beobachtung, dass die aus den Strömen errechnete Chloridverarmung mit der aus den Umkehrpotenzialen bestimmten übereinstimmt, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die gemessenen Ströme zu niedrig waren (vgl. 1.8.1 und 4.6) und daher den vernachlässigten Kaliumfluss zufällig kompensierte. Die eindeutig beobachtete Verschiebung des Umkehrpotenzials (bei ausschließlicher Aktivierung der CFTR-Chloridleitfähigkeit) belegt jedoch, dass, wenn vermutlich auch nicht in der berechneten Größenordnung, eine Chloridverarmung der Zelle bei TEVC-Messungen auftrat.

## 3.2 Grundlagen der Patch-clamp-Messung

### 3.2.1 CFTR-Phosphorylierung im isolierten Makropatch

In den Ganzzellmessungen war es möglich, die für die Aktivierung notwendige Phosphorylierung des CFTR durch Stimulierung der endogenen Proteinkinasen zu bewirken. Diese Kinasen sind in *Xenopus*-Oozyten überwiegend löslich im Zytosol lokalisiert und gehen daher bei dem Abziehen des Patches von der Zelle verloren. Somit war es für die Messungen an isolierten Makropatches nötig, die Kanäle durch Zugabe exogener Kinasen zu aktivieren. Wie bei [137] beschrieben, kann hierfür die gereinigte katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) verwendet werden.

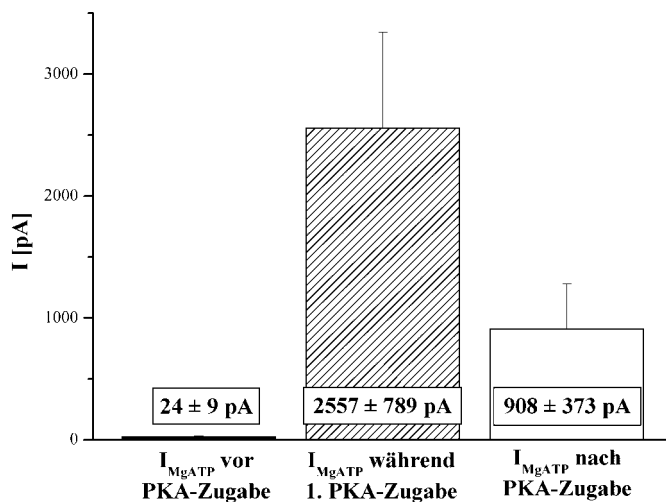


**Abb. 3.2-1 Aktivierung von CFTR im isolierten Makropatch:**

Vor der PKA-Zugabe (100 u/ml) war der Strom mit 500  $\mu$ M MgATP gering (A), hingegen während (B) und nach der PKA-Zugabe (C)+(D) deutlich erhöht. Die Messung erfolgte, wie alle im Folgenden gezeigten Experimente (sofern nicht anders angegeben) bei 0 mV und 4 mM Chlorid in der Badlösung und 156 mM Chlorid in der Pipette (37,5-facher Chloridgradient).

Sowohl für das Öffnen der CFTR-Chloridkanäle, als auch für die Kinaseaktivität der PKA, ist MgATP nötig ([13, 156], vergleiche aber 3.6.1). Daher wurde dieses in einer Konzentration von 500  $\mu$ M eingesetzt, was sowohl für die PKA ( $K_M = 3-10 \mu$ M, [42, 88]), als auch den CFTR ( $K_M \approx 75 \mu$ M, 3.3.6) sättigend war. Die Applikation

von PKA zusammen mit MgATP rief unter Standardbedingungen (0 mV; 40-facher Chloridgradient, 19-23°C) einen Strom (Pfeil B) von durchschnittlich 2500 pA ( $n = 32$ ) hervor, wobei eine sehr große Streuung (5 pA bis >20 nA) zu beobachten war. Dieser Strom nahm bei PKA-Entzug (Pfeil C) zwar deutlich ab, war allerdings nach wie vor erheblich größer, als der vor PKA-Zugabe durch MgATP allein induzierte Strom, der sich auf ca. 24 pA belief. Das geringe Signal zu Beginn (Pfeil A) lässt sich mit der Kinaseaktivität in der zuvor noch intakten Oozyte erklären. In Zellen, die keinen CFTR exprimieren, konnten, weder durch MgATP noch durch PKA Ströme induziert werden. In Abb. 3.2-2 sind die durchschnittlichen Chloridströme gezeigt, die vor, während und nach der Zugabe von PKA durch Perfusion mit MgATP bei CFTR exprimierenden Oozyten hervorgerufen wurden.



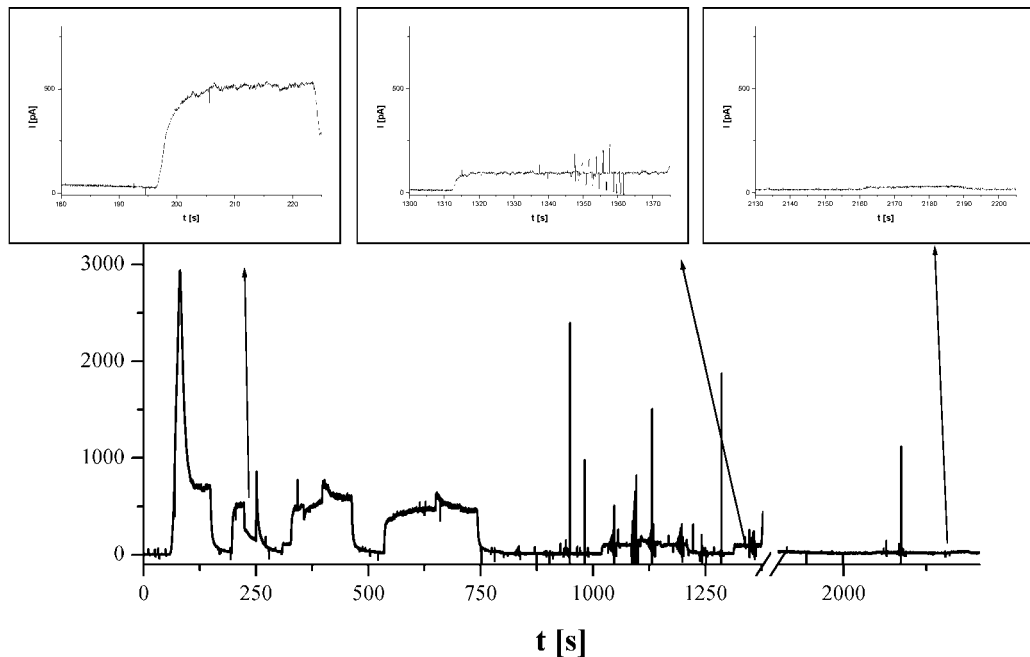
**Abb. 3.2-2 Durchschnittliche Chloridströme bei PKA-Zugabe**

Gezeigt sind die mittleren durch MgATP hervorgerufenen Ströme vor der Zugabe von löslicher PKA, während der erstmaligen PKA-Perfusion und bei erneuter alleiniger MgATP-Applikation ( $n=32$ ).

Der deutliche Signalrückgang bei PKA-Entzug ist vermutlich auf die sofort einsetzende partielle Dephosphorylierung des CFTR zurückzuführen, welche zumindest anteilig von membrangebundenen - und somit auch im isolierten Patch präsenten - Proteinphosphatasen bewirkt wird ([86], 1.6.3). Nach der Phosphorylierung genügte die Zugabe von MgATP, um die präphosphorylierten Kanäle zu öffnen. Die einmalige PKA-Zugabe zu Beginn eines Makropatchexperimentes war in den meisten Fällen ausreichend, um nachfolgend über einen langen Zeitraum, im Einzelfall bis zu 2 Stunden, durch die Perfusion mit einer MgATP-haltigen Badlösung Ströme hervorzurufen. Die im Messverlauf zu beobachtenden Änderungen, sowohl in der Signalamplitude, als auch in der Kinetik, werden zumindest anteilig durch die fortschreitende Dephosphorylierung bewirkt (3.3.4, [150]).

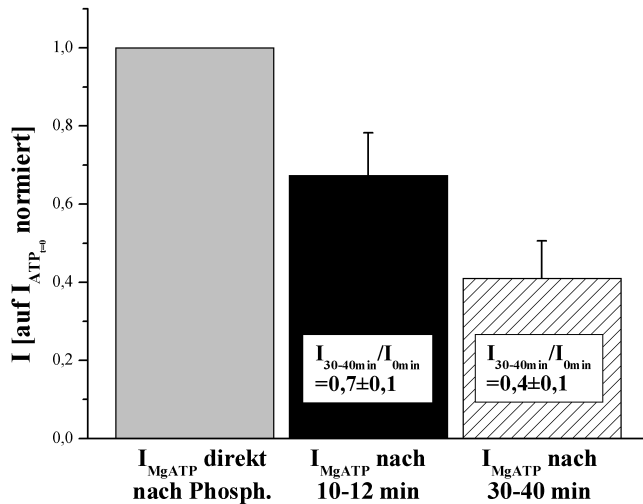
### 3.2.2 Rundown

Ein Problem im Zusammenhang mit elektrophysiologischen Messungen am CFTR, aber auch bei anderen Ionenkanälen, ist das Auftreten einer zeitabhängigen Signalabnahme im Verlauf der Messung, ein Phänomen, welches als "Rundown" bezeichnet wird (Abb. 3.2-3) [16, 17, 39, 85].



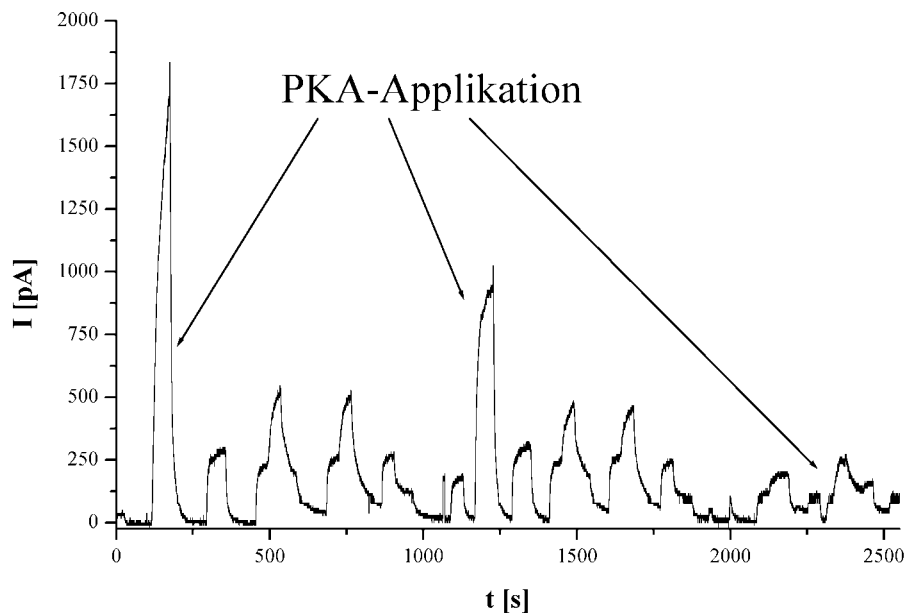
**Abb. 3.2-3 Zeitabhängige Abnahme des MgATP-vermittelten Chloridstroms**  
Gezeigt sind die durch 500  $\mu$ M MgATP hervorgerufenen Ströme ca. 3 Minuten (oben links), 22 min (oben Mitte) und 36 min (o.r.) nach der Phosphorylierung durch PKA kat. Untereinheit (100 u/ml).

Wurde das durch MgATP hervorgerufene Signal, welches direkt nach der ersten PKA-Zugabe gemessen wurde, mit dem 10 Minuten später bestimmten verglichen, so zeigte sich eine durchschnittlich 30 %ige Stromabnahme, weitere 20-30 Minuten später war dieser Strom auf etwa 40 % des ursprünglichen abgefallen (Abb. 3.2-3). Dieser Rundown variierte stark, so dass in einigen Messungen keine Signalverringering beobachtet werden konnte, bei anderen hingegen schon nach wenigen Minuten der CFTR-abhängige Strom auf ein Drittel gesunken war. Bislang konnte die Ursache dieses Rundowns noch nicht eindeutig geklärt werden, er wurde von verschiedenen Autoren aber vorwiegend auf die Aktivität endogener Proteinphosphatasen (PP2A, PP2B, PP2C) zurückgeführt [41, 46, 85, 86, 128, 140, 166]. In Makropatchmessungen konnte eine erneute PKA-Zugabe den beobachteten Signalverlust nicht kompensieren (Abb. 3.2-5).



**Abb. 3.2-4 Rundown der präphosphorylierten CFTR-Chloridkanäle**

Die Kanäle wurden zu Messbeginn ein Mal mit PKA kat. Untereinheit phosphoryliert.



**Abb. 3.2-5 Einfluss der PKA auf den Rundown**

Die Pfeile bezeichnen die jeweilige Zugabe von 100 u/ml PKA kat. UE zu Lösungen mit 500  $\mu\text{M}$  MgATP zu verschiedenen Messzeitpunkten

Unter den Bedingungen des isolierten Makropatches konnte F. Weinreich keine Beeinflussung des CFTR-Stroms durch PP2A-Inhibitoren feststellen [150]. Darüber hinaus zeigten Messungen von Zhu et al., dass vermutlich die PP2C den Großteil der Dephosphorylierung des CFTR bewirkt [166]. Patch-clamp-Messungen mit Badlösungen, die die Chelatoren EDTA bzw. CDTA enthielten, so dass die für Phosphataseaktivität erforderliche Mg-Konzentration ( $\sim 1\text{ mM}$ ; [86]) deutlich unterschritten wurde, zeigten nach wie vor einen Rundown des CFTR-Signals (nicht gezeigt). Der Rundown trat nur geringfügig auf, während die Kanäle durch MgATP geöffnet waren (nicht gezeigt).



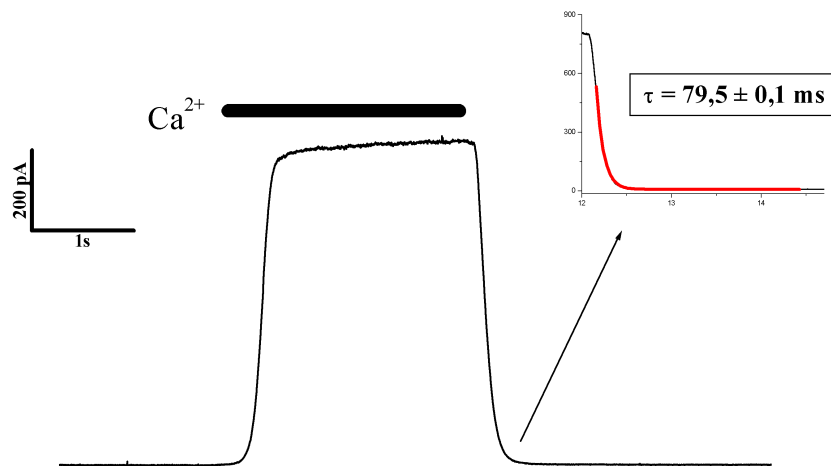
### 3.2.3 Grundlagen der Kinetik des CFTR

Um kinetische Aussagen auf Grundlage des schnellen Austauschs der Badlösung und der dadurch verursachten Gleichgewichtsstörungen treffen zu können, musste gewährleistet sein, dass der Austausch der Lösungen in der Messkammer so schnell verlief, dass dieser nicht limitierend für die beobachteten Änderungen war. Dieses wurde durch zwei unterschiedliche Methoden überprüft, die im Folgenden vorgestellt werden.

### 3.2.4 Calcium-aktivierte Chloridkanäle

Neben zahlreichen anderen Leitfähigkeiten [148] befinden sich auch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle in der Oozytenmembran [93]. Da Calcium in den Badlösungen nicht vorhanden war, störten diese Kanäle die Makropatchmessungen nicht. Sie konnten stattdessen, sowohl zur Bestimmung der Lösungswechselgeschwindigkeit [151], als auch zur Überprüfung der Orientierung des isolierten Patches genutzt werden. Wie unter 2.3.3 beschrieben, entstanden beim Abziehen der Patchpipette von der Membran häufig Vesikel, die keinen Zugang zur intrazellulären Seite des Patches ermöglichten. Somit konnte der Badlösung zugegebenes Calcium nicht an die zytosolisch lokalisierten Bindestellen gelangen, da es die Membran nicht permeieren konnte. Aus diesem Grund konnte in dieser Konfiguration keine Aktivierung der calciumaktivierten Chloridkanäle erfolgen (nicht gezeigt). Erst, wenn nach Durchbrechen des Vesikels und Bildung des *inside-out* Patches die zytosolische Seite wieder zugänglich war, erfolgte bei Calciumapplikation die Aktivierung dieser Kanäle (Abb. 3.2-6). Die Bindung und Abdissoziation des Calciums findet sehr schnell, d.h. in einem Zeitbereich von wenigen Millisekunden (A. Haase, persönliche Mitteilung) statt.

Aus diesem Grund konnte aus dem Signlrückgang bei Calciumwegnahme auf die minimale Lösungswechselgeschwindigkeit geschlossen werden. Da die untersuchten Öffnungs- und Schließvorgänge des CFTR im Sekundenbereich (s. 3.2.6) erfolgen, waren die beobachteten Lösungswechsel mit Zeitkonstanten im Bereich von durchschnittlich 50-350 ms ausreichend schnell. Bei Messungen, in denen lediglich stationäre Ströme untersucht wurden, wurde der Lösungswechseldurchfluss reduziert, um den Lösungsverbrauch zu vermindern und eine erhöhte Lebensdauer des Patches zu bewirken.

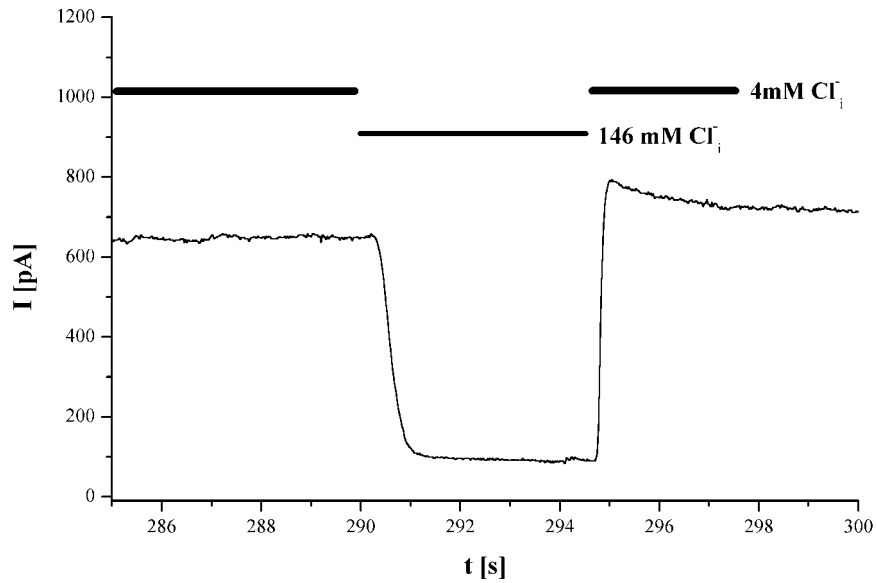


**Abb. 3.2-6 Aktivierung der endogenen Chloridkanäle durch Calciumzugabe**  
 Der Wechsel zu einer Lösung mit ca. 2 mM freiem  $\text{Ca}^{2+}$  rief einen reversiblen Chlorideinstrom hervor, der vollständig reversibel war. Oben rechts ist die monoexponentielle Anpassung (rot) des Schließvorgangs bei Ca-Entzug gezeigt ( $\tau=79,5 \text{ ms}$ ).

### 3.2.5 Chloridkonzentrations sprünge bei aktiviertem CFTR

Neben dieser CFTR-unabhängigen Methode ist es auch möglich, den CFTR-Chloridkanal selbst zur Überprüfung des Lösungswechsels zu nutzen. Die beobachtete Stromänderung infolge einer Änderung des Chloridgradienten hängt bei offenen Ionenkanälen nur von der Geschwindigkeit des Lösungswechsels ab. Hierfür wurde zunächst (nach anfänglicher Phosphorylierung) von einer Badlösung mit 4 mM Chlorid und 500  $\mu\text{M}$  MgATP zu einer Lösung mit 146 mM Chlorid und ebenfalls 500  $\mu\text{M}$  MgATP gewechselt. Dies bewirkte eine rasche Signalabnahme. Der umgekehrte Wechsel sollte mit vergleichbarer Zeitkonstante zu dem ursprünglichen Strom führen. Wie in Abb. 3.2-7 gezeigt, überschritt der Strom jedoch kurzzeitig das zu erwartende Signal. Dieser transiente Strom wird unter 3.2.8 eingehender untersucht.

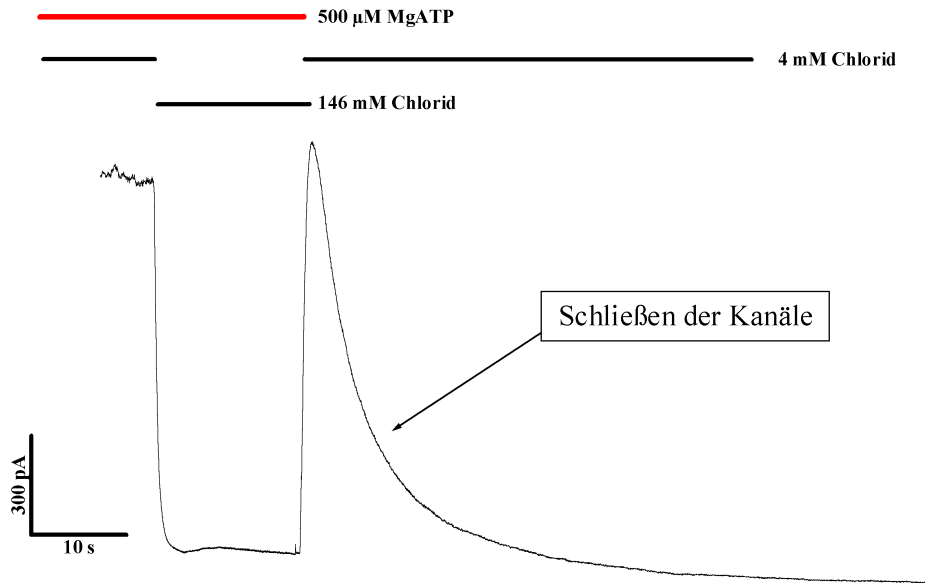
In einigen Messungen wurden die Zeitkonstanten sowohl mit Hilfe der Ca-aktivierten Chloridkanäle, als auch durch den oben beschriebenen Chloridkonzentrationsprung ermittelt, wobei eine Übereinstimmung festgestellt werden konnte. Als Alternative zu dem oben beschriebenen Wechsel wurde nach der Badlösung mit 146 mM Chlorid und MgATP auf die MgATP-freie Standardbadlösung mit 4 mM Chlorid umgeschaltet. Dieses ermöglichte die exakte Bestimmung der Schließkinetik bei ATP-Wegnahme.



**Abb. 3.2-7 Chloridkonzentrationsprung bei permanenter MgATP-Perfusion**

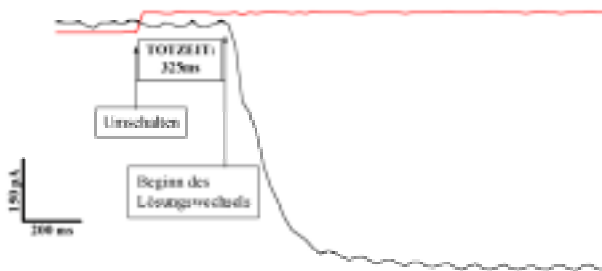
Sowohl bei Verringerung, als auch bei Wiederherstellung des Chloridgradienten, erfolgte eine schnelle Stromänderung. ( $[Cl^-]_{\text{Pipette}} = 156 \text{ mM}$ ;  $[Cl^-]_{\text{Bad}} = 4$  bzw.  $146 \text{ mM}$ ). Auffällig ist die kurzzeitige Überschreitung des vorherigen stationären Stroms bei Wiederherstellung des Chloridgradienten.

Weiterhin war es durch diese Chloridkonzentrationssprünge möglich, den Zeitraum zu bestimmen, der zwischen dem Umschalten der Ventile und dem Beginn der Änderung der Kammerlösung verging (Abb. 3.2-9). Diese wird als Systemzeit oder "Totzeit" bezeichnet. Die Totzeit ist vorwiegend von dem angelegten Druck abhängig, aber auch von der Bauweise der Messkammer, der Beschaffenheit und Länge der Schläuche, der Lösungszufuhr und anderen, messaufbauabhängigen Faktoren. Die Totzeit betrug zwischen 100 und 600 ms. Da eindeutig zwischen dieser "Totzeit" und dem Beginn des Lösungswechsels unterschieden werden konnte, beeinflusste sie die Interpretation der Kinetik der Öffnungs- und Schließvorgänge nicht.



**Abb. 3.2-8: Bestimmung der Geschwindigkeit des Lösungsaustauschs unter gleichzeitiger Wegnahme von Chlorid und ATP aus der Badlösung**

Die simultane Verringerung der Bad-Cl<sup>-</sup>-Konzentration auf 4 mM und des ATP auf 0 µM induzierte nach einer transienten Stromzunahme das Schließen der Kanäle.

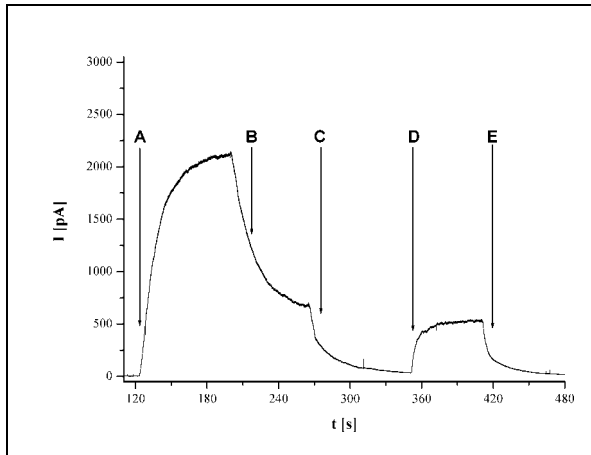


**Abb. 3.2-9 Bestimmung der Systemtotzeit**

Bei aktiviertem CFTR (kontinuierliche ATP-Perfusion) konnte aus der Zeit zwischen dem Umschalten der Ventile und dem Beginn der Stromänderung bei einem Cl<sup>-</sup>-Konzentrationswechsel die Totzeit der Messapparatur bestimmt werden.

### 3.2.6 Öffnungs- und Schließkinetik des PKA-aktivierten CFTR

In vorangegangenen Arbeiten ist bereits eingehend die Öffnungs- und Schließkinetik von CFTR-Kanälen, die mit löslicher PKA präphosphoryliert wurden, bei ATP-Zugabe bzw. Wegnahme charakterisiert worden [150, 151]. Zur kinetischen Auswertung der untersuchten Regulationsmechanismen des CFTR war im Rahmen dieser Arbeit eine Bestimmung dieser Parameter ebenfalls sinnvoll. Um die Zeitkonstanten des Öffnens und Schließens der Kanäle zu bestimmen, wurde, ebenso wie bei der Bestimmung der Lösungswechselgeschwindigkeit, von einem exponentiellen Stromverlauf ausgegangen. In Abb. 3.2-10 sind die im Folgenden untersuchten Lösungswechsel und die daraus resultierenden Stromänderungen markiert:



**Abb. 3.2-10: Überblick über die kinetisch charakterisierten Lösungswechsel**  
 Zunächst wurden die Kanäle mit PKA (100u/ml) und MgATP aktiviert und nachfolgend mit MgATP allein stimuliert.

Grundsätzlich war für alle Parameter des CFTR eine sehr große Varianz hinsichtlich der Zeitkonstanten zu beobachten. Für die erstmalige Phosphorylierung durch die lösliche PKA (**Pfeil A**, Abb. 3.2-10) variierten die ermittelten Zeitkonstanten zwischen 7,7 und 61 Sekunden. Da die durchschnittliche Zeitkonstante der Phosphorylierung 21 Sekunden betrug, hätte über einen Zeitraum von etwa 90 Sekunden PKA zugegeben werden müssen, um eine annähernde Sättigung des Signals zu erreichen. Wegen der geringen Mengen an verfügbarer PKA erfolgte die Zugabe häufig über einen kürzeren Zeitraum, so dass in den meisten Messungen eine maximale Aktivierung der CFTR-Chloridkanäle nicht wahrscheinlich war.

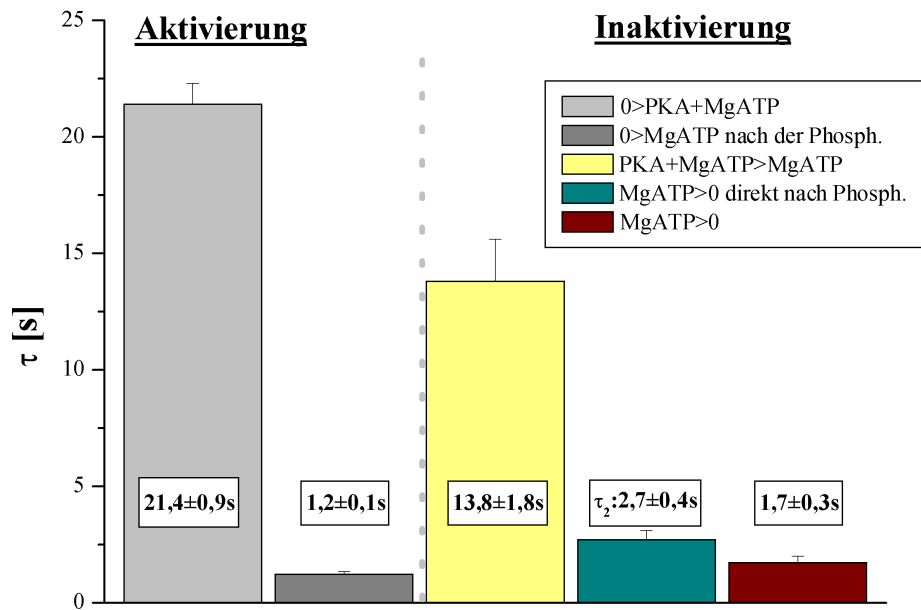
Während die Phosphorylierung der Kanäle in allen, hinsichtlich ihrer Kinetik ausgewerteten, Experimenten ( $n = 24$ ) mit einer monoexponentiellen Funktion hinreichend exakt beschrieben werden konnte, war für die Anpassung des Stromverlaufs bei Wegnahme der PKA (**Pfeil B**, Abb. 3.2-10) häufig (26 %) eine biexponentielle Funktion erforderlich. Für die Bestimmung der durchschnittlichen Relaxation wurden ausschließlich die monoexponentiellen Verläufe verwendet. Die so bestimmte Relaxationsrate von  $0,07 \text{ s}^{-1}$  kennzeichnet die, aufgrund der PKA-Wegnahme stattfindende partielle Dephosphorylierung. Von Hwang et al. wurde gezeigt, dass die Einzelkanalleitfähigkeit nicht durch den Phosphorylierungsgrad beeinflusst wird [66]. Somit musste die beobachtete Stromabnahme entweder durch eine geänderte Offenwahrscheinlichkeit oder die Änderung der Zahl an aktivierten CFTR-Molekülen verursacht sein.

Wurde im Anschluss an die PKA-Wegnahme auch das MgATP aus der Badlösung entfernt (**Pfeil C**, Abb. 3.2-10), so schlossen alle Kanäle, wobei der Zeitverlauf

dieses Schließvorgangs offenbar sowohl von der beschriebenen schnellen Dephosphorylierung nach dem PKA-Entzug, als auch von dem durch die ATP-Wegnahme hervorgerufenen Stromrückgang gekennzeichnet war. Dies führte dazu, dass diese frühe MgATP-Wegnahme in den meisten Messungen (ca. 70 %) mit einer biexponentiellen Funktion angepasst werden musste, die sich aus einer langsam relaxierenden ( $\tau_{1,\emptyset} = 30 \pm 4$  s) und einer schnellen Komponente ( $\tau_{2,\emptyset} = 2,7 \pm 0,4$  s) zusammensetzte, wobei das Amplitudenverhältnis dieser beiden Anteile sehr stark schwankte ( $A_1/A_2 = 0,24-5$ ,  $n=23$ ).

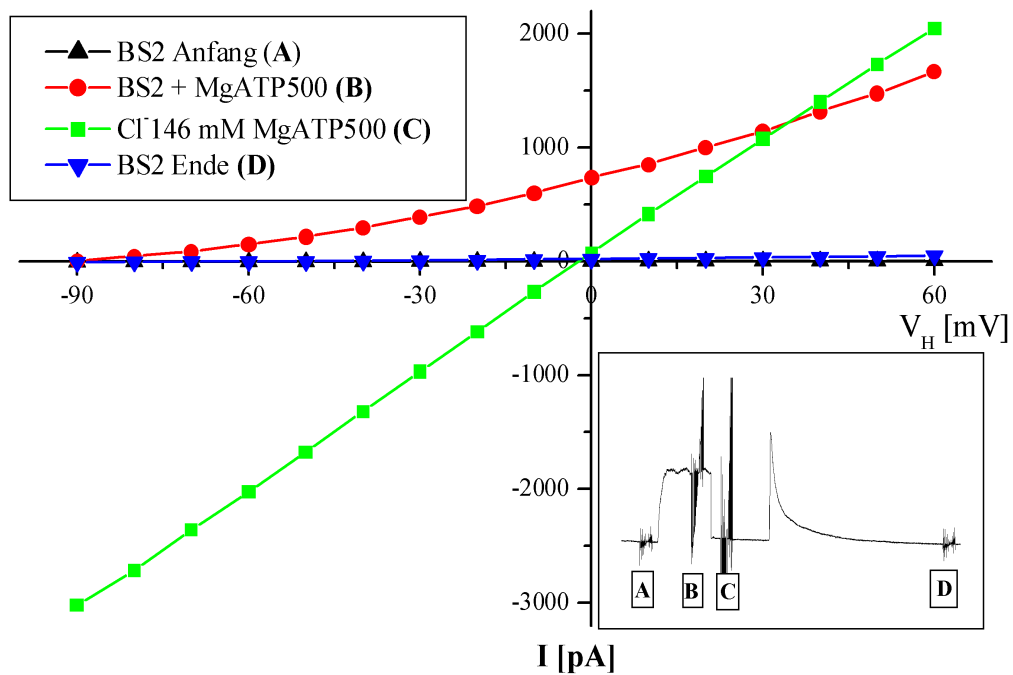
Die durch diese Lösungswechsel hervorgerufenen Schließvorgänge unterlagen im weiteren Verlauf der Messungen einer gerichteten Veränderung, die bereits von F. Weinreich [150] beschrieben wurde. Hierbei nahm der Anteil der Amplitude der langsamen Komponente immer weiter ab, so dass auch die Monoexponentialfunktion zur Anpassung genügte. Dieses Schließen bei MgATP-Entzug (**Pfeil E**, Abb. 3.2-10) erfolgte mit einer durchschnittlichen Relaxationsrate von  $0,6 \text{ s}^{-1}$ . Alle kinetischen Anpassungen bei ATP-Entzug, die einen vollständigen Stromrückgang beschreiben, wurden so durchgeführt, dass die Funktion auf den Nullstrom relaxierte.

Nach der Phosphorylierung war die Zugabe von MgATP ausreichend, um die CFTR-Kanäle zu öffnen (**Pfeil D**, Abb. 3.2-10). In der überwiegenden Zahl der ausgewerteten Messungen war eine monoexponentielle Kinetik bei ATP-Zugabe zu beobachten, weswegen auf eine Auswertung der biexponentiell anzupassenden Signale verzichtet wurde. Verglichen mit dem Schließvorgang bei ATP-Entzug zeigte sich eine schnellere Stromänderung, die zu einer durchschnittlichen Öffnungsrate bei ATP-Zugabe von  $0,8 \text{ s}^{-1}$  führte. In allen Fällen war im Messverlauf eine Zunahme der Relaxationsrate bei ATP-Zugabe zu beobachten [150]. Dieses galt allerdings nur, solange nicht erneut PKA appliziert wurde (was diesen Effekt unterbrach, nicht gezeigt). In Abb. 3.2-11 sind die ermittelten Relaxationsraten zusammengefasst.



**Abb. 3.2-11 Öffnungs- und Schließkinetik während und nach PKA-Applikation**  
 Die Konstanten geben die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen wieder. Für die Deaktivierung bei ATP-Entzug direkt nach der Phosphorylierung wurde nur die schnelle Zeitkonstante berücksichtigt.

### 3.2.7 Spannungsabhängigkeit der CFTR-Chloridströme



**Abb. 3.2-12 Strom-Spannungskennlinie der im isolierten Makropatch**  
 Gezeigt sind die Kennlinien vor (schwarz) und nach (blau) CFTR-Aktivierung und in ATP-Gegenwart mit 37,5fachen Chloridgradienten (rot) und symmetrischen Chloridbedingungen (156/146 mM; grün) aus der unten rechts gezeigten Messung.

Ebenso wie bei den Voltage-clamp-Messungen (TEVC), konnten auch im Patch-clamp-Experiment die Spannungsabhängigkeiten der Ströme ermittelt werden. Da jedoch, im Gegensatz zur Ganzzellmessung, sowohl die Zusammensetzung der extrazellulären, als auch der intrazellulären Lösung vorgegeben war, konnte im Makropatch das zu erwartende mit dem gemessenen Umkehrpotenzial verglichen werden. In Abb. 3.2-12 sind die Spannungsabhängigkeiten folgender Ströme dargestellt: Die Linien A und D kennzeichnen den Stromverlauf in Abwesenheit von MgATP vor und nach CFTR-Aktivierung in einer Badlösung, die 4 mM Chlorid enthielt. Aus diesen Kennlinien lässt sich der Abdichtwiderstand des Patches, der sogenannte "Seal", berechnen ( $\Delta U/\Delta I=R$ ), für die hier abgebildete Messung betrug er 16,7 G $\Omega$ . Die Linie B zeigt die Spannungsabhängigkeit in Anwesenheit von MgATP und anliegendem Chloridgradienten von 156 mM/4 mM (Pipette/Bad). Die Angleichung der Chloridkonzentration im Bad an die Pipettenkonzentration führte zu der mit C bezeichneten Linie. Aus den Kennlinien wird deutlich, dass in ATP-Abwesenheit nur eine minimale Stromänderung infolge der Änderungen der Haltespannung erfolgte. Bei aktivierten Chloridkanälen verliefen die Kennlinien so, wie es aufgrund der GHK-Gleichung zu erwarten war (3.2.8): Bei dem anliegenden 40-fachen Chloridgradienten wurde der beobachtete Strom mit hyperpolarisierenden Spannungen immer geringer. Die aus der Nernst-Gleichung bestimmte Umkehrspannung von -93 mV stimmte mit der aus der Abbildung abgeschätzten überein. Dieses Umkehrpotenzial bestätigte, dass der CFTR für Aspartat, welches in der BS2-Lösung das Chlorid ersetzte, undurchlässig war [165]. Bei symmetrischen Bedingungen bezüglich der Chloridkonzentration konnte eine über den gesamten Spannungsbereich lineare Kennlinie beobachtet werden.

Aus der Steigung dieser Geraden ließ sich die Leitfähigkeit des Patches in der gleichen Weise wie beim TEVC berechnen. Für die hier gezeigte Messung konnte diese zu 34 nS bestimmt werden. Wie bereits erläutert, konnte aus diesem Wert jedoch keine eindeutige Aussage bzgl. der Kanalanzahl oder der Einzelkanalleitfähigkeit getroffen werden, ebenso wenig war es möglich, die Offenwahrscheinlichkeit unter diesen Bedingungen abzuleiten. Um jedoch zu einer Abschätzung der Mindestanzahl an CFTR-Kanälen in diesem Patch zu gelangen, konnte man die durchschnittliche Offenwahrscheinlichkeit für präphosphorylierte Kanäle ( $P_O = 0,5$ ; [150]) und die höchste publizierte Einzelkanalleitfähigkeit des CFTR ( $g_{EK} = 10$  pS, [51]) annehmen,



man erhielt dann mit

$$N = \frac{g_{\text{Patch}}}{g_{\text{Einzelkanal}}} = \frac{34 \text{ nS}}{10 \text{ pS}} = 3400$$

und  $\rightarrow N_{\text{gesamt}} = N_{\text{offene Kanäle}} / P_O = 6800$

eine geschätzte Anzahl von 6800 Kanälen im Patch. Die Überschneidung der Kennlinien (B) und (C) bei ca. +30 mV (Abb. 3.2-12) konnte durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK) nicht erklärt werden. Um die Abweichung der beobachteten Strom-Spannungskennlinien von denen, aufgrund der GHK-Gleichung zu erwartenden, quantifizieren zu können, wurde unter Berücksichtigung der Bedingungen aus Abb. 3.2-12 (Leitfähigkeit, Chloridkonzentrationen der Bad- und Pipettenlösung) der theoretische Verlauf ermittelt, Die Goldman-Hodgkin-Katz-Stromgleichung lautet:

$$I_S = P_S * z_s^2 * \frac{EF^2}{RT} * \frac{[S]_i - [S]_o \exp(-z_s FE/RT)}{1 - \exp(-z_s FE/RT)}$$

mit

- $I_S$  = Gesamtstrom(dichte) [A/cm<sup>2</sup>]
- $P_S$  = Permeabilität [cm/s]
- $z_s$  = "gating charge" [dimensionslos]
- $E$  = Spannung [V]
- $R$  = universelle Gaskonstante = 8,3144 [J\*K/mol]
- $F$  = Faradaykonstante = 96485 [C/mol]
- $T$  = Temperatur [K], hier mit 294 K angenommen
- $S_i/S_o$  = intra- und extrazelluläre Konzentration des Ions S [mol/l]

Um mit dieser Gleichung den Stromverlauf zu beschreiben, wurden folgende Annahmen getroffen:

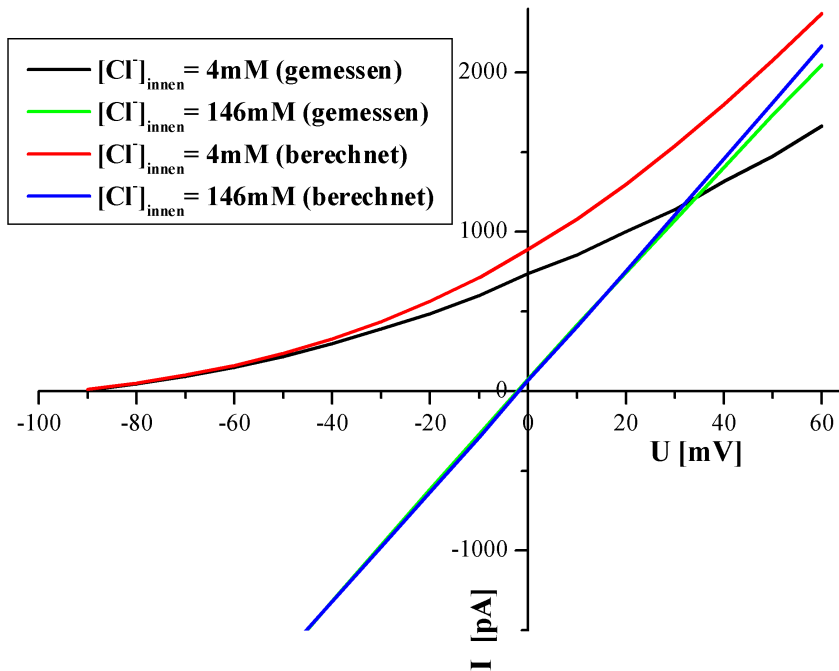
Die "gating charge" wurde mit der Ladung des Chloridions (-1) gleichgesetzt.

$S_i$  = intrazelluläre Chloridkonzentration → 4 mM bzw. 146 mM

$S_o$  = extrazelluläre Chloridkonzentration → 156 mM

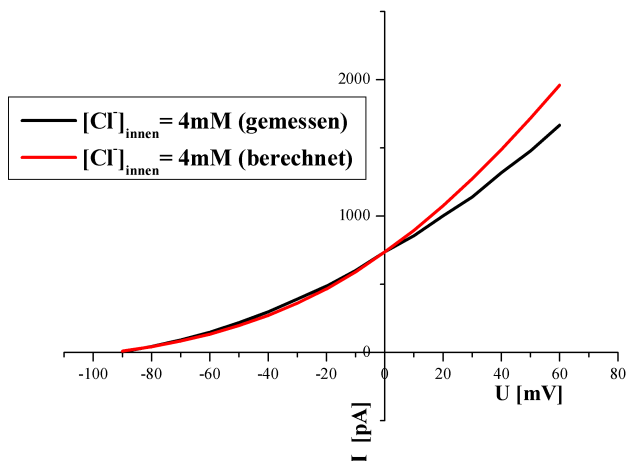
Da die Permeabilität keine im Patchexperiment zugängliche Größe ist, aber direkt mit der jeweiligen Ionenleitfähigkeit korreliert, wurde die beobachtete maximale Chloridleitfähigkeit bei quasisymmetrischen Bedingungen (für  $E \rightarrow \infty$ ) eingesetzt und

mit einem Korrekturfaktor versehen. Unter der Annahme, dass die Kanalleitfähigkeit im untersuchten Potenzialbereich spannungsunabhängig war, konnte nun ein Vergleich durchgeführt werden (Abb. 3.2-13).



**Abb. 3.2-13** Unterschiede zwischen den gemessenen und den berechneten Spannungsabhängigkeiten der Chloridströme bei aktiviertem CFTR

Für den gezeigten Vergleich wurden die berechneten Linien mit einem Korrekturfaktor angepasst. Die Chloridkonzentration in der Pipette betrug 156 mM.



**Abb. 3.2-14 Auf 0 mV normierte IV-Relation**

Die berechnete Kennlinie (rot) wurde auf den gemessenen Strom (schwarz) bei 0 mV skaliert (37,5-facher Chloridgradient). Mit zunehmender Haltespannung nahm die Abweichung zu.

Bereits bei einem Haltepotenzial von 0 mV unterschritt der gemessene Strom den berechneten für die gezeigte Messung um ca. 18 %. Durch Skalierung der berechneten Kennlinie auf die gemessene (auf den Strom bei 0 mV) wird ersichtlich, dass die Abweichung von der GHK-Gleichung mit steigender Haltespannung immer größer

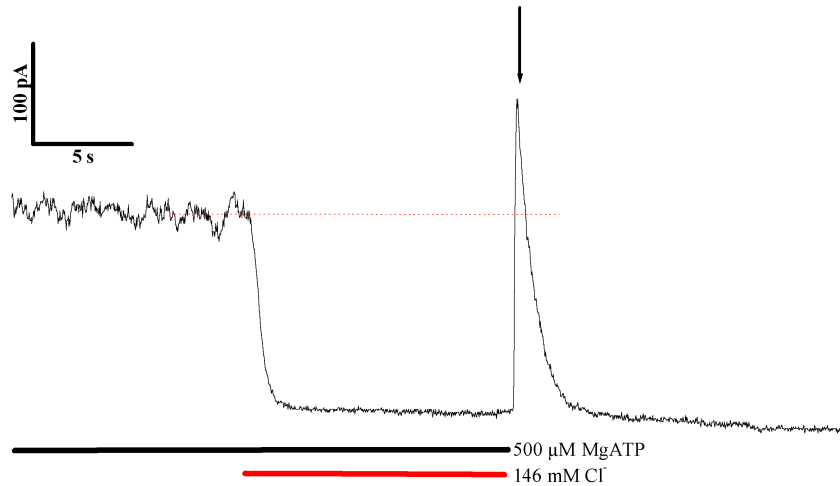
wird (Abb. 3.2-14). Da sich die Steigung der Geraden (grüne Linie) bei symmetrischer Chloridkonzentration über den gesamten Spannungsbereich nicht änderte, konnte nur ein inhibitorischer Einfluss der BS2-Lösung die Ursache für diesen Effekt sein.

### 3.2.8 Transiente Ströme bei Chloridkonzentrationswechseln

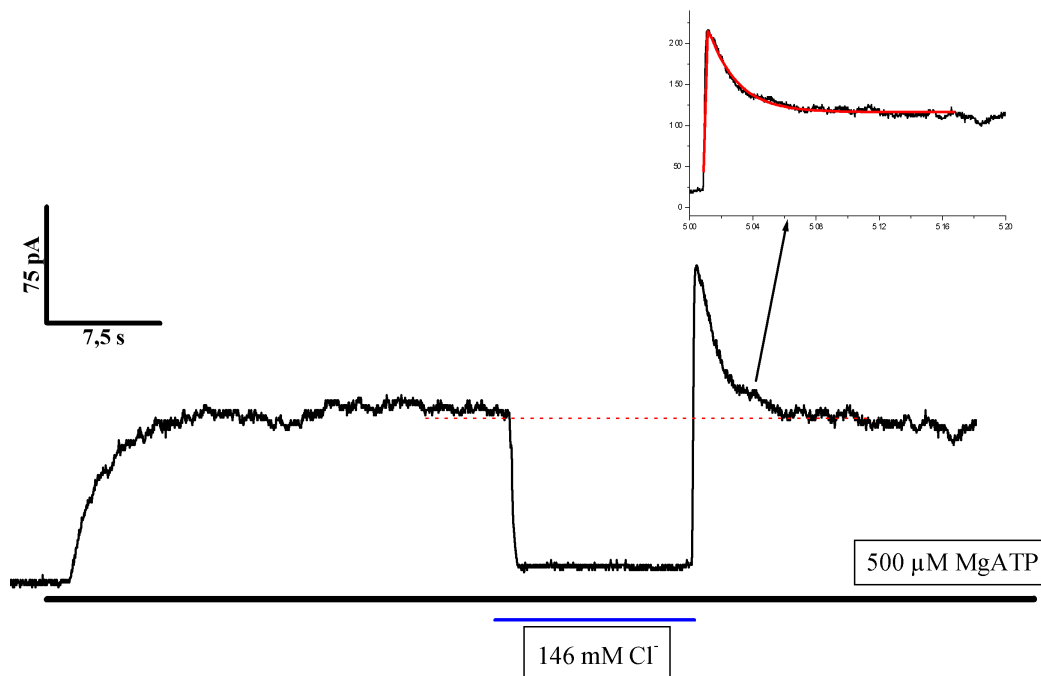
Wie unter 3.2.4 beschrieben, traten bei den Wechseln zwischen Lösungen, die vorwiegend NMG-Cl (und MgATP) enthielten und Lösungen, welche in der gleichen Konzentration aus NMG-Aspartat (mit und ohne MgATP) bestanden, deutliche Transienten im Strom auf. Nach dem Wechsel von niedriger zu hoher Cl<sup>-</sup>-Konzentration in der Badlösung, bei Aufrechterhaltung der sättigenden ATP-Konzentration von 500 µM (ergab die Systemzeit, s.o.), wurde auf eine Lösung mit wiederum 4 mM Chlorid umgeschaltet (Abb. 3.2-15). Diese enthielt jedoch kein MgATP und musste daher zum Schließen der Kanäle führen. Auffällig war der hohe transiente Strom (**Pfeil**, Abb. 3.2-15) bei gleichzeitiger Wiederherstellung des ursprünglichen Chloridgradienten und Entfernung des MgATP aus dem Bad. Während die Erhöhung des Chloridgradienten auf den ursprünglichen Wert (Pipette/Bad = 156 mM/4 mM) zu einer Signalerhöhung beitragen sollte, musste die Wegnahme des MgATP zum Schließen der Kanäle führen. Zu keinem Zeitpunkt war jedoch ein größerer Chloridgradient als 156 mM / 4 mM möglich, weswegen eine Überschreitung des Stromes, wie er durch die schraffierte Linie gezeigt ist, nicht zu erwarten war. Darüber hinaus musste aber die gleiche Zeitkonstante für den Chloridkonzentrations- wie für den MgATP-Konzentrationswechsel gelten (Annahme eines vergleichbaren Diffusionskoeffizienten für Chlorid und Aspartat). Daher war eine deutlich geringere Amplitude dieses Transienten zu erwarten, zumal keine stationäre Phase, die über die Systemtotzeit hinausging, bei ATP-Entzug zu beobachten war.

Zusätzlich wurde ein reiner Chloridwechsel bei geöffneten Kanälen betrachtet. Auch hier (Abb. 3.2-16) wurde ein kurzzeitig höherer Strom als mit der BS2-ATP Lösung beobachtet, der mit einer durchschnittlichen Zeitkonstanten von  $1,45 \pm 0,2$  Sekunden ( $n = 15$ ) auf den Strom mit der BS2-ATP Lösung relaxierte. Die Überschreitung dieses stationären Stroms schwankte zwischen 0 und 50 % und korrelierte nicht mit der Geschwindigkeit des Lösungswechsels. Der Austausch des Aspartats in der

Badlösung gegen andere nicht permeierende Anionen, wie Gluconat oder N-Morpholino-Ethansulfonsäure (MES) führte zu einer Verringerung der stationären Chloridströme bei 0 mV (nicht gezeigt). Somit war es nicht möglich, diese Strom-Spannungskennlinien zum Vergleich heranzuziehen.



**Abb. 3.2-15 Transiente Ströme bei gleichzeitiger ATP- und Chloridwegnahme**  
 Der Strom bei Wiederherstellung des Cl<sup>-</sup>-Gradienten (Pfeil) war deutlich höher als der stationäre Strom in ATP-Anwesenheit (und 37,5fachem Gradienten, gestr. rote Linie).



**Abb. 3.2-16 transiente Ströme bei Chloridkonzentrationsprüngen**  
 Das Inset oben rechts stellt die biexponentielle Anpassung (rot) des transienten Signals. Es wurde kontinuierlich mit 500 μM MgATP perfundiert.

### 3.3 Phosphorylierung I: Koexpression von BR-PKA

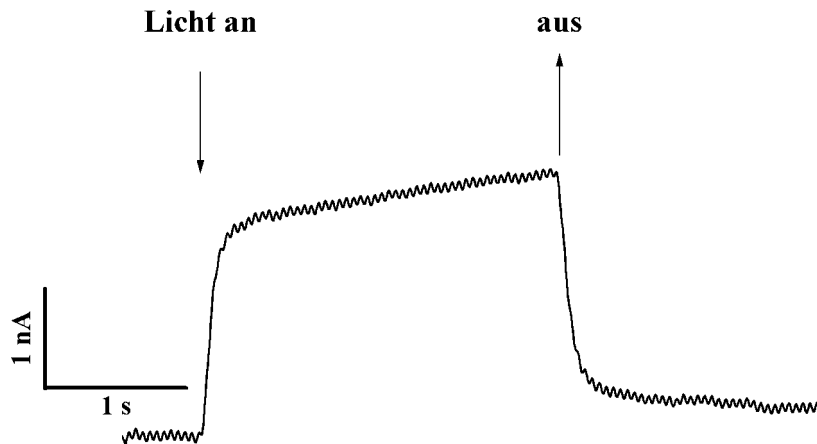
Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse der Phosphorylierung auf das Öffnen und Schließen des CFTR-Chloridkanals am isolierten Makropatch genauer zu charakterisieren. Die cAMP-abhängige Proteinkinase ist in den meisten Geweben, in denen der CFTR exprimiert wird, das für dessen Phosphorylierung wichtigste Enzym [49]. Durch die cAMP-Bindung werden die katalytischen Untereinheiten freigesetzt und liegen löslich im Zytosol vor [156]. Deshalb musste in Messungen an isolierten Makropatches eine Perfusion mit der aufgereinigten katalytischen Untereinheit des Enzyms erfolgen. Hierbei standen für die einzelnen Messungen nur geringe Mengen zur Verfügung, was eine kontinuierliche Zugabe der PKA verhinderte. Aus diesem Grund war es bislang nicht möglich, unter gleichbleibend hohem Phosphorylierungsgrad das Kanalverhalten im isolierten Makropatch zu studieren.

G. Nagel stellte durch die Fusion der katalytischen Untereinheit der PKA mit Bakteriorhodopsin (BR), einem relativ kleinen (25 kD) und gut charakterisierten Membranprotein, eine künstlich membrangebundene Proteinkinase her (Abb. 2.4-1). Wurde diese in Oozyten exprimiert, so war zu erwarten, dass sie beim Ausreißen eines Patches in diesem verbleibt. Außerdem sollte dieses Protein bereits in der Anwesenheit von ATP konstitutiv aktiv sein, da die Regulation der Kinaseaktivität über die cAMP-Bindung an die regulatorischen Untereinheiten des tetrameren Holoenzym erfolgt, welche in diesem Konstrukt nicht enthalten sind. Dadurch wurde eine Nutzung des Fusionsproteins, im Folgenden mit BR-PKA abgekürzt, zur Phosphorylierung des CFTR durch einfache MgATP-Zugabe in Messungen an isolierten Makropatches ermöglicht.

#### 3.3.1 Überprüfung der Insertion in die Plasmamembran

Neben der funktionellen Prüfung durch die Patch-clamp Messung, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird, war es auch möglich, die elektrogenen Eigenschaften des Bakteriorhodopsins (BR) zu nutzen, um die Expression des Fusionsproteins zu überprüfen. BR ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe, bei dessen Aktivierung eine Protonentranslokation über die Membran erfolgt, welche bei elektrophysiologischen

Messungen zu messbaren Strömen führt [97]. Nach dreitägiger Expression wurde eine Oozyte im Zwei-Elektroden-Voltage-clamp bei -40 mV mit einer HBO-Lampe belichtet (Cutoff-Filter: 495 nm), was einen Strom von mehreren Nanoampère hervorrief (Abb. 3.3-1). Der, im Vergleich zu den publizierten BR-Voltage-Clamp-Experimenten [97], niedrige Photostrom war vermutlich auf die nicht optimale Belichtung zurückzuführen. Möglicherweise wurde die geringe Stromamplitude aber auch durch die Kopplung mit der katalytischen Untereinheit der PKA verursacht.

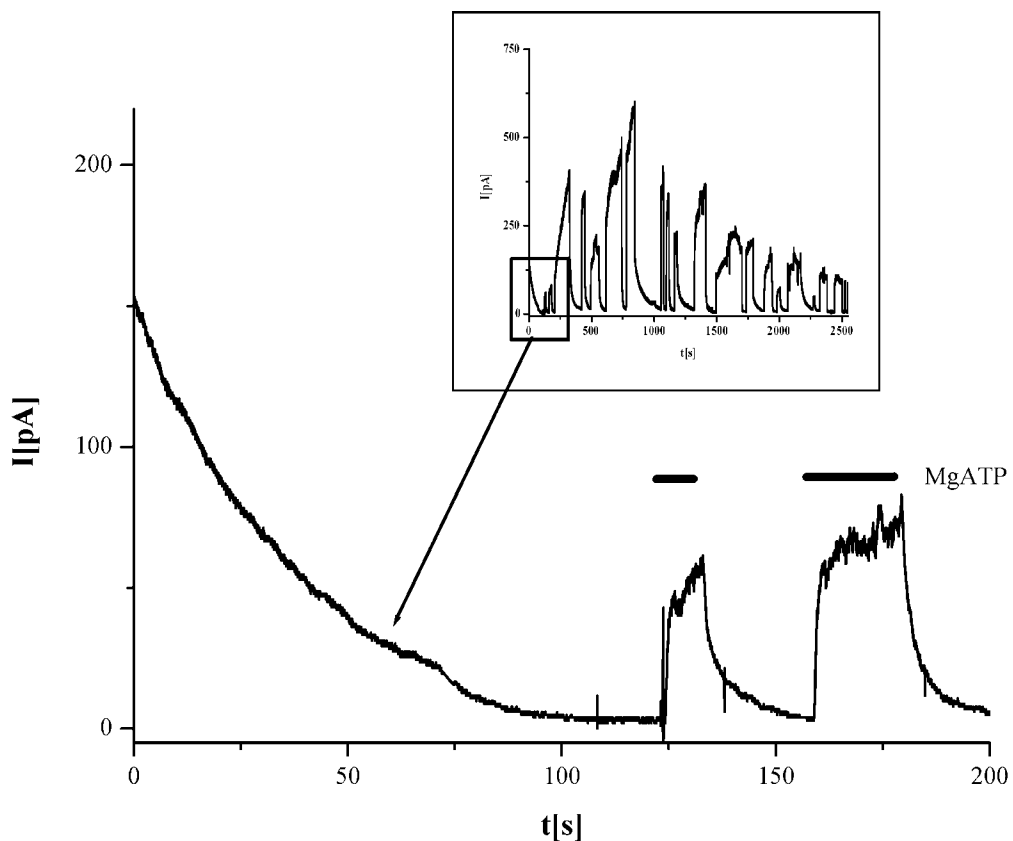


**Abb. 3.3-1** Aktivierung des Fusionsproteins BR-PKA im Voltage-clamp durch Belichtung  
Nach dreitägiger Expression von BR-PKA induzierte die Belichtung der Oozyte mit einer HBO-Lampe (Filter: 495 nm) einen reversiblen Photostrom von ca. 3 nA bei  $V_C = -40$  mV.

### 3.3.2 BR-Aktivierung im isolierten Makropatch

Der Nachweis eines Photostroms stellte die korrekte Inkorporation des Fusionsproteins in die Membran sicher, wies jedoch nicht notwendig auf eine Kinaseaktivität hin. Da in diesem Fusionsprotein nur die katalytische Untereinheit der PKA vorhanden ist, sollte die Gegenwart von MgATP in der Badlösung ausreichen, um eine Kinaseaktivität zu induzieren. Daher kann in Ganzzellmessungen aufgrund des hohen ATP-Gehalts in der intakten Oozyte eine fortwährende Phosphorylierung erfolgen, was eine permanente CFTR-Aktivität hervorruft. Aus diesem Grund wurde die Funktionalität des Proteins direkt am isolierten Makropatch untersucht. Die kontinuierliche Kinaseaktivität führte aber auch dazu, dass bei CFTR-exprimierenden Zellen der Abdichtvorgang zwischen Pipette und Zellmembran (das *Sealing*) nur begrenzt elektrisch verfolgt werden konnte: Wenn die CFTR-vermittelte Leitfähigkeit 10 nS betragen würde, so könnte der apparente Abdichtwiderstand 100 M $\Omega$  nicht überschreiten. Beim Anlegen einer Spannung würden die Chloridionen durch die, aufgrund der

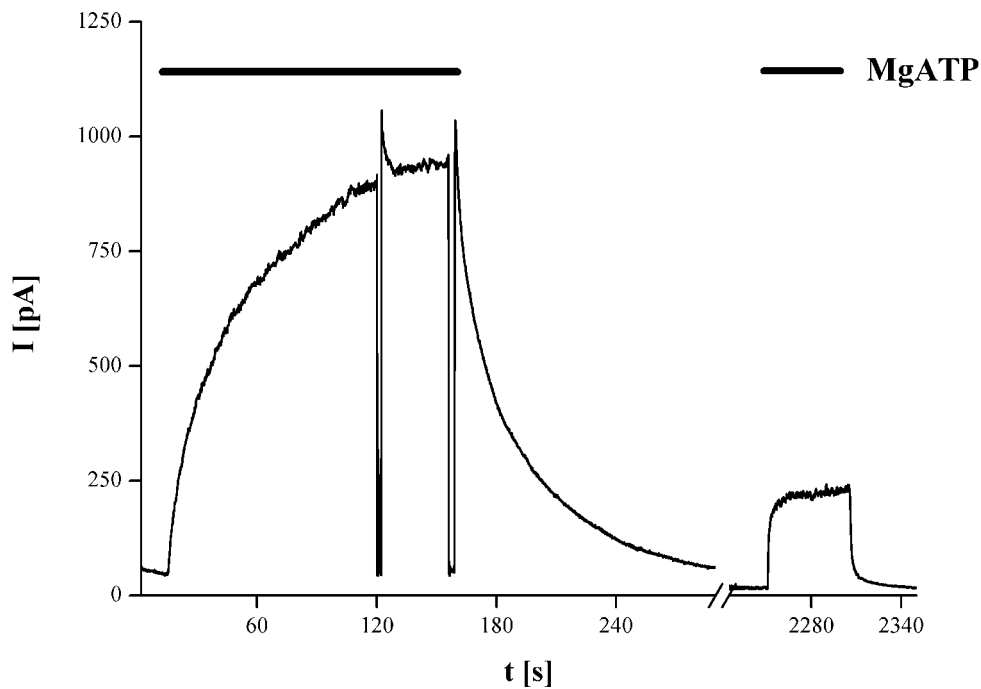
Phosphorylierung geöffneten, CFTR-Kanäle fließen und somit einen Strom hervorrufen. Dieser Strom kann nicht von den Leckströmen, die zwischen der Patchpipette und der Zellmembran fließen, unterschieden werden. Bei der Koexpression von CFTR und BR-PKA trat zu Beginn der Messungen häufig ein hoher Leckstrom auf (Abb. 3.3-2), der bei Perfusion mit der MgATP-freien Badlösung langsam abnahm. Dieser Strom trat nur bei der Koexpression dieses Fusionsproteins auf und ist vermutlich auf die permanente Kinaseaktivität in der intakten Zelle (die ATP enthält) zurückzuführen, die dazu führte, dass die CFTR-Kanäle bereits zu Messbeginn geöffnet waren. Da durch das Ausreißen des Patches ATP entzogen wurde, schlossen die Kanäle und der Abdichtwiderstand stieg bis auf einige Gigaohm an, so dass mit der eigentlichen Messung begonnen werden konnte.



**Abb. 3.3-2** CFTR/BR-PKA-Expression induzierte zu Messbeginn einen hohen Leckstrom  
Nach dem Abziehen des Patches nahm der Leckstrom bei der Perfusion mit ATP-freier Badlösung nur langsam ab (Pfeil). Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt aus der oben rechts abgebildeten Messung.

Die erstmalige Zugabe von MgATP zur Badlösung führte bei allen Messungen, in denen CFTR und BR-PKA in ausreichender Menge koexprimiert wurden, zu einem messbaren Strom (Abb. 3.3-3), der anhand der Strom-Spannungskennlinien eindeutig

einer Chloridleitfähigkeit zugeordnet werden konnte. Die Amplitude dieses durch MgATP verursachten Stroms variierte zwischen 10 pA und mehr als 2 nA (Abb. 3.2-2). Erneute Zugabe von MgATP führte zu einem schnellen Anstieg des Stroms, wobei der Unterschied in der Öffnungskinetik zwischen der ersten und jeder weiteren MgATP-Applikation auffällig war. Dies wird im nächsten Abschnitt genauer untersucht.

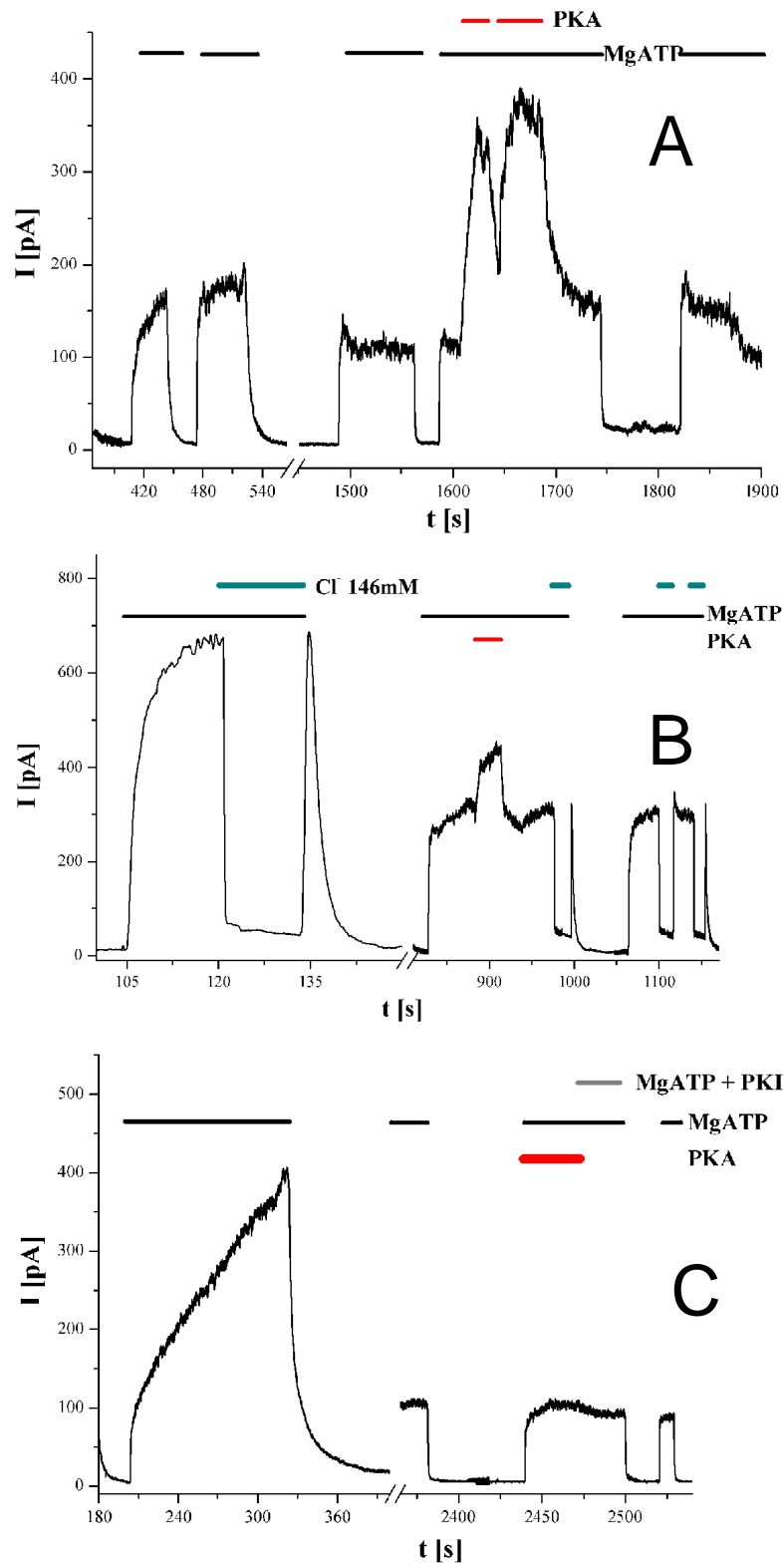


**Abb. 3.3-3 Aktivierung von CFTR durch Stimulierung der BR-PKA**

Die erstmalige MgATP-Zugabe (500  $\mu$ M) rief eine deutliche, langsame und reversible Stromzunahme hervor. Erneute MgATP-Zugabe induzierte ebenfalls einen Chloridstrom (rechts). Die schnellen Stromrückgänge während der Phosphorylierung sind auf Chloridkonzentrationswechsel (3.2.4) zurückzuführen.

Bei den Experimenten, in denen der CFTR mit löslicher PKA phosphoryliert wurde, führte auch die spätere PKA-Applikation zu einem nachfolgend höheren Strom bei ATP-Zugabe (vgl. 3.2.1). Im Gegensatz hierzu ging der Strom in den Messungen, in denen zu Messbeginn eine deutliche Aktivierung durch die BR-PKA erfolgte, häufig sofort nach PKA-Wegnahme wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Die transiente PKA-Applikation induzierte keine dauerhafte Erhöhung des ATP-vermittelten Stroms, so dass von einer Kinaseaktivität des Fusionsproteins ausgegangen werden kann, die mit der der löslichen PKA kat. Untereinheit vergleichbar ist.





**Abb. 3.3-4 Unterschiede des Effekts von löslicher PKA**  
 Gezeigt sind drei unabhängige Messungen, in denen zunächst durch BR-PKA (erste MgATP-Zugabe) phosphoryliert wurde und im weiteren Messverlauf PKA (rot) zugegeben wurde. Die MgATP-Konzentration (schwarze Balken) betrug in allen drei Messungen 500 μM.

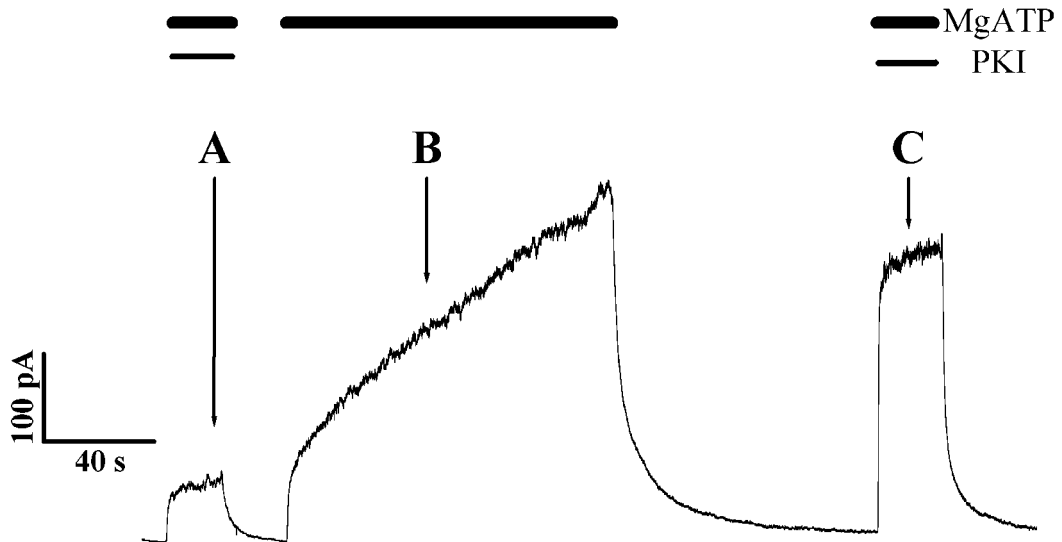
Die beobachteten Unterschiede in der Stromantwort auf die Zugabe von löslicher PKA (kat. Untereinheit), wenn zuvor durch BR-PKA phosphoryliert worden war (Abb. 3.3-4), hingen vermutlich auch mit der jeweiligen Expressionsdichte des Fusionsproteins zusammen, welche jedoch nicht bestimmt werden konnte. Im Patch waren keine regulatorischen Untereinheiten an das Fusionsprotein gebunden, der mangelnde Effekt des PKA-Aktivators zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Die Zugabe von 100  $\mu$ M cAMP, beeinflusste den durch MgATP hervorgerufenen Strom nicht (nicht gezeigt), was belegte, dass keine regulatorischen Untereinheiten an das Fusionsprotein gebunden waren.

### 3.3.3 Effekte des Proteinkinaseinhibitors PKI

Die Kinaseaktivität des Fusionsproteins konnte durch die Verwendung des potenten Proteinkinaseinhibitors (PKI) bestätigt werden. Dieses Peptid bindet an die Substratbindestelle der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase mit einer Affinität von 0,2 nM [156] und hemmt bei Zugabe im isolierten Makropatch die Phosphorylierung [150]. Somit sollte eine Badlösung, welche MgATP und PKI enthält, zwar den präphosphorylierten Kanal aktivieren, jedoch keine Phosphorylierung des CFTR bewirken. Zu Beginn eines Patch-clamp-Experimentes sollte diese Lösung dementsprechend höchstens einen geringen Strom (wegen der vorhergehenden Phosphorylierung in der intakten Zelle vor dem Ausreißen) hervorrufen. Dies konnte durch das Experiment, das in Abb. 3.3-5 gezeigt ist, bestätigt werden. Zu Beginn der Messung rief die MgATP-PKI-Lösung einen sechsfach geringeren Strom, als im Anschluss an die Phosphorylierung hervor. Ein weiterer Beleg für die Kinaseaktivität der BR-PKA ist der Verlauf in Abb. 3.3-6. Die Zugabe des Inhibitorpeptids PKI unterbrach die ATP-vermittelte Stromzunahme. Durch das Auswaschen des Inhibitors wurde diese Hemmung aufgehoben und die phosphorylierungsvermittelte Stromzunahme setzte sich fort.

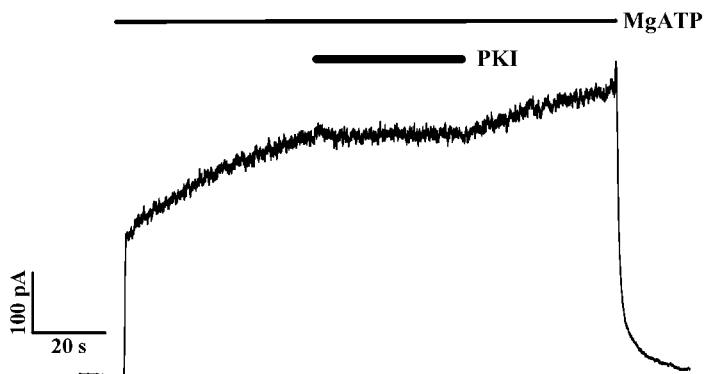
Während bei den Messungen, in denen der CFTR mit der löslichen PKA phosphoryliert wurde, die wiederholte PKA-Applikation immer zu einer erneuten Stromzunahme führte, bewirkte die wiederholte Zugabe von MgATP in mehr als 70 % der Experimente mit BR-PKA-Koexpression keine weitere Zunahme des Stroms durch Phosphorylierung mehr. Möglicherweise war die Ursache hierfür die unterschiedlich

lange Phosphorylierungsphase zu Messbeginn. Da die PKA zumeist nur für ca. 20-50 Sekunden zugegeben wurde, war vermutlich zu keinem Zeitpunkt der Messung die maximale Phosphorylierung erreicht.



**Abb. 3.3-5 PKI-Inhibition der BR-PKA induzierten CFTR-Phosphorylierung**

In Gegenwart von Proteinkinase-Inhibitorpeptid (2  $\mu\text{M}$ ) rief die MgATP-Zugabe (500  $\mu\text{M}$ ) zu Messbeginn nur einen geringen Strom (A) hervor. Die Wegnahme des PKI induzierte eine deutliche Stromzunahme (B). Die erneute Applikation von MgATP und PKI bewirkte deutlich größere Chloridströme als zu Beginn der Messung (C).



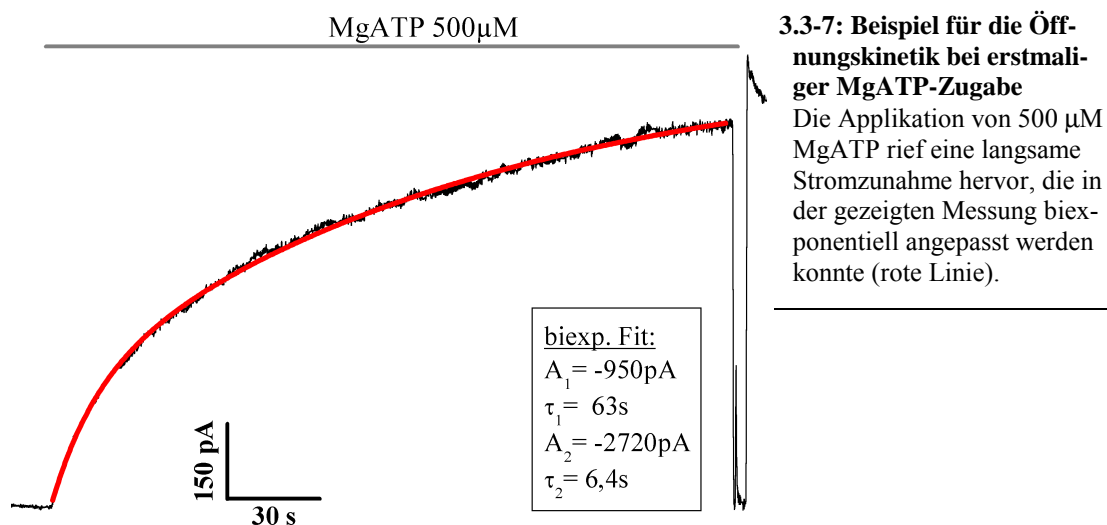
**Abb. 3.3-6 PKI unterbricht die Phosphorylierung des CFTR**

In dieser Messung wurde nach initialer, kurzer Aktivierung durch BR-PKA (500  $\mu\text{M}$  MgATP) die weitergehende Phosphorylierung durch die zeitweilige Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  PKI unterbrochen.

### 3.3.4 Einfluss der Phosphorylierung auf die Kinetik

Die erstmalige ATP-Applikation bei Koexpression der BR-PKA führte zu einer langsamen Stromänderung, wobei sich der Zeitverlauf in 8 von 13 Experimenten nur biexponentiell beschreiben ließ. Die langsamer relaxierende Komponente ( $23 \pm 7$  s,  $n=7$ ) besaß, verglichen mit der schnelleren ( $0,6 \pm 0,2$  s,  $n=7$ ) eine durchschnittlich

dreifach höhere Amplitude. Aus diesem Grund war in allen untersuchten Messungen eine deutliche Unterscheidung dieser beiden Raten möglich. Wurden die erhaltenen Ratenkonstanten mit denen aus der Anpassung der nachfolgenden ATP-Zugaben verglichen, so wurde deutlich, dass die langsame Komponente entweder ganz verschwunden oder zumindest stark zurückgegangen war. In Abb. 3.3-8 sind die in dieser Weise bestimmten Relaxationsraten bei MgATP-Zugabe denen aus den Messungen mit löslicher PKA gegenübergestellt.



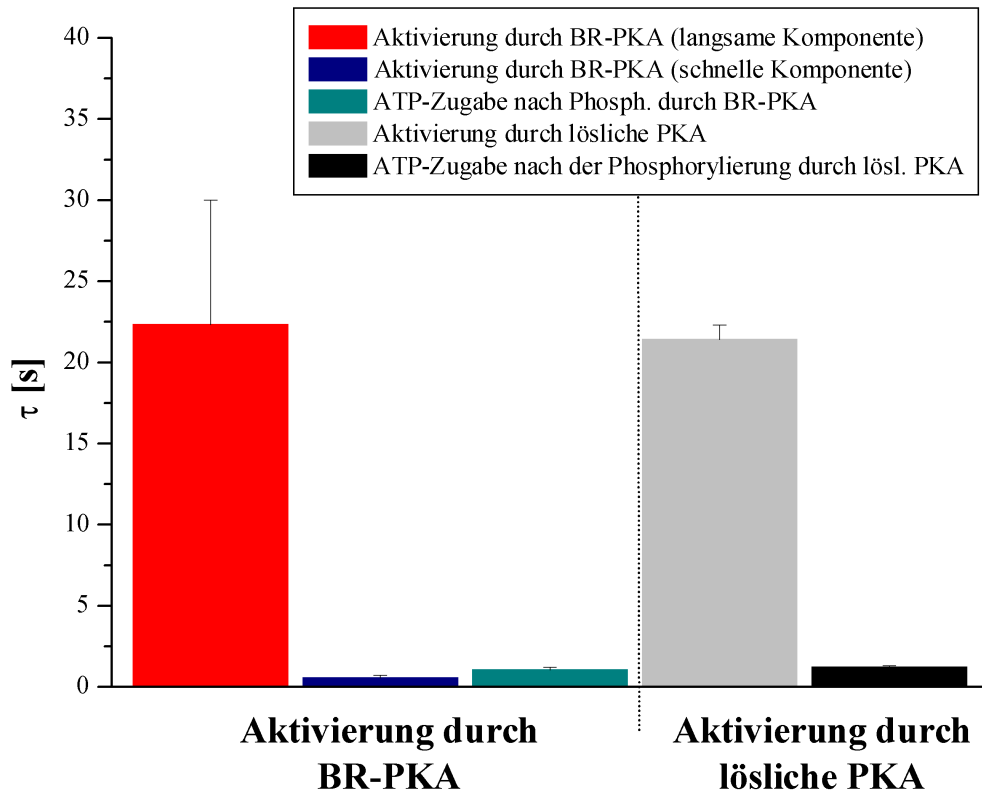
**3.3-7: Beispiel für die Öffnungskinetik bei erstmaliger MgATP-Zugabe**

Die Applikation von 500  $\mu$ M MgATP rief eine langsame Stromzunahme hervor, die in der gezeigten Messung biexponentiell angepasst werden konnte (rote Linie).

Die erstmalige ATP-Applikation bei Koexpression der BR-PKA führte zu einer langsamen Stromänderung, wobei sich der Zeitverlauf in 8 von 13 Experimenten nur biexponentiell beschreiben ließ. Die langsamer relaxierende Komponente ( $23 \pm 7 \text{ s}$ ,  $n=7$ ) besaß, verglichen mit der schnelleren ( $0,6 \pm 0,2 \text{ s}$ ,  $n=7$ ) eine durchschnittlich dreifach höhere Amplitude. Aus diesem Grund war in allen untersuchten Messungen eine deutliche Unterscheidung dieser beiden Raten möglich. Wurden die erhaltenen Ratenkonstanten mit denen aus der Anpassung der nachfolgenden ATP-Zugaben verglichen, so wurde deutlich, dass die langsame Komponente entweder ganz verschwunden oder zumindest stark zurückgegangen war. In Abb. 3.3-8 sind die in dieser Weise bestimmten Relaxationsraten bei MgATP-Zugabe denen aus den Messungen mit löslicher PKA gegenübergestellt.

Dieser Vergleich bestätigt, dass die anfänglich beobachtete, langsame Stromzunahme auf die Phosphorylierung zurückzuführen sein muss und bei erneuter ATP-Zugabe

die normale Öffnungskinetik präphosphorylierter Kanäle beobachtet werden konnte. Dieser phosphorylierende Einfluss des MgATP überwog aber nur bei der ersten Zugabe, wobei in zahlreichen Koexpressionsexperimenten mit der BR-PKA auch schon am Anfang der Messung ein schneller Stromanstieg erfolgte. Dieses war vermutlich durch die vorhergehende Kinaseaktivität in der ganzen Zelle verursacht, wodurch die Kanäle im Patch schon zu Beginn in einem präphosphorylierten Zustand vorlagen.



**Abb. 3.3-8 Vergleich der Öffnungskinetiken des CFTR bei Aktivierung durch lösliche und durch membrangebundene PKA**

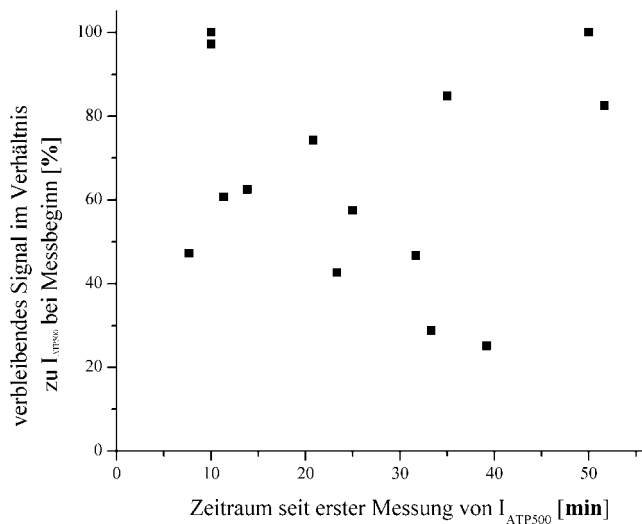
In allen Messungen war  $[MgATP]=500 \mu M$ ; ( $V_H = 0 \text{ mV}$ ;  $n=7-23$ ). Da vermutlich sowohl  $[PKA \text{ kat. Untereinheit}]_{\text{löslich}}$ , als auch  $[BR-PKA]$  nicht sättigend waren, sind die langsamen Zeitkonstanten vermutlich durch die Kinasekonzentrationen limitiert.

Bei diesem Vergleich muss berücksichtigt werden, dass die Menge an verfügbarer Kinase geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Daraus folgt, dass der Vergleich der ermittelten Zeitkonstanten bei erstmaliger Aktivierung durch lösliche PKA oder BR-PKA lediglich belegt, dass unter den vorliegenden Bedingungen beide Aktivierungen mit vergleichbarer Kinetik verlaufen. Im Vergleich zur Öffnungskinetik wies die Schließkinetik bei erstmaliger MgATP-Wegnahme deutlich größere Schwankungen auf, weswegen auf einen Vergleich der Kinetik bei der initialen ATP-Wegnahme mit den nachfolgenden Schließvorgängen verzichtet wurde. Es war jedoch möglich, die

Schließkinetik von PKA-präphosphorylierten Kanälen mit der Kinetik von Kanälen, die durch BR-PKA aktiviert worden waren, zu vergleichen. Hierfür wurden alle Schließvorgänge, mit Ausnahme der initialen, bei Wegnahme des MgATP exponentiell angepasst. Unter Vernachlässigung der langsamen Komponente ( $\tau = 22$  s) ergab sich eine Relaxationsrate von  $1,8 \pm 0,4$  s für den Schließvorgang bei MgATP-Wegnahme. Dieser Wert stimmt mit dem für die durch lösliche PKA präphosphorylierten Chloridkanälen überein (1,7 s) und zeigt, dass das durch die BR-PKA-Koexpression erhöhte Phosphorylierungsniveau nicht zu einer Änderung im Schließverhalten führte.

### 3.3.5 Rundown

In Abschnitt 3.2.2 wurde die Abnahme des CFTR-vermittelten Chloridstroms im Verlauf einer Messung, der Rundown, beschrieben. Die Anwesenheit des Fusionsproteins im Patch sollte eine kontinuierliche Phosphorylierung gewährleisten. Daher eigneten sich die Koexpressionsexperimente mit BR-PKA, um den Einfluss der PKA-Phosphorylierung auf den Rundown zu untersuchen.



**Abb. 3.3-9 Rundown des Chloridstroms bei BR-PKA / CFTR-Koexpression**

Gezeigt ist die Abnahme des durch ATP-Zugabe hervorgerufenen Stroms im Vergleich zum Strom bei erstmaliger Aktivierung. In der Mehrzahl der untersuchten Experimente (11 von 14) war eine deutliche Abnahme des ATP-abhängigen Chloridstroms im Verlauf der Messungen zu beobachten. Es ergab sich eine durchschnittliche Stromabnahme von 40 % nach 20-50 Minuten. In einigen Messungen war der Strom schon nach wenigen Minuten um über 50 % zurückgegangen.

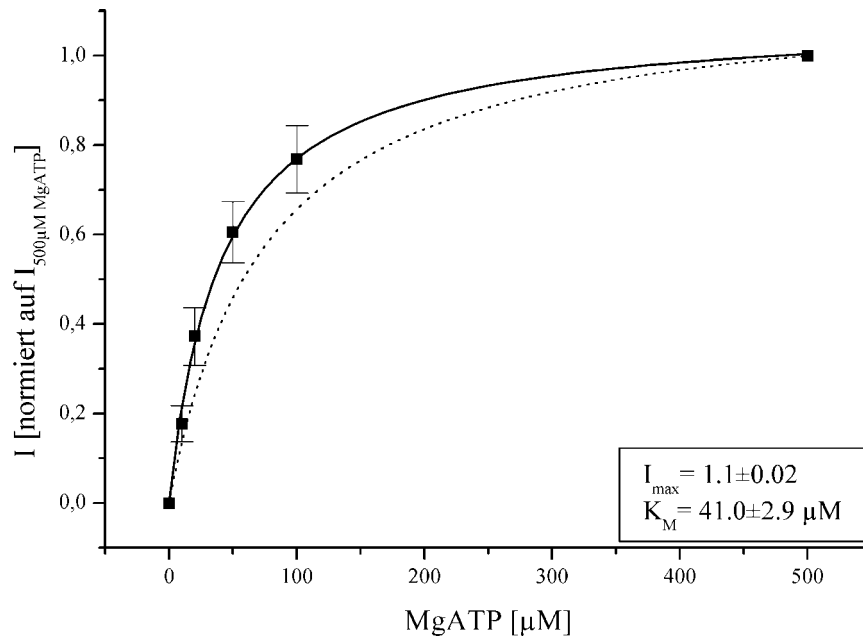
Da jedoch keine Verringerung des Rundowns durch die Koexpression der BR-PKA stattfand und darüber hinaus eine starke Schwankung in der Signalabnahme auftrat, muss aufgrund dieser Experimente vermutet werden, dass andere Faktoren für den Rundown in Makropatchmessungen verantwortlich sind.

### 3.3.6 ATP-Affinität

Der modulatorische Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivität des CFTR wird von zahlreichen Autoren unter anderem darauf zurückgeführt, dass die Affinität zum Substrat MgATP erhöht wird [80]. Bislang basierte diese Annahme vor allem auf biochemischen Messungen der ATPase-Aktivität des Proteins. In diesen konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Phosphorylierung zu einem Anstieg der Hydrolyserate führte [80]. Da eine Kopplung von Hydrolyse und Kanalaktivität als gesichert gilt, wurde dies als Beleg für den Effekt auf die ATP-Affinität gewertet [47]. Ein direkter Beweis durch den Vergleich des Einflusses von unterschiedlichen Phosphorylierungsniveaus auf die ATP-Affinität konnte bislang noch nicht erbracht werden.

Die Bestimmung der apparenten halbmaximalen Sättigungskonzentration für MgATP von präphosphorylierten CFTR-Kanälen am isolierten Makropatch, wurde von F. Weinreich zu 84  $\mu\text{M}$  bestimmt [149] und durch eigene Messungen weitgehend bestätigt ( $74 \pm 9 \mu\text{M}$ ;  $n=3$ ; nicht gezeigt). Bei ausschließlicher Phosphorylierung durch das Fusionsprotein BR-PKA wurden in dieser Arbeit die durch unterschiedliche MgATP-Konzentrationen hervorgerufenen stationären Ströme bestimmt. Um mögliche zeitabhängige Einflüsse weitestgehend ausschließen zu können, wurde bei den meisten hierfür verwendeten Messungen eine mehrfache Bestimmung des apparenten  $K_M$  durchgeführt. Es zeigten sich nur geringfügige Schwankungen innerhalb der einzelnen Messungen. Für den Vergleich verschiedener Messungen mit unterschiedlicher Amplitude des maximalen CFTR-Chloridstroms wurden die gemessenen Ströme jeweils auf den Strom bei 500  $\mu\text{M}$  MgATP normiert.

Die zu 41  $\mu\text{M}$  bestimmte Halbsättigungskonzentration bestätigte eine Erhöhung der ATP-Affinität durch kontinuierliche Phosphorylierung (Abb. 3.3-10). Da sich innerhalb der einzelnen Messungen die ATP-Abhängigkeiten der Chloridströme nicht gerichtet veränderten, wie es bei einer zeitabhängigen Abnahme der Phosphorylierung zu erwarten wäre, war dies ein weiterer Beleg, dass die Kinaseaktivität der BR-PKA über den gesamten Messzeitraum anhielt. Eine Zunahme des Hillkoeffizienten, wie sie u.a. von Li bei der Erhöhung des Phosphorylierungsgrades beschrieben wurde [80], konnte mit diesen Messungen nicht bestätigt werden.



**Abb. 3.3-10: Bestimmung des  $K_M$  für MgATP bei BR-PKA-koexprimierenden Oozyten**

Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung an eine Michaelis-Menten-Funktion ( $n=8$ ). Zum Vergleich ist die nach Präphosphorylierung mit löslicher PKA bestimmte ATP-Abhängigkeit ( $K_M=74 \mu\text{M}$ , gestrichelte Linie) gezeigt. Dieser Wert beruht lediglich auf drei Messungen, wird aber von Messungen von F. Weinreich unter vergleichbaren Bedingungen bestätigt ( $84 \mu\text{M}$ ) [149].

Im Vergleich zu der Applikation von löslicher PKA stellt die Koexpression der BR-PKA eine geeignete Alternative zur CFTR-Phosphorylierung am isolierten Makropatch dar, die die kontinuierliche Phosphorylierung des CFTR ermöglicht. Sie hat aber den Nachteil, dass nicht mehr zwischen der Aktivierung bereits phosphorylierter CFTR-Kanäle und CFTR-Aktivierung und der Phosphorylierung unterschieden werden kann, da die MgATP-Zugabe beide Prozesse induziert. Somit wäre es zur Unterscheidung erforderlich, das Inhibitorpeptid PKI zuzusetzen, welches nicht in allen Messungen einen Effekt hatte. Ideal wäre demnach ein System, in dem zum einen die Kinaseaktivität wie bei der BR-PKA bereits im Patch vorhanden ist und welches darüber hinaus einen einfachen Wechsel zwischen verschiedenen Phosphorylierungszuständen erlaubt.

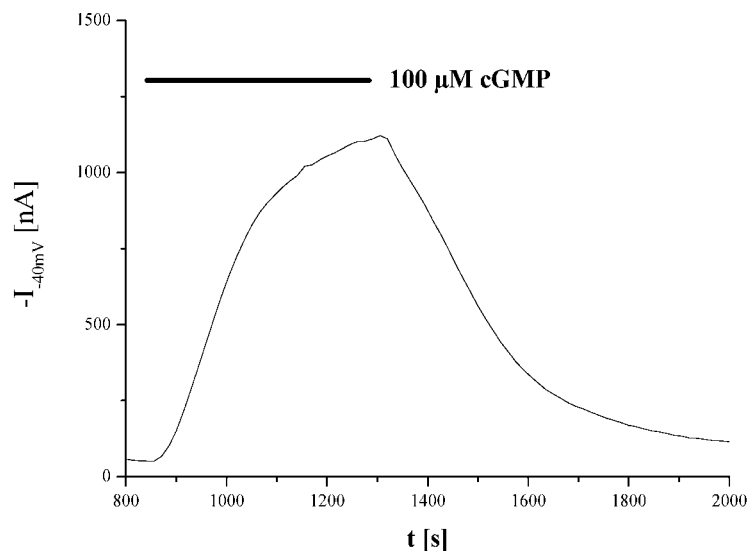


### 3.4 Phosphorylierung II: Aktivierung durch die cGKII

In einigen Geweben (z.B. den Epithelzellen des Dünndarms) ist vermutlich nicht die PKA, sondern die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) das für die Phosphorylierung des CFTR primär verantwortliche Enzym [142]. Von den zwei bekannten cGK-Subtypen I und II phosphoryliert nur der membranständige Subtyp II den CFTR-Chloridkanal *in vivo*. Dies konnte auch für Messungen an isolierten Makropatches von NIH-3T3-Zellen, die CFTR exprimierten, gezeigt werden [143]. Da die cGMP-abhängige Proteinkinase II im Gegensatz zur tetrameren PKA ein monomeres Protein ist, liegen das katalytische Zentrum und die beiden Bindestellen für das cGMP auf einer Polypeptidkette. Es wird angenommen, dass für eine Kinase-Aktivität des Enzyms die Dimerisierung in der Membran notwendig ist [84].

#### 3.4.1 Voltage-clamp

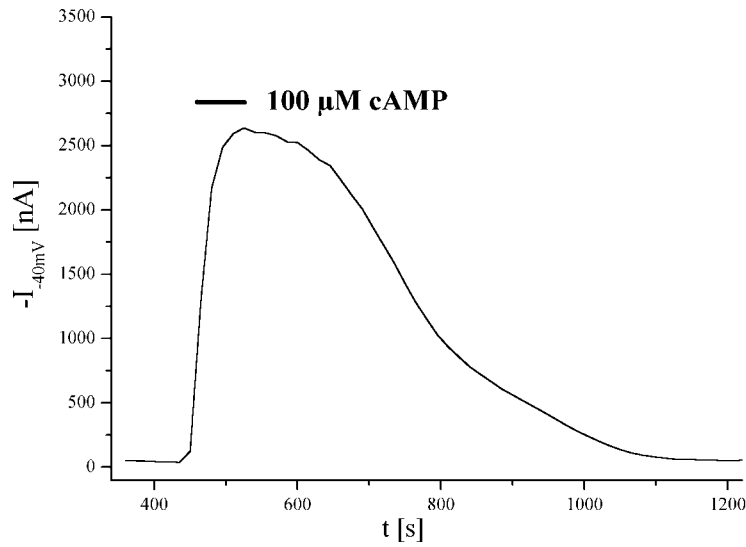
Das membrangängige cGMP-Analog dibutyryl-cGMP rief keine Ströme in cGKII/CFTR koexprimierenden Zellen hervor (nicht gezeigt). Daher war die heterologe Expression eines weiteren Membranproteins erforderlich. Der renale organische Anionentransporter (rOAT) befördert kleine, geladene Moleküle, wie z.B. Nukleotide (u.a. cAMP und cGMP) und Aminosäuren über die Plasmamembran [40, 125].



**Abb. 3.4-1 Aktivierung des CFTR im Voltage-clamp durch Stimulierung der cGKII**

Die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  cGMP führte bei einer Oozyte, die rOAT, CFTR und cGKII exprimierte, zu einem deutlichen  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom ( $V_H = -40$  mV; Badlösung: 124 mM  $\text{Cl}^-$ ).

Die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  cGMP rief im TEVC an Oozyten, denen die cRNA von CFTR, rOAT und cGKII injiziert wurde, Chloridströme durch die Aktivierung der koexprimierten cGKII hervor. Der Wechsel zu einer Badlösung ohne cGMP führte zu einer Abnahme der Chloridleitfähigkeit (Abb. 3.4-1). Der rOAT konnte ebenfalls genutzt werden, um eine schnelle Aktivierung der endogenen PKA in der ganzen Zelle unter Voltage-clamp Bedingungen zu bewirken. Die Zugabe von cAMP genügte, um eine deutliche Stromantwort hervorzurufen (Abb. 3.4-2).



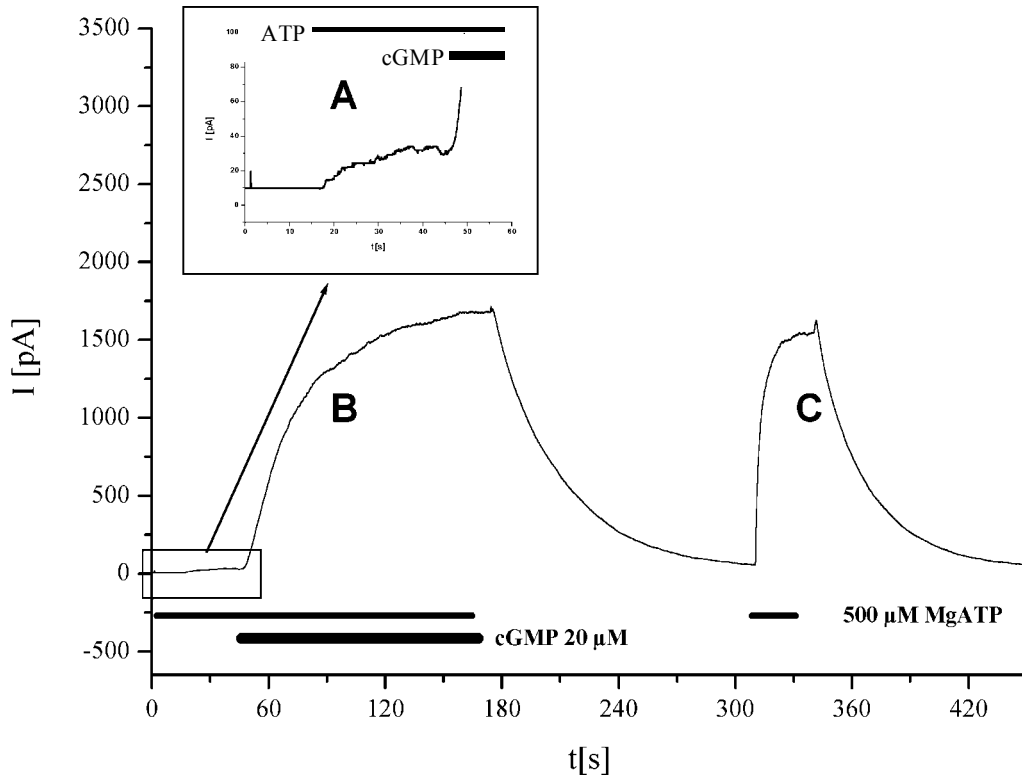
**Abb. 3.4-2: CFTR-Aktivierung durch Stimulierung der endogenen PKA mit cAMP:**  
In einer CFTR und rOAT-exprimierenden Zelle rief die Zugabe von cAMP (100  $\mu\text{M}$ ) eine deutliche Stromzunahme des Stroms im Voltage-clamp hervor ( $V_{\text{H}} = -40$  mV).

Der Unterschied in der Geschwindigkeit der Aktivierung des CFTR durch cGKII bzw. PKA kann zum einen dadurch verursacht sein, dass die Konzentration an cAMP-abhängiger Proteinkinase im Vergleich zur cGMP-abhängigen in der Zelle höher war, zum anderen berichten einige Autoren über Unterschiede in der Stimulierung der Kanalaktivität des CFTR, da die Kinasen leicht unterschiedliche Spezifitäten aufweisen [127].

### 3.4.2 Phosphorylierung durch die cGKII im isolierten Makropatch

Durch die Ganzzellmessungen konnte die funktionelle Expression der cGKII in der *Xenopus*-Oozyte eindeutig belegt werden, so dass Makropatchmessungen durchgeführt wurden. Nach dreitägiger Expression (cRNA-Verhältnis CFTR/cGKII=1/1) wurden die Patches zunächst mit einer Badlösung, die als Zusatz nur MgATP enthält, perfundiert, was zu geringen Signalen von einigen Picoampère führte (Abb. 3.4-3, A, entsprach 3 % des mittleren cGMP+MgATP-Stroms,  $n=29$ ). Diese wurde durch die basale Aktivität der endogenen cAMP-abhängigen Proteinkinasen vor dem

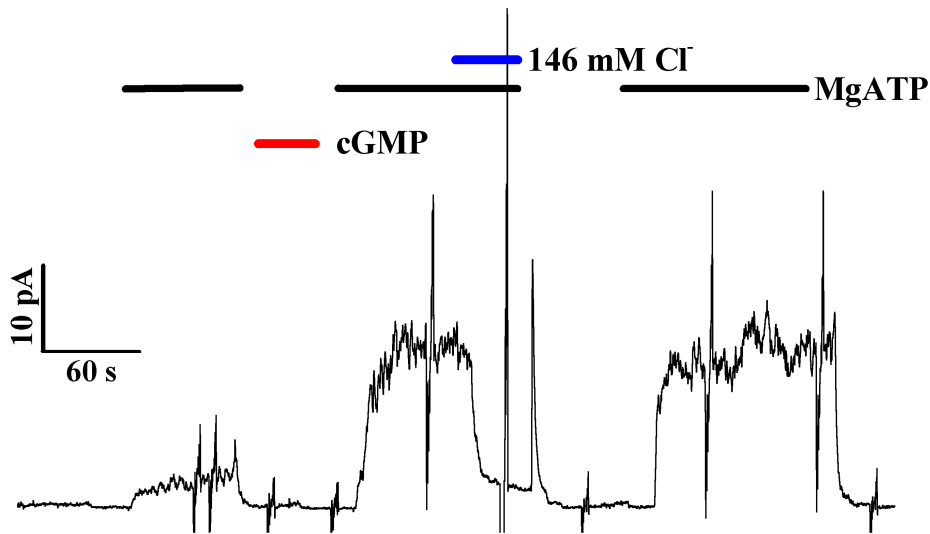
Ausreißen des Patches verursacht. Um eine Phosphorylierung der Kanäle mit der cGKII zu bewirken, wurde anschließend eine Lösung zugegeben, die neben dem MgATP eine, für die cGKII sättigende, Konzentration von 10 bzw. 20  $\mu\text{M}$  cGMP enthielt, was einen starken Stromanstieg hervorrief (**B**). Der ATP-Entzug führte zum Schließen der CFTR-Chloridkanäle, wie es auch für die Experimente mit löslicher PKA und BR-PKA gezeigt wurde. Anschließend genügte die Perfusion mit MgATP allein, um deutliche Chloridströme hervorzurufen (**C**).



**Abb. 3.4-3: Phosphorylierung des CFTR durch die membrangebundene cGKII**  
 20  $\mu\text{M}$  cGMP stimulierten in MgATP-Anwesenheit (500  $\mu\text{M}$ ) die cGKII, was zu einer stabilen Phosphorylierung führte, die nachfolgend die CFTR-Aktivierung durch ATP-Zugabe ermöglichte.

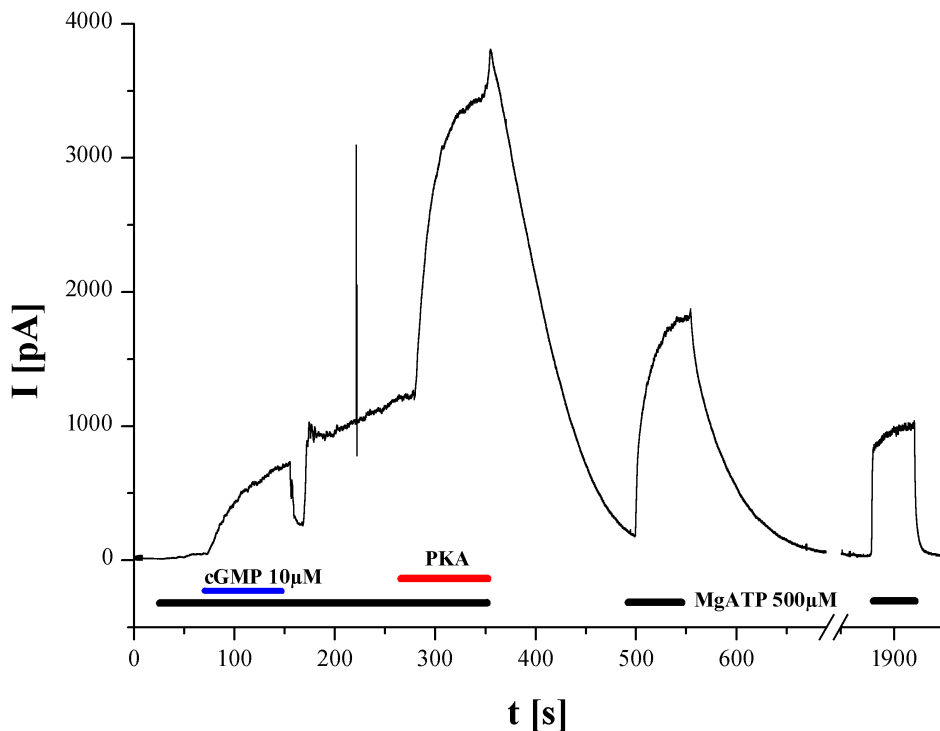
Während bei den Messungen, in denen durch die lösliche PKA aktiviert wurde, schon bei dem Wechsel von PKA + MgATP zu MgATP ein deutlicher Stromrückgang erfolgte (Abb. 3.2-1), nahm der Strom in cGKII-koexprimierenden Zellen bei cGMP-Entzug häufig nicht sofort ab, sondern es konnte stattdessen eine weitere Stromzunahme beobachtet werden (Abb. 3.4-5). Wurde cGMP zu Messbeginn allein zugegeben, erfolgte keine Kanalaktivierung, da das CFTR- und Kinasesubstrat MgATP fehlte. 30 Sekunden später genügte die alleinige MgATP-Zugabe, um eine Phosphorylierung des Kanals zu bewirken, wie die Abb. 3.4-4 zeigt. Diese

Signalverläufe sind auf die langsame Dissoziation des cGMP von der cGKII zurückzuführen, weswegen auch bei cGMP-Wegnahme in Anwesenheit von MgATP für einige Zeit die Phosphorylierung fortgesetzt wurde.



**Abb. 3.4-4 cGMP allein bewirkte keine Phosphorylierung des CFTR**

Der ATP-induzierte Chloridstrom war nach der Perfusion mit cGMP allein, das keinen Strom hervorrief, deutlich größer als davor.

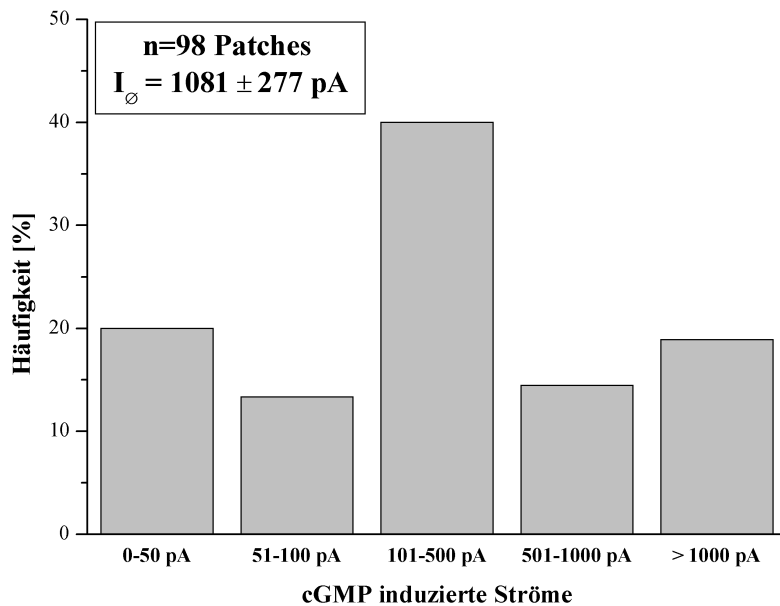


**Abb. 3.4-5 CFTR-Phosphorylierung durch cGKII und PKA**

Das Experiment zeigt die Phosphorylierung zunächst durch die cGKII und anschließend durch die Zugabe von löslicher PKA bei einer CFTR-cGKII koexprimierenden Oozyte. Die Badlösung: BS2 enthielt 4 mM Chlorid. Auch mehr als 30 Minuten nach der Phosphorylierung konnten die Kanäle noch durch MgATP-Zugabe ohne Kinasestimulierung geöffnet werden.

In einigen Messungen wurden durch die Aktivierung mit cGMP Ströme von mehr als 10 nA induziert, was belegt, dass die cGKII, sowohl in ausreichender Menge in der Patchmembran vorlag, als auch mit einer, der löslichen PKA vergleichbaren Aktivität den CFTR phosphorylieren kann. In den meisten Messungen rief die Perfusion mit löslicher PKA auch nach der Phosphorylierung durch die cGKII eine durchschnittliche Stromzunahme um das sechsfache hervor. Die Abb. 3.4-5 zeigt ein Experiment, bei dem die Phosphorylierung durch die cGKII einen Strom von mehr als einem Nanoampere induzierte und die anschließende PKA-Zugabe diesen Strom auf etwa 3,3 Nanoampere erhöhte. Das mittlere Signal von 1081 pA bei erstmaliger cGMP/MgATP-Zugabe in CFTR-cGKII koexprimierenden Oozyten war zweieinhalbmal geringer als der durchschnittliche PKA-induzierte Strom (bei nur CFTR exprimierenden Zellen). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Koexpression der cGK-II möglicherweise die maximalen stationären Chloridströme begrenzte und neben der CFTR-Expression nicht in allen Messungen gleich groß war.

Es war möglich, zwei Patches aus einer Oozyte von zwei unterschiedlichen Stellen der Zelloberfläche zu gewinnen. Während bei dem ersten Patch auch unter PKA-Zugabe kein Strom von mehr als 20 pA zu beobachten war, genügte bei der zweiten Messung die Applikation von cGMP, um Chloridströme von mehr als 500 pA zu induzieren (nicht gezeigt). Dies bestätigte, dass es Ungleichverteilungen der CFTR-Kanaldichte in der Plasmamembran gab, die zu großen Schwankungen in den Chloridströmen im Patch führten. Versuchsweise wurde den Oozyten an drei verschiedenen Stellen eine entsprechend geringere cRNA-Menge injiziert. Da aber auch unter diesen Bedingungen weiterhin große Schwankungen innerhalb der Oozyten aus einer Präparation auftraten, wurde diese Methode nicht beibehalten. Da in 80 % der Messungen (n=98) die initiale cGMP-Stimulierung der cGKII zu CFTR-Chloridströmen von mindestens 60 pA (Abb. 3.4-6) führte, war diese Methode der CFTR-Phosphorylierung sowohl für kinetische Auswertungen, als auch zur Untersuchung der stationären Ströme unter verschiedenen Bedingungen ideal für die Messungen an isolierten Makropatches.

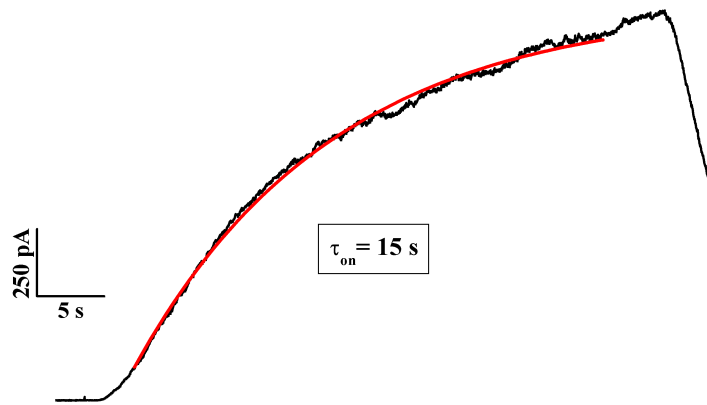


**Abb. 3.4-6** Statistik der durch ATP-Zugabe hervorgerufenen CFTR-Chloridströme bei Präphosphorylierung durch die cGKII

Gezeigt sind die durchschnittlichen Ströme, die durch alleinige ATP-Zugabe (500  $\mu$ M) nach der initialen Phosphorylierung durch die Stimulierung der cGKII induziert wurden. Da keine Gewichtung erfolgte, bewirken wenige Messungen mit sehr hohen Strömen eine Erhöhung des Mittelwertes. Die Häufigkeitsverteilung zeigt, dass in ca. 40 % der Messungen Chloridströme von 100 bis 500 pA gemessen wurden.

### 3.4.3 Kinetik unter cGKII-Einfluss

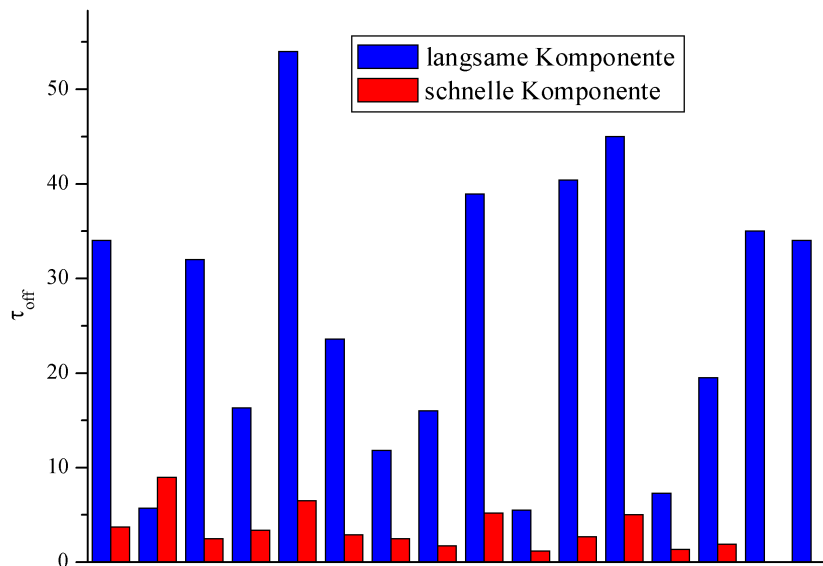
French et al. berichteten von Abweichungen in der Phosphorylierungskinetik des CFTR, obwohl diese Kinasen nah verwandt sind [43]. Der in den Zwei-Elektroden-Voltage-clamp-Messungen beobachtete Unterschied in der Phosphorylierungskinetik konnte nicht eindeutig auf die Kinasen zurückgeführt werden, weil in der ganzen Zelle viele weitere Effektoren (Strukturproteine, AKAPs u.a.) vorhanden sind. Im isolierten Makropatch hingegen war ein direkter Vergleich möglich. Allerdings ist ebenso wie bei den BR-PKA-Messungen nicht gewährleistet, dass eine, in Bezug auf die CFTR-Phosphorylierung, sättigende cGKII-Konzentration vorlag. Somit ist es wahrscheinlich, dass die zu 88 s bestimmte mittlere Zeitkonstante für den Stromanstieg bei erstmaliger cGMP/ATP-Zugabe nicht eindeutig eine veränderte Phosphorylierungskinetik im Vergleich zur Aktivierung mit löslicher PKA (21 s) widerspiegelt. Durch eine unterschiedliche cGKII-Expression ließe sich auch die beobachtete sehr starke Variabilität der ermittelten Zeitkonstanten (zwischen 15 und 300 s) erklären.



**Abb. 3.4-7 Kinetik der CFTR-Phosphorylierung durch die cGKII**

Gezeigt ist eine Messung, bei der die Stromzunahme bei der ersten Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  cGMP und 500  $\mu\text{M}$  MgATP monoexponentiell ( $\tau=15$  s) angepasst werden konnte.

Der Schließvorgang im Anschluss an die initiale Aktivierung ließ sich biexponentiell anpassen, wobei sowohl die langsame, als auch die schnelle Komponente zwischen den einzelnen Experimenten stark variierte, was Abb. 3.4-8 zeigt. Ebenso wie bei den Messungen mit der BR-PKA trug auch bei den CFTR-Messungen unter cGKII Koexpression die langsame Komponente bei erstmaligem Schließen den größeren Anteil an dem beobachteten Strom. Das Amplitudenverhältnis betrug durchschnittlich:  $A_{\text{langsame Komponente}} / A_{\text{schnelle Komponente}} = 1,7 \pm 0,5$ .



**Abb. 3.4-8 Übersicht über die Schließkinetiken bei erstmaligem ATP+cGMP-Entzug**

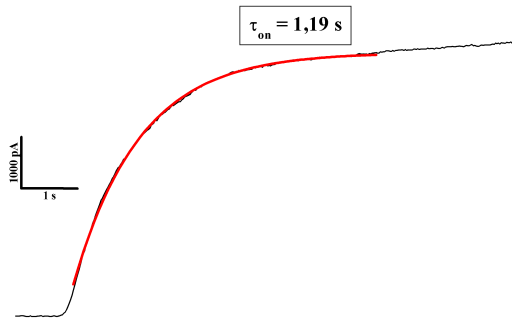
Abgebildet sind jeweils die langsame (blau) und die schnelle Komponente (rot) aus der mono- bzw. biexponentiellen Anpassung nach ATP-Entzug im Anschluss an die Phosphorylierung mit cGKII. Die Anpassungen wurden unter der Vorgabe des Stromrückgangs auf 0 pA durchgeführt.

Die mittlere Schließrate für die Dephosphorylierung betrug  $0,038 \text{ s}^{-1}$ , die schnelle Rate wurde zu  $0,29 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Unter der Annahme, dass über den gesamten Messzeitraum bei gleichzeitiger ATP- und cGMP-Applikation immer eine Phosphorylierung erfolgte (vgl. 3.3.6), eigneten sich die Koexpressionsexperimente, um diesen Einfluss auf die Öffnungs- und Schließkinetik zu untersuchen. Die ATP-abhängige Öffnung (Abb. 3.4-9) bei cGKII-präphosphorylierten CFTR-Kanälen ergab eine durchschnittliche Relaxationsrate für die monoexponentielle Anpassung von  $0,95 \text{ s}^{-1}$ .

In zahlreichen Experimenten trat bei dem Öffnungsvorgang zusätzlich noch eine durchschnittlich zehnmal langsamere Komponente auf, die eine deutlich (mindestens dreifach) geringere Amplitude besaß und bei der kinetischen Auswertung aufgrund der großen Varianz unberücksichtigt blieb. Der Wert für die schnelle Zeitkonstante stimmte sowohl mit der Rate für die Kanalöffnung bei PKA-Präphosphorylierung ( $0,8 \text{ s}^{-1}$ ), als auch mit der bei BR-PKA-Phosphorylierung ( $0,97 \text{ s}^{-1}$ ) überein. Dies zeigte, dass entweder die Art und "Intensität" der Präphosphorylierung keinen Einfluss auf die Öffnungskinetik hatte, oder, was wahrscheinlicher ist, andere Faktoren limitierend für die Öffnungsrate waren. Die kinetischen Anpassungen bei Wechseln von ATP-freier Lösung zu einer Badlösung mit MgATP und cGMP, im Anschluss an die Phosphorylierung zu Messbeginn, zeigten keine deutliche Änderungen der beobachteten schnellen Relaxationsraten, auch die oben beschriebene langsame Komponente änderte sich nicht wesentlich.

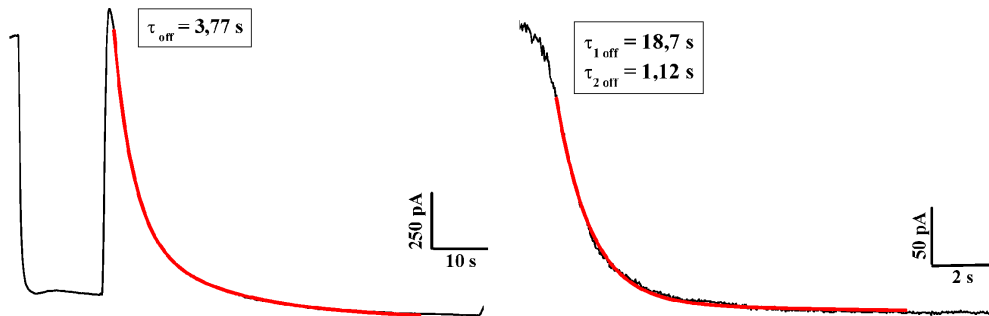
Die Untersuchung der Schließvorgänge bei MgATP-Entzug ergab, dass die Phosphorylierung durch die cGKII weder die langsame, noch die schnelle Komponente des Schließens beeinflusste. Allerdings war zur kinetischen Beschreibung des Stromverlaufs, wie auch bei den BR-PKA-Koexpressionsexperimenten, in den meisten Experimenten eine biexponentielle Funktion erforderlich (Abb. 3.4-11). Die Ratenkonstanten konnten zu  $0,68 \text{ s}^{-1}$  und  $0,036 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden, wobei kein Unterschied zwischen dem Lösungswechsel MgATP→BS2 und dem Wechsel MgATP + cGMP → BS2 festzustellen war.





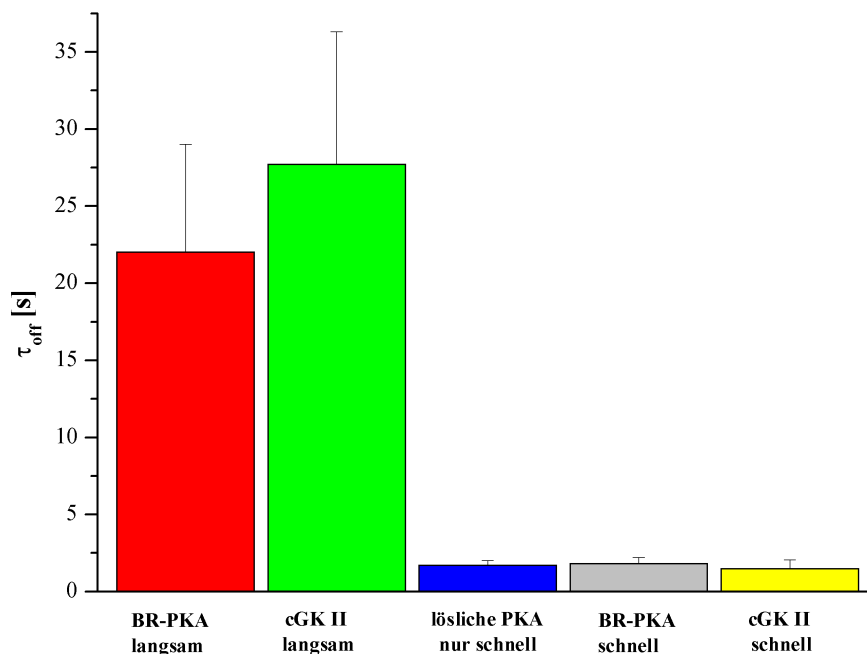
**Abb. 3.4-9 Öffnungskinetik bei cGKII-präphosphorylierten Oozyten**

Die Abbildung zeigt die Zunahme des Chloridstroms bei MgATP-Zugabe (500  $\mu$ M). Zu Beginn der Messung erfolgte die Phosphorylierung durch die Zugabe von MgATP und cGMP. Der Signalverlauf konnte monoexponentiell angepasst werden, was in der gezeigten Messung eine Zeitkonstante von 1,19 s ergab.



**Abb. 3.4-10 Schließkinetik bei ATP-Entzug**

Die Wegnahme von MgATP rief bei durch die cGKII präphosphorylierten CFTR-Kanälen einen Stromrückgang hervor, der in dem links gezeigten Experiment monoexponentiell, in der rechten Abbildung biexponentiell angepasst werden konnte. Die Messbedingungen unterschieden sich nur in der vorliegenden Chloridkonzentration in der Badlösung mit MgATP (links: 146 mM, rechts: 4 mM).



**Abb. 3.4-11 Schließkinetik in Abhängigkeit von der Art der Phosphorylierung**

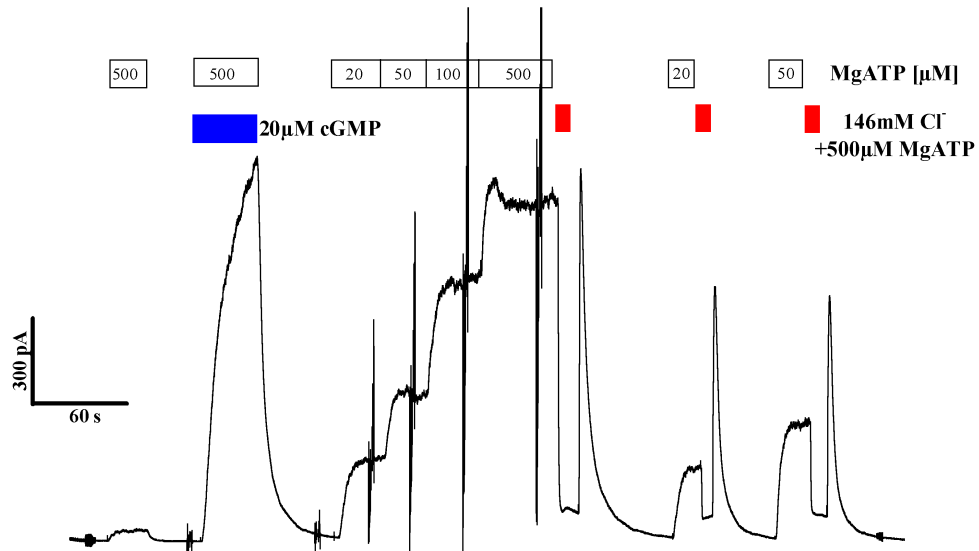
Gezeigt sind die mittleren Geschwindigkeitskonstanten des Schließvorgangs bei dem Wechsel von einer Lösung mit MgATP [500  $\mu$ M] zu einer Lösung ohne ATP. In allen ausgewerteten Experimenten wurde der "Offset" für die Anpassung auf 0 pA gesetzt.

In Abb. 3.4-11 sind die ermittelten Ratenkonstanten bei ATP-Entzug für die drei vorgestellten Methoden der Phosphorylierung zusammengefasst. Aus dem Vergleich geht eindeutig hervor, dass die Phosphorylierung das schnelle Schließen der Kanäle bei ATP-Entzug nicht beeinflusste.

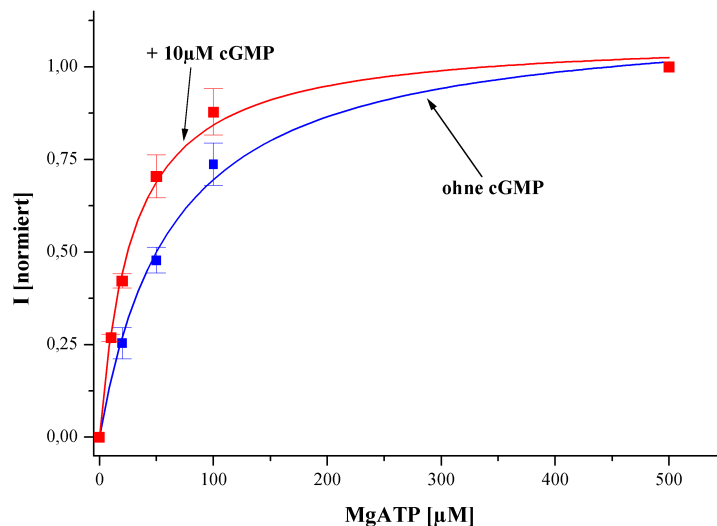
### 3.4.4 ATP-Affinität

Durch die Koexpressionsexperimente mit BR-PKA wurde belegt, dass unter den Bedingungen der kontinuierlichen Phosphorylierung die apparente Affinität des CFTR zu dem Substrat MgATP erhöht wurde. Eine direkte Beeinflussung des CFTR durch das BR-PKA kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Somit ist die Vergleichbarkeit mit den Messungen, in denen mit löslicher PKA phosphoryliert wurde, eingeschränkt. Im Gegensatz hierzu ist bei der Koexpression der cGKII ein einfacher Vergleich von hoch und niedrig phosphoryliertem Zustand unter identischen Bedingungen möglich. Hierzu wurden die Chloridströme bei Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen an ATP, sowohl in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  cGMP - was zu einem hoch phosphorylierten Zustand führen sollte - als auch in Abwesenheit von cGMP bestimmt. Da innerhalb einer Messung nur eine begrenzte Anzahl an unterschiedlichen Badlösungen verwendet werden konnte, war es nicht möglich, bei ein- und demselben Patch diese Bestimmungen durchzuführen. Um eventuelle zeitabhängige Veränderungen, wie die Abnahme des Maximalstroms aufgrund des Rundowns (s.u.), zu berücksichtigen, bzw. eine mögliche  $K_M$ -Verschiebung durch zunehmende Dephosphorylierung auszuschließen, wurde, wie bei den BR-PKA-Messungen, innerhalb der einzelnen Messungen mehrfach die ATP-Affinität bestimmt. Ausgehend von einer Michaelis-Menten Kinetik ergaben sich die in Abb. 3.4-13 gezeigten Konzentrationsabhängigkeiten (Hillkoeffizient=1). Diese Auftragung belegt, dass die Anwesenheit von cGMP in der Badlösung die Affinität des CFTR zum Substrat MgATP deutlich erhöht, so dass der apparente  $K_M$  von  $64 \pm 7 \mu\text{M}$  auf  $29 \pm 3 \mu\text{M}$  abfiel. Der, verglichen mit den Messungen mit löslicher PKA, etwas niedrigere  $K_M$  wies auf eine stabilere Phosphorylierung durch die cGKII hin, die möglicherweise auf die erheblich längere Aktivierung der Kinase zu Messbeginn im Vergleich zu der Dauer der PKA-Perfusion zurückzuführen ist. Die Messungen in Gegenwart von cGMP in allen ATP-Lösungen belegt außerdem, dass die cGKII über den gesamten

Messzeitraum (bis zu 80 Minuten) den CFTR phosphorylieren konnte. Es war keine gerichtete Änderung zu einer geringerer ATP-Affinität des CFTR zu beobachten, wie es bei Abnahme der Phosphorylierung zu erwarten wäre (nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnte die Koexpression der cGKII genutzt werden, um eindeutig einen Einfluss der Phosphorylierung auf den Rundown zu bestätigen bzw. auszuschließen.



**Abb. 3.4-12 MgATP-Titration nach initialer CFTR-Phosphorylierung durch die cGKII**  
Gezeigt sind die Chloridströme, die durch unterschiedliche ATP-Konzentrationen nach einmaliger Phosphorylierung durch cGMP (20  $\mu\text{M}$ ) + MgATP bei CFTR+cGKII-Koexpression hervorgerufen wurden.

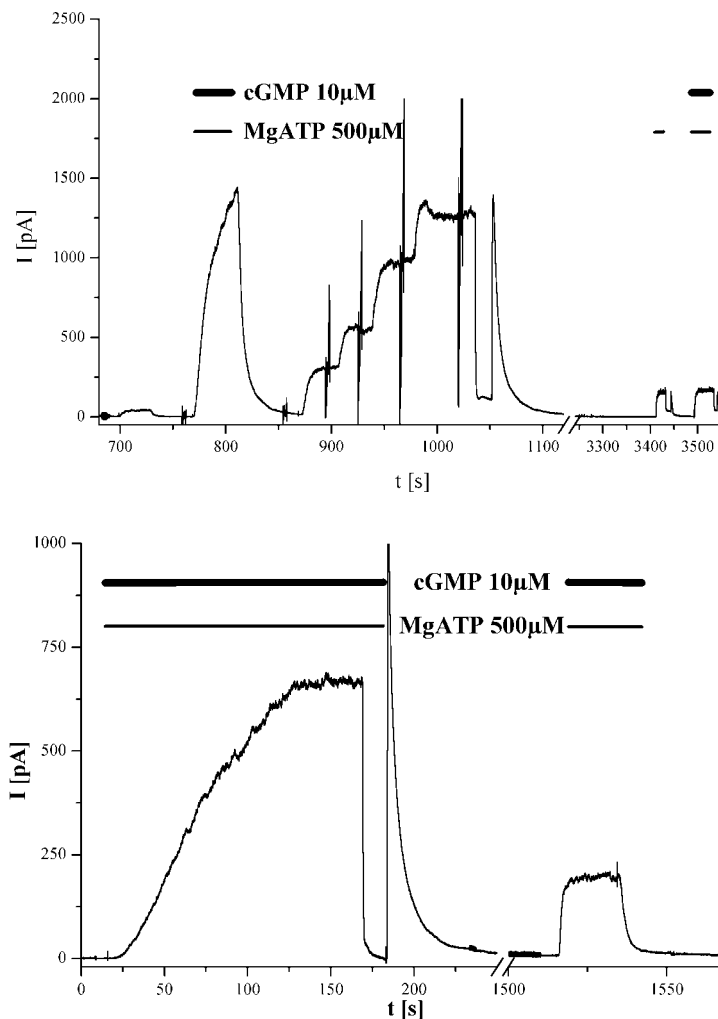


**Abb. 3.4-13 ATP-Affinität mit und ohne cGMP**

Abhängigkeit der Chloridströme von  $[\text{MgATP}]$  bei nur initialer (blau) und bei permanenter cGMP (10  $\mu\text{M}$ )-Anwesenheit. (alle Punkte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Patches). Beide Konzentrationsabhängigkeiten konnten mit einer einfachen Michaelis-Menten-Funktion angepasst werden. Die so bestimmten apparenten Halbsättigungskonzentrationen betragen  $29 \pm 3 \mu\text{M}$  in cGMP-Anwesenheit und  $64 \pm 7 \mu\text{M}$  bei nur initialer cGMP-Zugabe.

### 3.4.5 Phosphorylierungsabhängigkeit des Rundowns

Wenn die unter 3.2.2 beschriebene zeitabhängige Stromabnahme durch die Änderungen im Phosphorylierungsgrad verursacht wird, so müssten Änderungen in der Phosphorylierung zu Unterschieden im Rundown führen. Die Abb. 3.4-14 zeigt die Änderung des Stroms im Verlauf der Messung, sowohl bei kontinuierlicher, als auch bei ausschließlich initialer cGMP-Zugabe. Unabhängig davon, ob die cGMP-Applikation permanent oder nur initial erfolgte, war der CFTR-vermittelte Chloridstrom nach 30 Minuten auf durchschnittlich 42 % des anfänglichen Signals zurückgegangen (n=16). Dieses belegt eindeutig, dass die Dephosphorylierung der Serin/Threonin-Reste, die durch die cGKII und PKA phosphoryliert werden, nicht die Ursache des Rundowns sein kann.



**Abb. 3.4-14 cGMP-Abhängigkeit des Rundown**

Oben: Rundown bei nur initialer Phosphorylierung. Unten: In allen ATP-Lösungen war auch cGMP anwesend. Es waren keine größeren Unterschiede festzustellen. Aus beiden gezeigten Messungen ging außerdem hervor, dass die erneute cGMP-Zugabe keine Stromzunahme mehr induzierte.

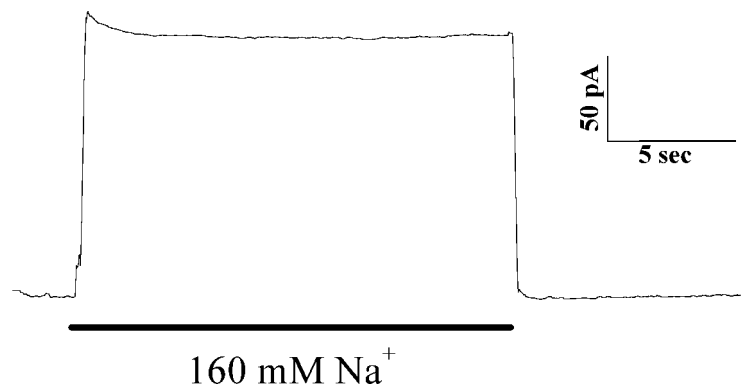
### 3.5 Inhibiert der CFTR den epithelialen Natriumkanal?

1981 entdeckte Knowles, dass bei Patienten mit zystischer Fibrose eine erhöhte transepitheliale Potenzialdifferenz auftrat, die bei Einsatz des Diuretikums Amilorid, welches den ebenfalls im Epithel exprimierten amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanal (ENaC) hemmt [75], deutlich zurückging [75]. Dieser Kanal ist an der Regulation des Ein- bzw. Ausstroms von Natrium in epithelialen Zellen beteiligt. Defekte dieses Kanals führen zu schweren Krankheiten, wie zum Beispiel dem Liddle-Syndrom und dem Pseudohypoaldosteronismus Typ I. Der Kanal besteht aus drei nichtidentischen, aber homologen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , wobei die  $\alpha$ -Untereinheit zur Ausbildung einer Natriumleitfähigkeit ausreicht, die Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit aber die Proteindichte in der Membran um das hundertfache erhöht [18]. Jede dieser Untereinheiten durchspannt die Membran zwei Mal und verfügt über eine große extrazelluläre Schleife und kurze intrazelluläre N- und C-terminale Domänen. Der Natriumkanal ist durch Amilorid inhibierbar und tritt in vielen epithelialen, aber auch anderen Geweben auf.

Stutts et al. beschrieben 1995 einen direkten inhibitorischen Einfluss des aktivierten CFTR auf den ENaC und vermuteten, dass diese Hemmung eine mögliche Ursache für die schwerwiegenden Folgen einer zystischen Fibrose ist [131]. In den zahlreichen Publikationen der letzten Jahre wurden widersprüchliche Beobachtungen hinsichtlich der CFTR-ENaC-Wechselwirkung veröffentlicht. Reddy et al. [111] fanden beispielsweise in den Schweißdrüsen eine Stimulation des Natriumkanals bei Aktivierung von CFTR unter den Bedingungen der Stromklemme. Es wurde aber auch über eine Stimulation des CFTR durch ENaC berichtet, welche aus Ganzzellmessungen an *Xenopus*-Oozyten hervorging [70]. Einen direkten Zugang zur Untersuchung möglicher Interaktionen liefert das System des isolierten Makropatches. Aus diesem Grund wurden entsprechende Versuche mit Oozyten, welche beide Kanäle koexprimierten, durchgeführt. Die Ergebnisse werden in der Diskussion mit den Resultaten aus Messungen, die zeitgleich von G. Nagel durchgeführt wurden [99], verglichen.

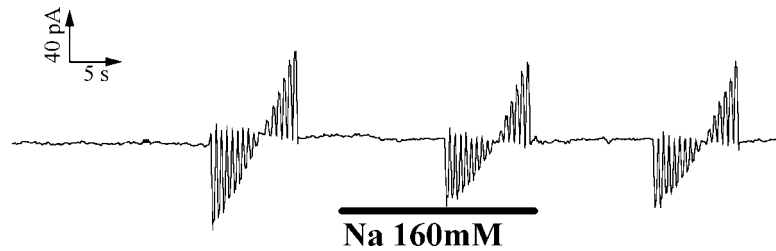
### 3.5.1 ENaC-Charakterisierung im isolierten Makropatch

Die heterologe Koexpression von CFTR und epitheliale Natriumkanal (ENaC) erfolgte wie unter (2.4) beschrieben. Zusätzlich wurde bei einem Teil der Messungen den Oozyten auch die cRNA der cGMP-abhängigen Proteinkinase II injiziert. Da der Zeitraum von der Injektion bis zur ausreichenden Expression bei CFTR (3-4 Tage) und ENaC (24 Stunden) unterschiedlich war, wurden die cRNAs separat injiziert. Hierbei wurde darauf geachtet, möglichst beide Injektionen am vegetalen Pol vorzunehmen, um eine eventuelle ungleichmäßige Verteilung der Proteine zu vermeiden. An diesem Pol wurden auch vorwiegend die Patches abgezogen. Weiterhin war es notwendig, den ENaC während der Expressionsphase durch die Zugabe von 10-100  $\mu\text{M}$  des potenten Natriumkanalinhibitors Amilorid ( $K_i = 100 \text{ nM}$ ) zu inhibieren, da die konstitutive Kanalaktivität bei der üblichen natriumhaltigen Ori-Lösung zu einem dauerhaften Natriumeinstrom geführt hätte. Wurde dieses Amilorid nicht zugegeben, starben die Zellen nach kurzer Zeit ab. Um die Aktivität des ENaC im isolierten Patch zu untersuchen, genügte ein Umschalten von einer natriumfreien Lösung zu einer Badlösung mit Natrium. In der Pipettenlösung, welche in der *inside-out* Konfiguration der Extrazellulärlösung entsprach, befand sich kein Natrium, weswegen der Lösungswechsel zu einem sofortigen, vollständig reversiblen Auswärtsstrom führte.



**Abb. 3.5-1 Aktivierung des ENaC im isolierten Makropatch**

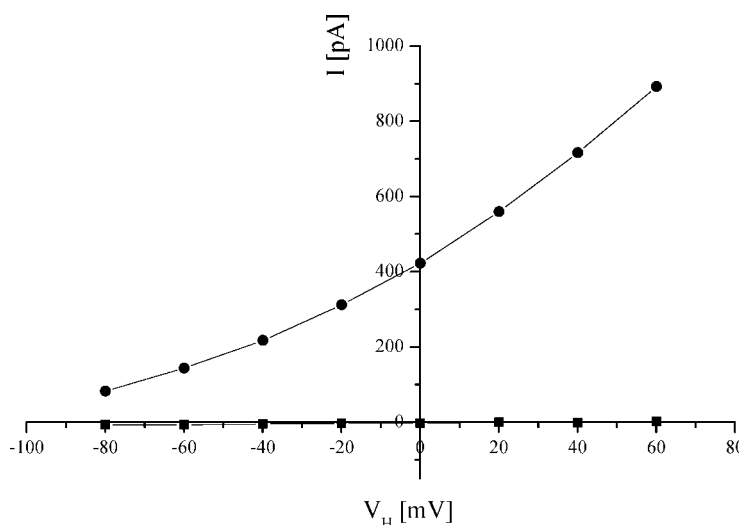
Gezeigt ist die Stromzunahme bei einem Lösungswechsel von BS2 (ohne Natrium) zu einer Badlösung mit 160 mM Natrium und der anschließende Stromrückgang bei der Wegnahme des Natriums in einem isolierten Patch von einer ENaC-exprimierenden Zelle ( $V_H = 0 \text{ mV}$ ).



**Abb. 3.5-2 Bei uninjizierten Oozyten rief die Natriumzugabe keine Ströme bei einem Haltepotenzial von 0 mV hervor**

Unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 3.5-1 rief die Natriumzugabe bei Patches von Kontrollzellen keinen Strom hervor. Während der Perfusion mit der jeweiligen Lösung wurden Spannungspulse angelegt, die die beobachteten kurzzeitigen Stromänderungen hervorriefen (siehe Abb. 3.5-4).

Die Krümmung der in Abb. 3.5-3 gezeigten Strom-Spannungskennlinie des  $\text{Na}^+$ -Stroms ist darauf zurückzuführen, dass die Pipettenlösung kein Natrium enthielt und somit ein starker Konzentrationsgradient zwischen Extra- und Intrazellulärseite bestand. Dieser führte entsprechend der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung zu einer Leitfähigkeitsabnahme ( $7,8 \text{ nS} \rightarrow 3,8 \text{ nS}$ ), wenn die Haltespannung negativer wurde. Die verwendete BS2-Lösung enthielt keine Ionen, die den Natriumkanal permeieren konnten, so dass die Leitfähigkeit in Abwesenheit von Natrium nur  $78 \text{ pS}$  betrug. Die Ströme im isolierten Makropatch von Oozyten, die durch den ENaC bei einer Haltespannung von  $0 \text{ mV}$  hervorgerufen wurden, differierten zwischen  $10$  und  $750 \text{ pA}$ , wobei der durchschnittlich beobachtete Natriumstrom  $131 \text{ pA}$  betrug ( $n = 57$ ).

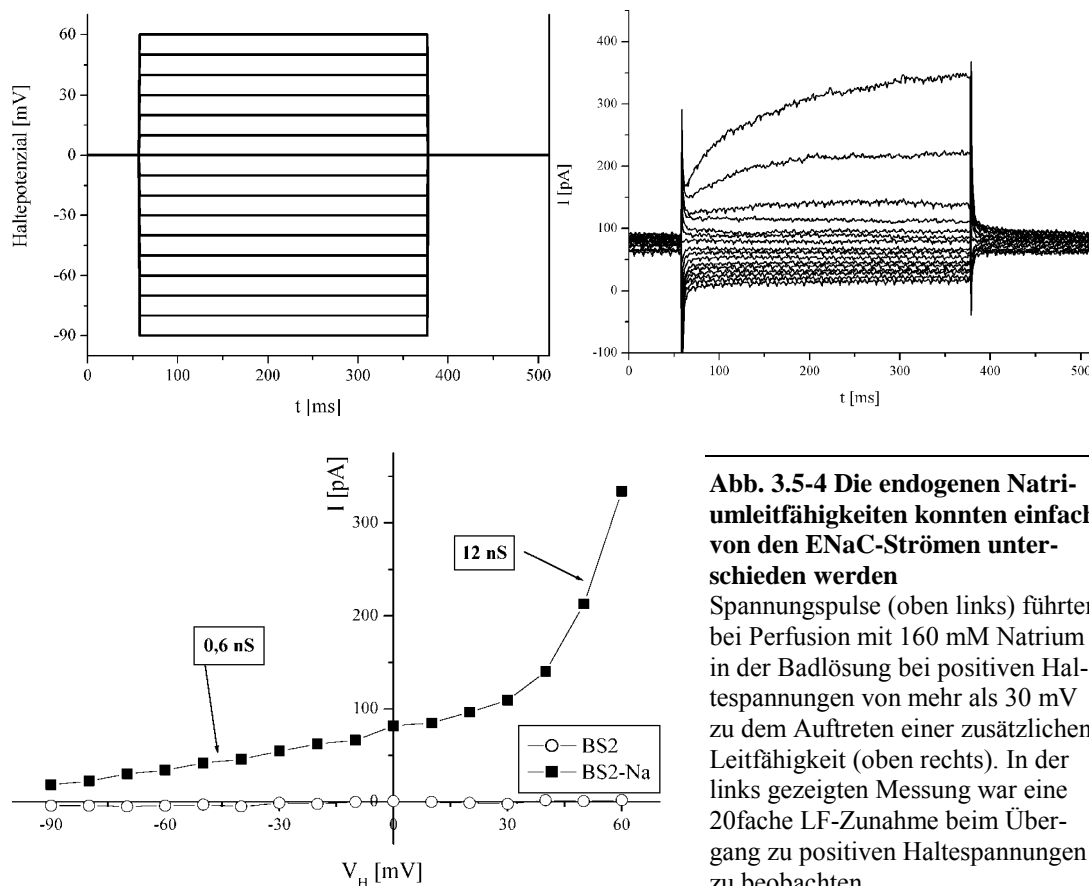


**Abb. 3.5-3 Spannungsabhängigkeit des Natriumstroms**

Die Linie mit (●) zeigt die Spannungsabhängigkeit des ENaC-Stroms bei Perfusion mit  $160 \text{ mM}$  Natrium in der Badlösung, die Linie mit (■) gibt den Leckstrom in Natriumabwesenheit wieder. In der hier gezeigten Messung betrug die Leckleitfähigkeit  $61 \text{ pS}$ , was einem Sealwiderstand von  $16 \text{ G}\Omega$  entspricht.

### 3.5.2 Endogene Natriumleitfähigkeiten

Neben den durch die heterolog exprimierten Kanalproteine hervorgerufenen Strömen verfügt die Oozyte auch über endogene Natriumleitfähigkeiten [148]. Diese traten in den Patch-clamp Messungen im Gegensatz zu den ENaC-Strömen nur über einen begrenzten Spannungsbereich auf und waren auf spannungsaktivierte Natriumkanäle zurückzuführen [112]. Diese Kanäle werden erst bei starker Depolarisierung oder längerer Perfusion mit natriumhaltiger Badlösung bei niedrigerer Haltespannung (J. Rettinger, pers. Mitteilung) aktiviert und gehen bei der Rückkehr zu nicht depolarisierenden Haltespannungen wieder zurück, was durch die hier gezeigten Messungen bestätigt wurde. Diese Kanäle konnten bei gleichzeitiger Aktivierung des epithelialen Natriumkanals einfach von diesem unterschieden werden (Abb. 3.5-4). Sie waren sehr unterschiedlich stark exprimiert, so dass in einigen Messungen keine endogenen Leitfähigkeiten zu beobachten waren, während in anderen bei +60 mV Ströme von mehr als 300 pA auftraten.



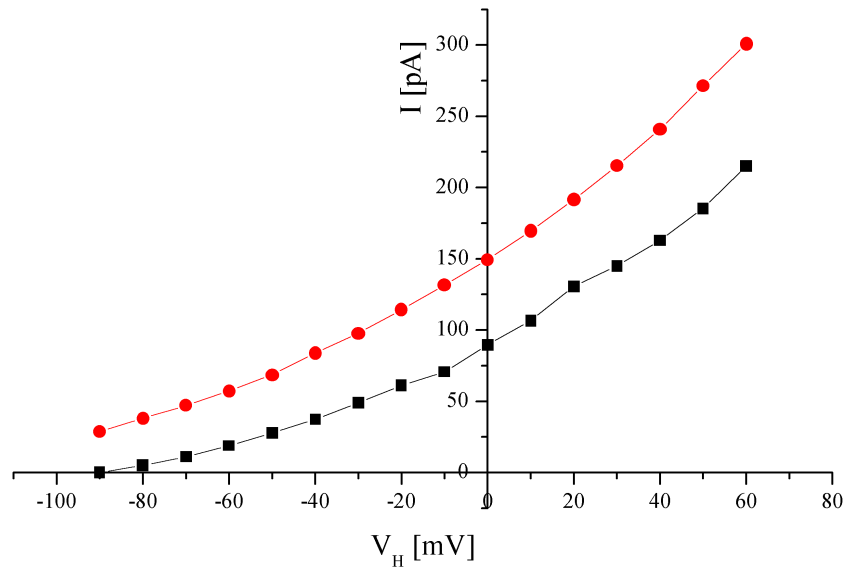
**Abb. 3.5-4 Die endogenen Natriumleitfähigkeiten konnten einfach von den ENaC-Strömen unterschieden werden**

Spannungspulse (oben links) führten bei Perfusion mit 160 mM Natrium in der Badlösung bei positiven Haltespannungen von mehr als 30 mV zu dem Auftreten einer zusätzlichen Leitfähigkeit (oben rechts). In der links gezeigten Messung war eine 20fache LF-Zunahme beim Übergang zu positiven Haltespannungen zu beobachten.

Da die Chlorid- und Natriumkonzentrationsgradienten so gewählt wurden, dass sich die Ströme bei Spannungsänderungen gleichsinnig veränderten, konnten zur



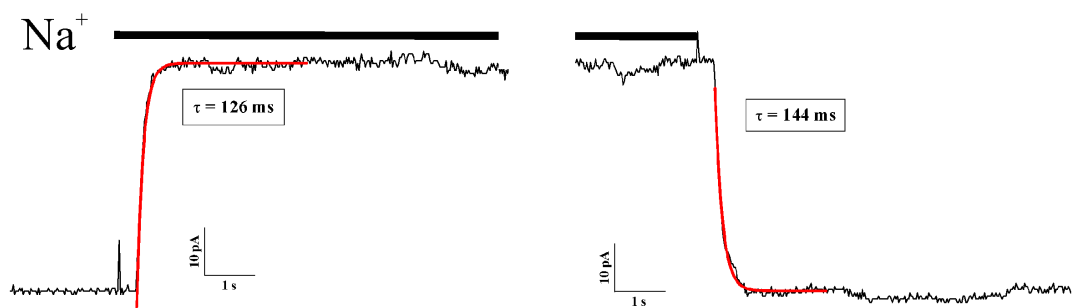
Bestimmung der jeweiligen Permeabilitäten Spannungsbereiche, in denen die endogenen Natriumkanäle geschlossen waren, betrachtet werden. Somit war es möglich, sich zur Charakterisierung der ENaC/CFTR-Wechselwirkung auf die stationären Ströme beim Standardhaltepotential von 0 mV zu beziehen (Abb. 3.5-5), so dass die spannungsaktivierten Natriumkanäle die Messungen nicht beeinträchtigten.



**Abb. 3.5-5 Strom-Spannungsabhängigkeit von ENaC und CFTR**

Die Badlösung zur CFTR-Aktivierung enthielt statt des Natriums 160 mM N-Methyl-D-Glucamin (NMG) und 500  $\mu$ M MgATP. Da in der Pipettenlösung kein Natrium vorhanden war, lag ein starker Na<sup>+</sup>-Gradient zwischen Bad- und Pipettenlösung an, der für das Chlorid umgekehrt war (Pipette/Bad=156/4 mM, CFTR: rote Kreise, ENaC: schwarze Quadrate).

### 3.5.3 Kinetik



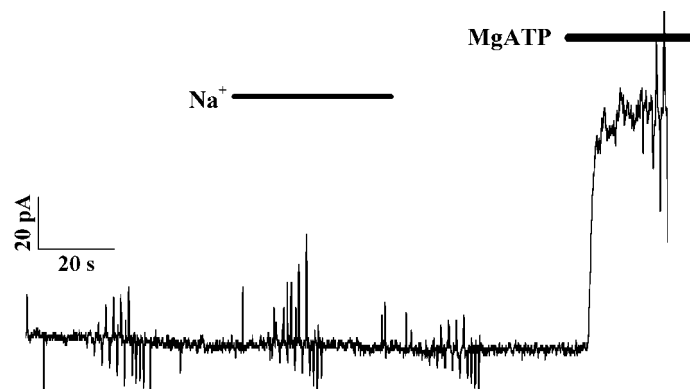
**Abb. 3.5-6 ENaC-Kinetik bei Natriumzugabe und -Wegnahme**

Die Stromänderung bei dem Wechsel zu einer natriumhaltigen Lösung (links, [Na<sup>+</sup>] = 160 mM) rief eine schnelle Stromzunahme hervor, deren monoexponentielle Kinetik (rote Linie) nur von der Lösungswchselgeschwindigkeit abhängig war. Ebenso konnte der Stromrückgang bei Natriumwegnahme (rechts) monoexponentiell angepasst werden ( $\tau_{\text{on}} = 126$  ms;  $\tau_{\text{off}} = 144$  ms). Der in der gleichen Messung durchgeführte Chloridkonzentrationswechsel bei aktiviertem CFTR (vgl. 3.2.5, nicht gezeigt) ergab eine Zeitkonstante für den Lösungswechsel von 123 ms.

Im Gegensatz zum CFTR ist der amilorid-sensitive epitheliale Natriumkanal (ENaC) konstitutiv geöffnet, so dass die durch Lösungswechsel hervorgerufene Stromänderungen ausschließlich durch die Geschwindigkeit des Lösungsaustauschs in der Messkammer bestimmt sind. Aus diesem Grund musste die Kinetik für die Stromzunahme bei Natriumzugabe und die Abnahme des Stroms bei Natriumentzug identisch sein. Dies konnte ebenso bestätigt werden wie die zu erwartende monoexponentielle Kinetik bei Natriumzugabe und -wegnahme aus der Badlösung (Abb. 3.5-6).

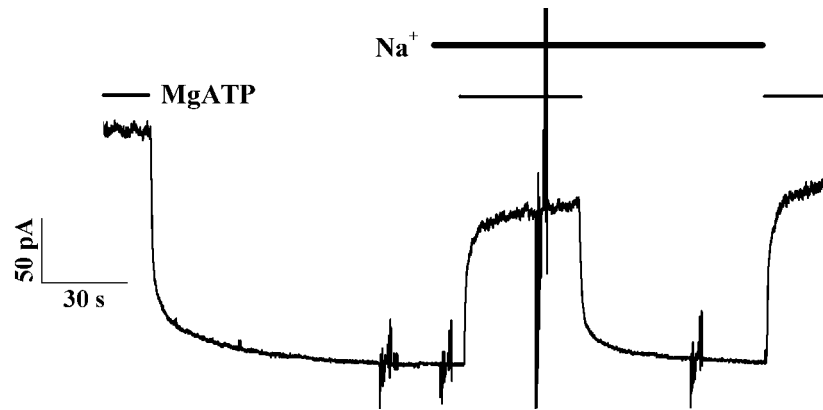
### 3.5.4 Wechselwirkung ENaC-CFTR

Bei alleiniger Expression des CFTR rief der Wechsel zwischen einer Lösung mit NMG und MgATP zu einer Badlösung mit Natrium und MgATP in den meisten Messungen nur geringfügige, transiente Stromänderungen hervor, die vermutlich auf Änderungen im Diffusionspotential aufgrund der unterschiedlichen Ionenbeweglichkeiten von NMG und Natrium zurückzuführen waren [101]. ATP-freie Lösungen mit Natrium zeigten keinen Effekt auf den CFTR (Abb. 3.5-7). Um bei der Koexpression von CFTR und ENaC sicherstellen zu können, dass im Mittel auch von einer möglichen topologischen Interaktion ausgegangen werden kann, müssen beide Proteine in ausreichender Menge in der Membran vorliegen. Die Koexpression von CFTR und ENaC induzierte Ströme, wie sie in Abb. 3.5-9 gezeigt sind. Die Einzelkanalleitfähigkeiten für CFTR und ENaC sind unter symmetrischen Bedingungen etwa gleich groß (10 pS), so dass unter den hier anliegenden Gradienten das Verhältnis der Natrium- und Chloridströme näherungsweise dem Verhältnis an aktiven Kanälen im Patch entspricht.



**Abb. 3.5-7 Effekt von Natrium auf CFTR exprimierende Oozyten**

In Abwesenheit von ATP rief die Zugabe von Natrium (160 mM) keine nennenswerten stationären Stromänderungen hervor.

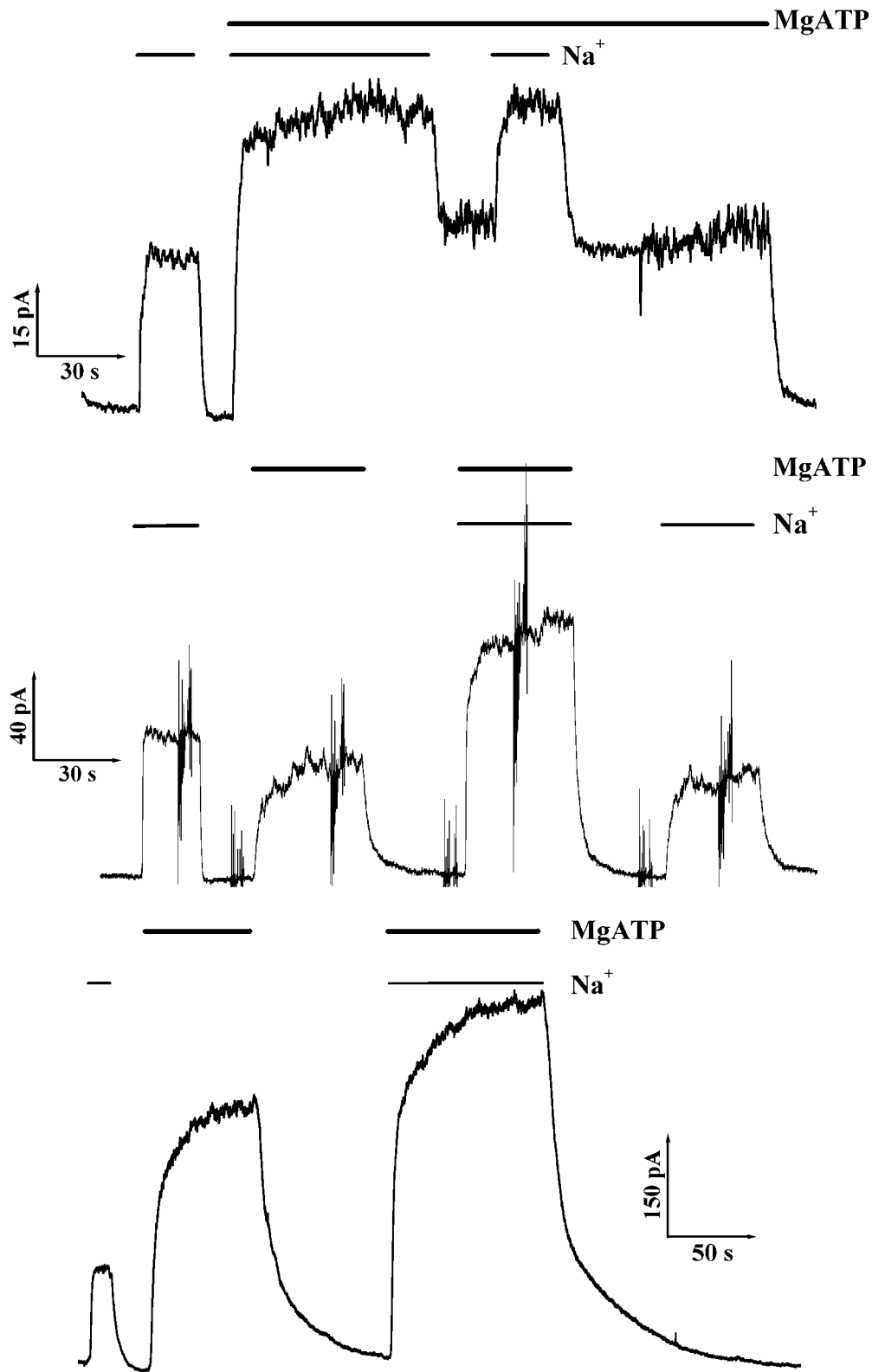


**Abb. 3.5-8 Einfluss von Natrium auf den Chloridstrom CFTR exprimierender Zellen**

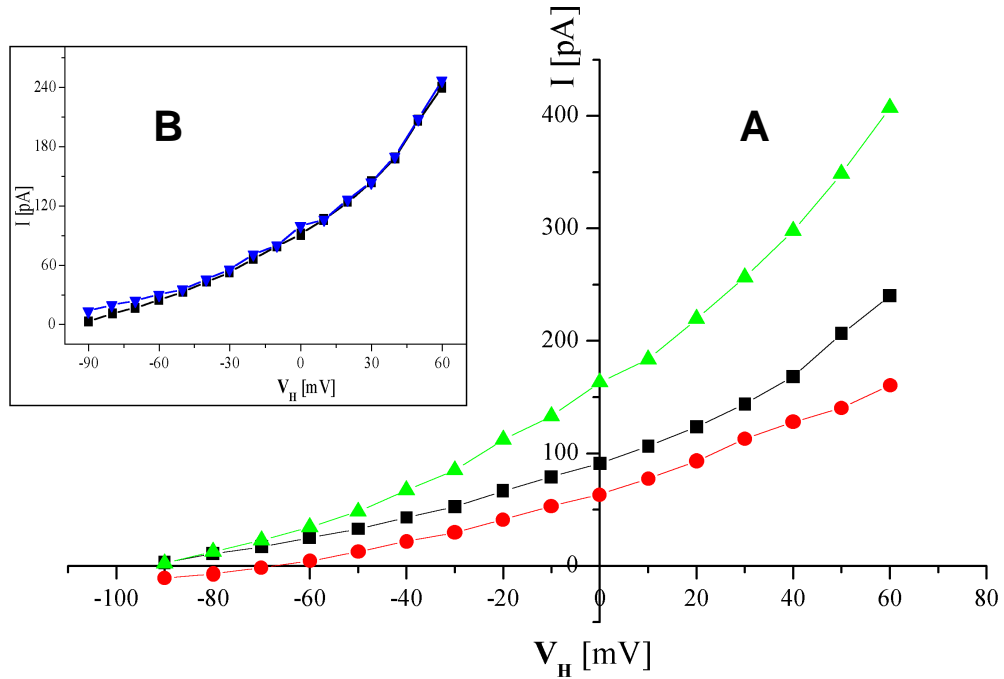
Der Austausch des N-Methylglucamins (NMG) in der Badlösung gegen Natrium (160 mM) rief bei CFTR-Aktivierung (500  $\mu$ M MgATP) keine Stromänderung hervor. Die geringe Abnahme des Chloridstroms wurde durch den Rundown verursacht.

Das Signal, welches durch die gleichzeitige Aktivierung von CFTR und ENaC hervorgerufen wurde, war deutlich größer als die jeweiligen Einzelströme. Die Additivität der Signale war unabhängig von dem jeweiligen Amplitudenverhältnis. Ein eventueller inhibitorischer Einfluss des CFTR auf den ENaC hätte sich eindeutig in der unteren Abbildung zeigen müssen, da in dieser Messung zum einen sowohl die Na-, als auch die Cl<sup>-</sup>-Ströme groß waren und vor allem der Chloridstrom dreieinhalbmal höher als der Natriumstrom war. Somit war gewährleistet, dass statistisch jeder in der Membran befindliche epitheliale Natriumkanal von genügend CFTR-Molekülen umgeben ist. Trotzdem war keine Inhibition zu beobachten.

Aus den Strom-Spannungskennlinien geht hervor, dass dieses für den gesamten untersuchten Spannungsbereich gilt (Abb. 3.5-10).

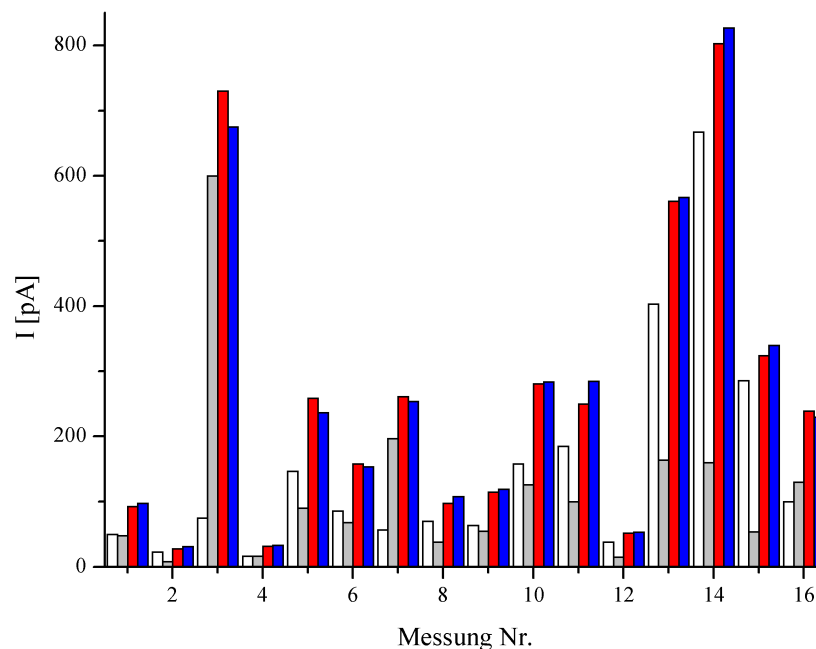


**Abb. 3.5-9 Gleichzeitige und separate Aktivierung von ENaC und CFTR**  
 Gezeigt sind drei unabhängige Messungen an Oozyten, die ENaC und CFTR koexprimieren. Unabhängig von dem Verhältnis bei separater Aktivierung von Natrium- bzw. Chloridleitfähigkeit war bei gleichzeitiger Aktivierung eine Additivität der Signale zu beobachten ( $[MgATP]=500 \mu M$ ;  $[Na^+] = 160 mM$ ).



**Abb. 3.5-10 Spannungsabhängigkeit der Interaktion von ENaC und CFTR**

(A) Dargestellt sind die aus Spannungspulsen erhaltenen Kennlinien bei der Messung an einer ENaC und CFTR koexprimierenden Zelle. Die rote Linie zeigt den Verlauf bei ausschließlicher CFTR-Aktivierung mit 500  $\mu$ M MgATP (ohne Natrium); die schwarze Linie den Verlauf bei der Perfusion mit 160 mM Natrium ohne ATP (reiner ENaC-Strom) und die grüne Linie symbolisiert den Verlauf bei gleichzeitiger Aktivierung. In B ist die Spannungsabhängigkeit der Natriumströme ohne (schwarze Quadrate) und mit gleichzeitiger CFTR-Aktivierung (blaue Dreiecke) gezeigt.



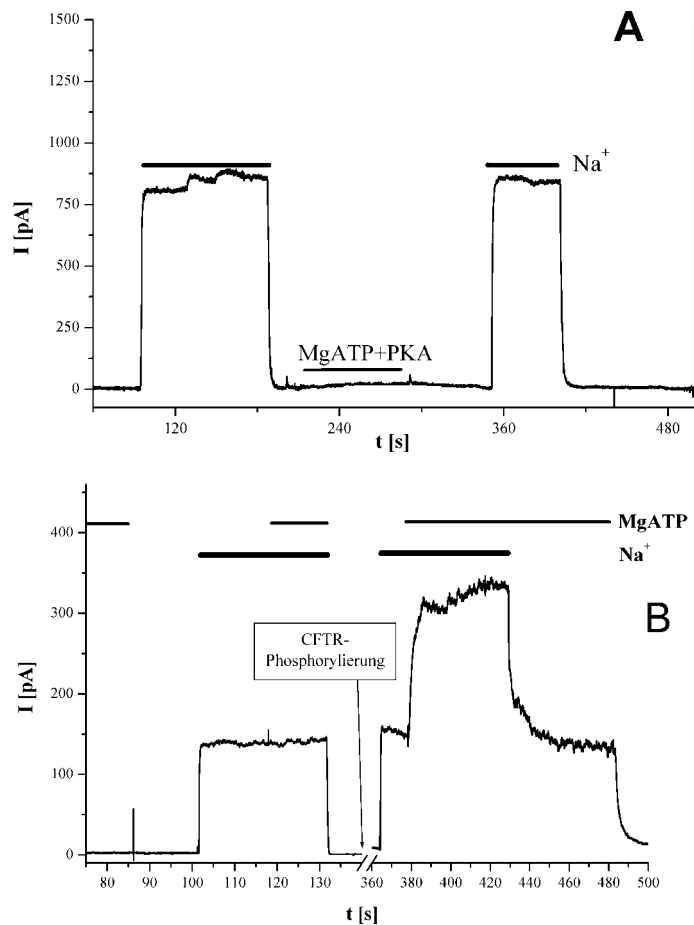
**Abb. 3.5-11 Einfluss des Amplitudenverhältnisses ENaC/CFTR-Strom**

Gezeigt sind die Ströme (0 mV) bei Aktivierung des ENaC (weiße Balken), bei CFTR-Stimulierung (grau) und bei gleichzeitiger Aktivierung (rot) im Vergleich zu der Summe aus den Einzelströmen CFTR/ENaC (blau). In allen 16 aufgeführten Messungen entsprach der gemessene Strom bei simultaner Stimulierung der Summe aus unabhängiger Stimulierung.

Die Natrium- und Chloridströme waren unabhängig vom jeweiligen Verhältnis additiv, wie aus Abb. 3.5-11 hervorging. Für 16 unabhängige Messungen sind sowohl die jeweiligen Signale bei separater Aktivierung von ENaC und CFTR und bei gleichzeitiger Stimulation gezeigt. Die Abbildung bestätigt, dass die gemessenen Signale bei gleichzeitiger Aktivierung mit der Addition der Einzelströme für alle dargestellten Messungen übereinstimmen.

### 3.5.5 Regulierung des ENaC durch Phosphorylierung und ATP

Die Notwendigkeit der Phosphorylierung zur Aktivierung des CFTR ermöglichte es, einen Einfluss des durch die vorhergehende Phosphorylierung aktivierten, aber wegen der ATP-Abwesenheit geschlossenen CFTR-Kanals auf den ENaC zu überprüfen. Hierzu war lediglich der Vergleich der Natriumleitfähigkeit vor und nach der Aktivierung des CFTR (mit cGMP+MgATP bzw. PKA + MgATP) erforderlich. Ein entsprechendes Experiment ist in Abb. 3.5-12 gezeigt.

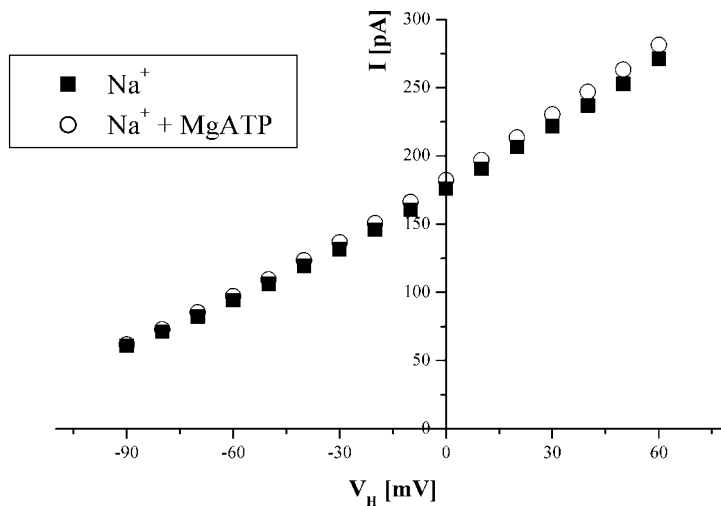


**Abb. 3.5-12 Die PKA beeinflusste den ENaC-Strom in isolierten Makropatches nicht**

In A ist eine Messung an einer ENaC-exprimierenden Oocyte gezeigt, in dem zwischen zwei Perfusionen mit natriumhaltiger Badlösung (160 mM) PKA (100 u/ml) und 500  $\mu$ M MgATP zugegeben wurde, was keinen Effekt auf die Signalamplitude (0 mV) hatte.

Die Abbildung B zeigt ein Experiment mit einer Zelle, die zusätzlich CFTR koexprimiert. Der Natriumstrom wurde nicht von der vorübergehenden CFTR-Aktivierung beeinflusst.

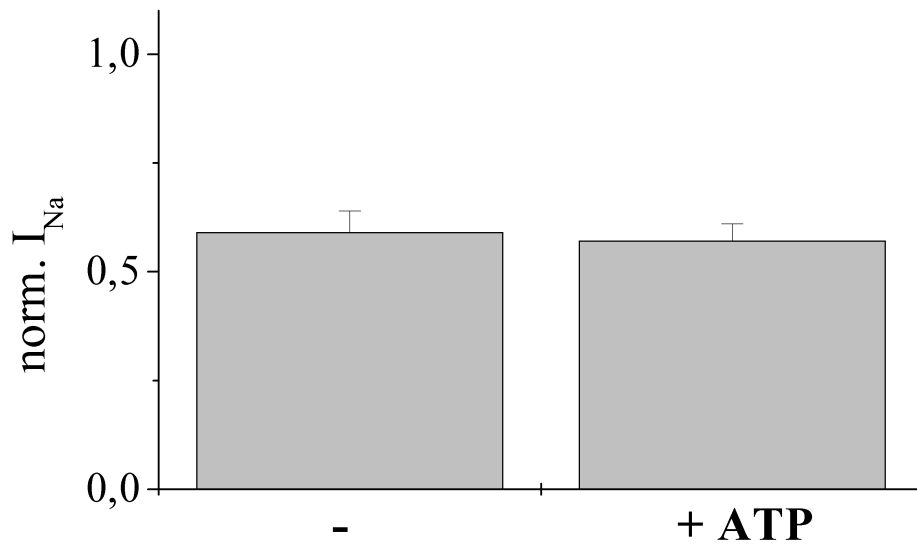
Der Natriumstrom war nach vorübergehender CFTR-Stimulierung unverändert. Da eine Zugabe von ATP vor der Phosphorylierung keinen Effekt auf den Natriumstrom hatte, musste die nach der Phosphorylierung beobachtete Stromzunahme bei ATP-Perfusion durch die CFTR-Stimulierung verursacht sein. Ein Einfluss der beiden verwendeten Ser/Thr-Proteinkinasen (cGKII und PKA kat. Untereinheit) auf den ENaC konnte nicht beobachtet werden. Dies widerspricht den Ergebnissen von Stutts et al. [131], bestätigt aber die Aussagen von Ismailov et al. [9], die in ihren Voltage-Clamp- bzw. lipid bilayer- Messungen keinerlei Beeinflussung durch die PKA fanden. Chalfant et al. konnten in excised patches ebenfalls keinerlei Regulation von ENaC feststellen [30].



**Abb. 3.5-13 Einfluss von MgATP auf den ENaC-Strom**

Über den gesamten Spannungsbereich rief die Perfusion mit MgATP (500  $\mu$ M) keine Änderung des Natriumstroms bei ENaC exprimierenden Oozyten hervor ( $[Na^+] = 160$  mM).

In Oozyten, denen nur die ENaC-cRNA injiziert wurde, rief die ATP-Zugabe über den gesamten untersuchten Spannungsbereich keine Veränderung der Natriumströme hervor (Abb. 3.5-13). Aus den gezeigten Messungen ergibt sich, dass unter den Bedingungen des isolierten Makropatches eine Inhibition des epithelialen Natriumkanals durch den CFTR, ebenso wie eine Stimulation des CFTR durch den ENaC, wie sie von Jiang et al. beschrieben wurde [70], auszuschließen ist. Abschließend ist eine entsprechende Zusammenfassung abgebildet, die belegt, dass weder eine inhibitorische, noch eine stimulatorische Wechselwirkung zwischen ENaC und CFTR im isolierten Makropatch besteht (Abb. 3.5-14).



**Abb. 3.5-14 Vergleich der durchschnittlichen Ströme bei ENaC+CFTR-Expression**

Gezeigt ist der normierte Natriumstrom von 16 unabhängigen Patches in Anwesenheit (rechts) und Abwesenheit von ATP (links) (normiert auf den Gesamtstrom in Gegenwart von Natrium und ATP. In allen ausgewerteten Experimenten (n=16) betrug die eingesetzte Natriumkonzentration 160 mM; [MgATP]=500  $\mu$ M. Die Chloridkonzentration betrug in allen Messungen 4 mM in der jeweiligen Badlösung und 156 mM in der Pipettenlösung.

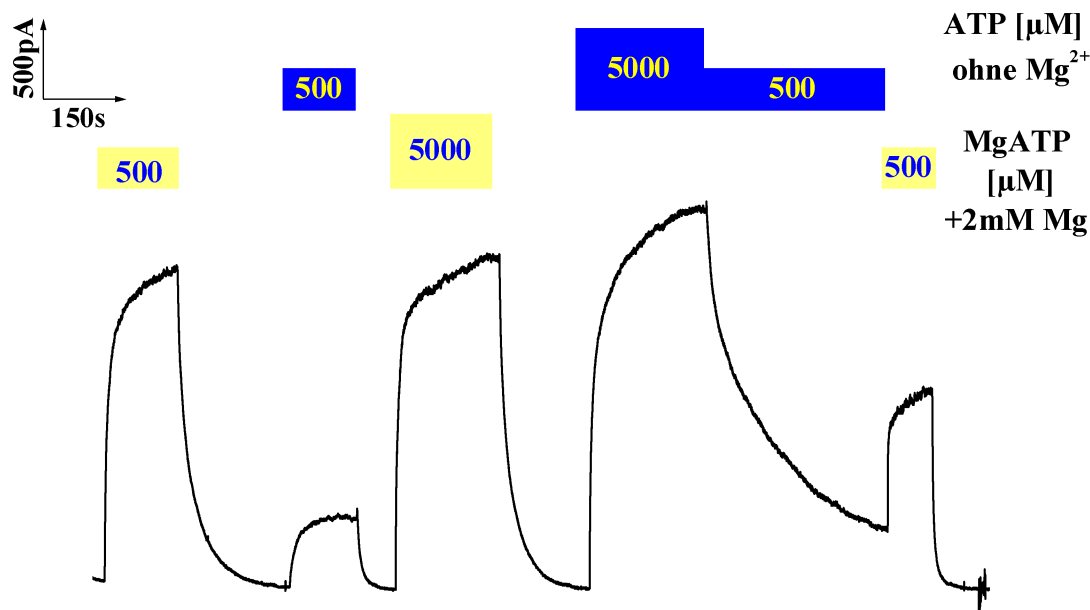


### 3.6 CFTR-Regulation durch ATP-Hydrolyse / Magnesium

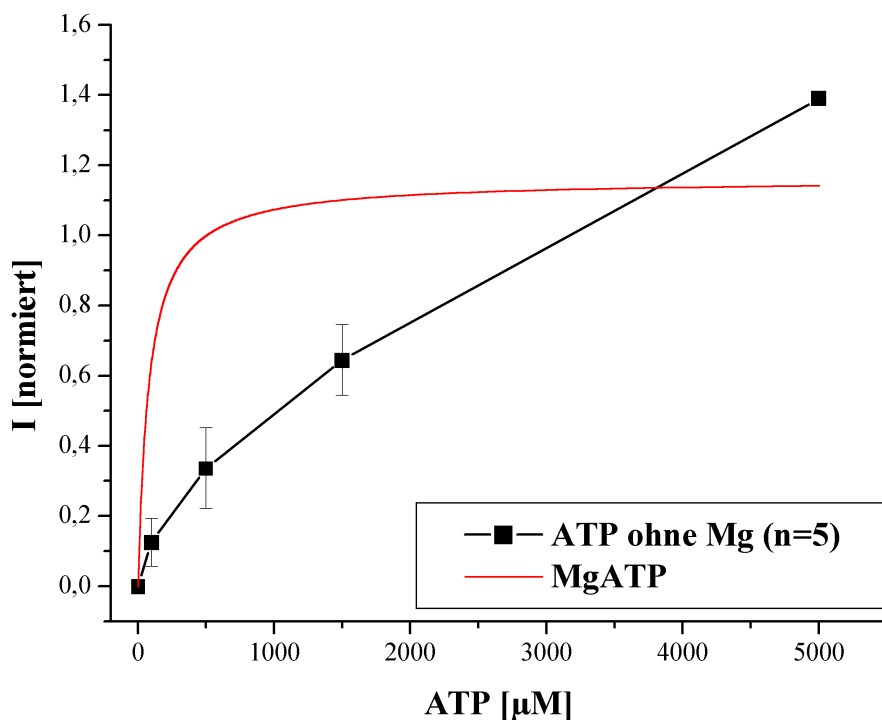
Um die Notwendigkeit einer ATP-Hydrolyse für einen CFTR-vermittelten Chloridstrom zu untersuchen, konnte die Magnesiumabhängigkeit der Hydrolyse genutzt werden. Da es als erwiesen gilt, dass alle ATPasen nur in Gegenwart zweiwertiger Kationen, vor allem von Magnesium, aktiv sind, genügt das Entfernen dieser Ionen aus der Lösung, um jegliche ATPase-Aktivität zu unterbinden [122]. Daher müsste das Auftreten eines Chloridstroms in Abwesenheit von Magnesium die Existenz eines nichthydrolytischen Öffnungszyklus beweisen. In den meisten Veröffentlichungen wird die Öffnung in Mg-Abwesenheit bestritten [5, 26, 52, 96, 121], hingegen berichteten z.B. Ikuma et al. von CFTR-Aktivität unter Mg-freien Bedingungen [67].

#### 3.6.1 Notwendigkeit von Magnesium für die Kanalöffnung

Durch die Messungen mit Hilfe eines Atom-Absorptions-Spektrometers (AAS) konnte nachgewiesen werden, dass auch in Badlösungen ohne Magnesiumzusatz bis zu 3  $\mu\text{M}$  dieses Metalls enthalten waren. Aus diesem Grund wurden Komplexbildner eingesetzt, um freie Magnesiumionen weitestgehend zu eliminieren. Die Verwendung von EDTA (Ethyldiaminotetraessigsäure) ermöglichte es, das freie  $\text{Mg}^{2+}$  auf weniger als 1 nMol/l zu reduzieren. Durch den Zusatz des hochaffinen CDTAs ( $K_D = 10^{-12}$ ; Diaminocyclohexantetraessigsäure) konnte diese Konzentration bis auf weniger als 1 pM verringert werden. In einigen Messungen wurden direkt im Anschluss an die Experimente die verwendeten Badlösungen im AAS untersucht, um Kontaminationen während der Messung ausschließen zu können. Es zeigte sich in keinem Fall eine Konzentrationsänderung. Die Abb. 3.6-1 belegt, dass die CFTR-Chloridkanäle im isolierten Makropatch auch in Abwesenheit von Magnesium (5 mM CDTA in der Badlösung) reversibel öffneten. Das durchschnittliche Signal bei 500  $\mu\text{M}$  ATP ohne Magnesium betrug 29 % des MgATP-vermittelten. Die Chloridströme bei 5 mM ATP belegten, dass dies nicht auf einen verringerten Maximalstrom bzw. eine verringerte Leitfähigkeit zurückgeführt werden konnte, da das Signal mit 5 mM ATP ohne Magnesium durchschnittlich 16 % größer war als das durch 5 mM MgATP induzierte (n=4) (Abb. 3.6-1).

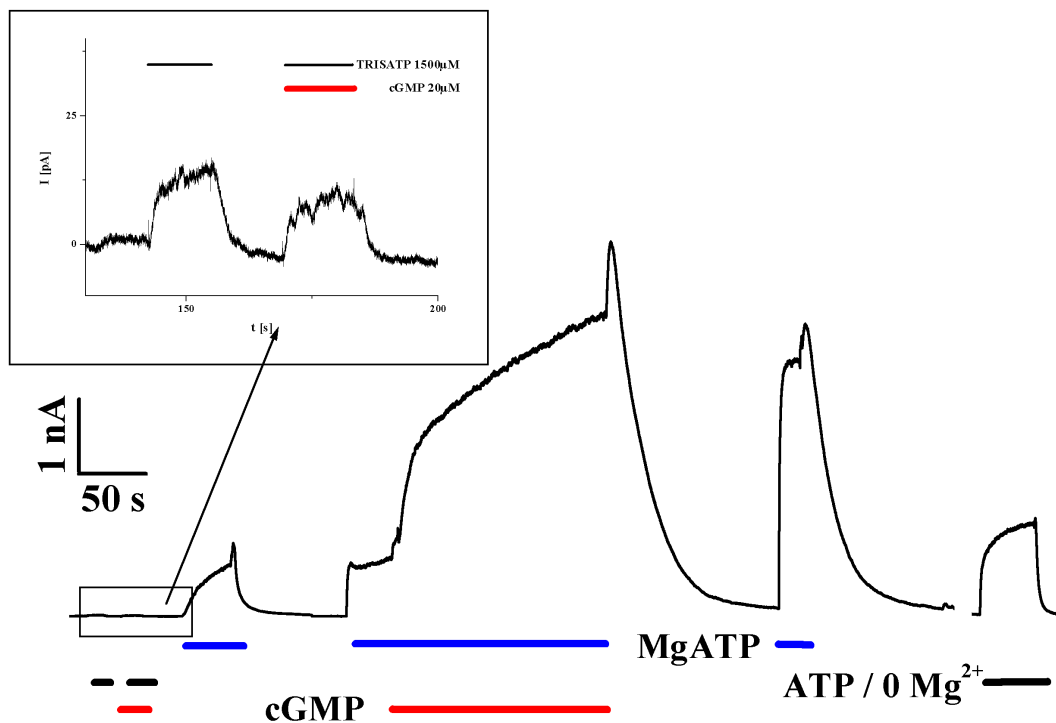


**Abb. 3.6-1 Die ATP-Zugabe öffnete den CFTR in Abwesenheit von Magnesium**  
 500  $\mu\text{M}$  ATP ohne  $\text{Mg}^{2+}$  riefen nur geringe Ströme hervor, dagegen bewirkte eine Lösung mit 5 mM ATP einen dem MgATP-induzierten vergleichbaren Strom. Sowohl die ATP-freie Badlösung, als auch die Mg-freien ATP-Lösungen enthielten 5 mM CDTA (maximale freie  $[\text{Mg}^{2+}]$  unter 1 pM).



**Abb. 3.6-2 Konzentrationsabhängigkeit des ATP-induzierten Stroms in  $\text{Mg}^{2+}$ -Abwesenheit**  
 Die Mg-freien Lösungen enthielten 2-5 mM EDTA. Die rote Kurve stellt die abgeschätzte Konzentrationsabhängigkeit in Gegenwart von Magnesium ( $K_M = 80 \mu\text{M}$ ) zur besseren Vergleichbarkeit dar. Die Ströme wurden, unter Berücksichtigung des Verhältnisses  $I_{\text{MgATP } 5\text{mM}} / I_{\text{ATP } 5\text{mM}} = 0,84$  auf den Strom bei 5 mM ATP normiert.

Der Vergleich der stationären Chloridströme, die durch unterschiedliche ATP-Konzentrationen mit und ohne  $Mg^{2+}$  hervorgerufen wurden, zeigt eine deutliche Abnahme der apparenten ATP-Affinität bei Magnesiumentzug. Da es nicht möglich war, eine vollständige Sättigung des Stroms in Abwesenheit von Magnesium zu bewirken, stellt die aus Abb. 3.6-2 extrapolierte halbmaximale ATP-Sättigungskonzentration von mehr als 1 mM nur eine Näherung dar. Die Messungen mit höheren ATP-Konzentrationen (25 mM) lieferten keine eindeutigen Werte. Ein weiterer Beleg, dass die beobachteten Signale nicht durch Magnesiumverunreinigungen in der Messkammer verursacht wurden, waren die Koexpressionsexperimente mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase II. Da Magnesium für jede enzymatische Kinaseaktivität ein unverzichtbarer Kofaktor ist [156], wäre keine Aktivierung der cGKII und somit des CFTR zu erwarten, wenn nur ATP und cGMP, nicht jedoch Magnesium in der Badlösung vorhanden sind.



**Abb. 3.6-3 Die cGKII phosphoryliert den CFTR nur in Anwesenheit von cGMP, ATP und  $Mg^{2+}$**   
Gezeigt ist eine Messung mit einer cGKII-CFTR koexprimierenden Oozyte. In der Abwesenheit von Mg (5 mM CDTA) trat durch die cGMP-Zugabe keine Phosphorylierung ein. Während der ATP-Strom in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  vor der Phosphorylierung vernachlässigbar gering war (Inset), konnte nach der Stimulierung ein deutlicher Chloridstrom durch die Perfusion mit derselben Lösung induziert werden. Die ATP-freie Badlösung enthielt 5 mM CDTA und kein  $Mg^{2+}$ .

In der in Abb. 3.6-3 gezeigten Messung wurde zunächst ATP zugegeben, was nur zu geringen Strömen führte, im Vergleich zu den Signalen, die nach der Phosphorylierung durch die selbe Lösung hervorgerufen wurden. Auch der Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  cGMP induzierte keine Stromzunahme. Wurde jedoch nach dreißigsekündiger Perfusion mit einer ATP- und Mg-freien Lösung zu einer Lösung gewechselt, die 500  $\mu\text{M}$  ATP und 2,5 mM Magnesium enthielt, so stieg der Strom um das 100fache. Dies belegt, dass das cGMP für einen Zeitraum von mehr als 30 s an die cGKII gebunden blieb. Die anschließende gleichzeitige Applikation von MgATP und cGMP bewirkte eine weitere Stromzunahme, was auf die Anwesenheit sättigender Konzentrationen an cGMP und MgATP zurückzuführen war.

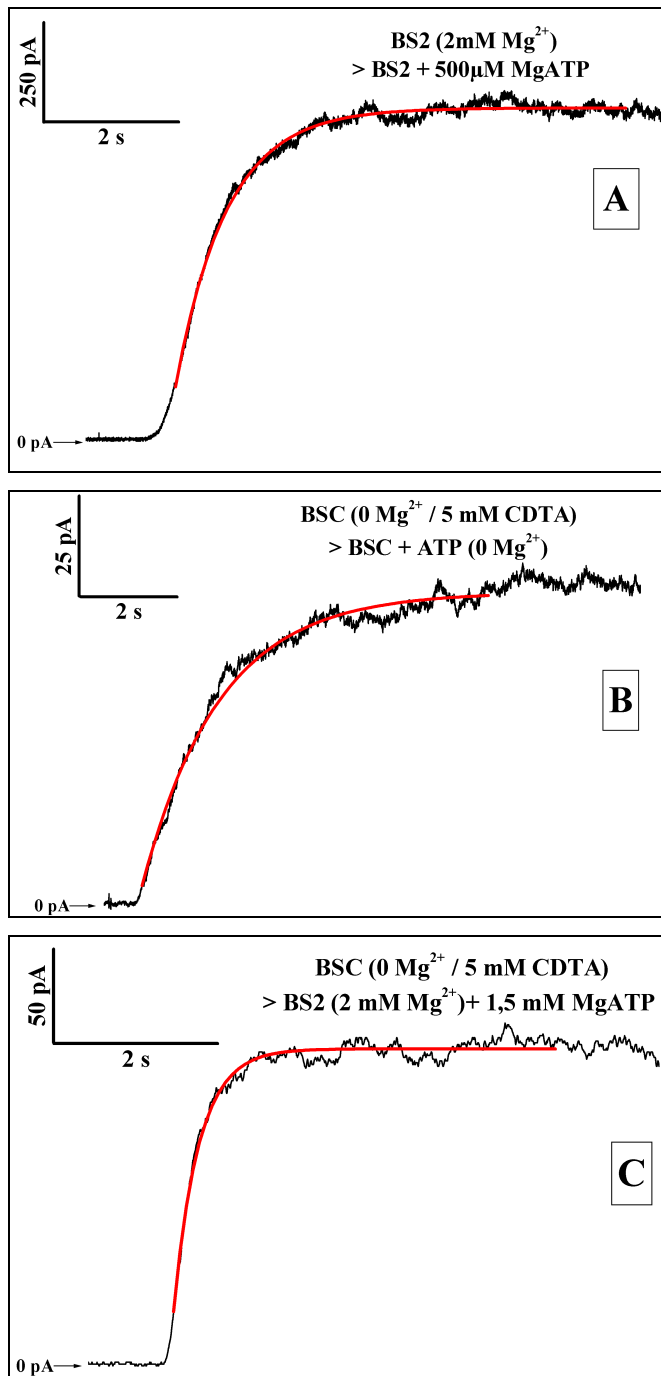
### 3.6.2 Öffnungs- und Schließkinetik bei $\text{Mg}^{2+}$ -Entzug

Die von Ramjeesingh et al. ermittelte Hydrolyserate von  $1 \text{ s}^{-1}$  stimmte mit den publizierten Zeitkonstanten für das Öffnen und Schließen des Kanals überein [80], was die Annahme stützte, dass mit jedem Zyklus auch eine ATP-Hydrolyse verbunden ist. Um dies zu überprüfen, wurden Lösungswechsel zwischen ATP-haltigen und nukleotidfreien Badlösungen, sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit von Magnesium durchgeführt und die Öffnungs- und Schließvorgänge exponentiell angepasst. In Abwesenheit von Magnesium ergab der Lösungswechsel zu ATP eine langsamere Öffnungskinetik (Abb. 3.6-4 B) im Vergleich zu der Kanalöffnung bei kontinuierlicher Mg-Präsenz in der Badlösung (Abb. 3.6-4 A). In 50 % der Messungen musste der Verlauf biexponentiell angepasst werden ( $A_{\text{langsam}}/A_{\text{schnell}} = 1,2 \pm 0,2$ ). Die ermittelten Zeitkonstanten von  $7,3 \pm 1,8 \text{ s}$  bzw.  $1,6 \pm 0,4 \text{ s}$  wiesen auf eine verlangsamte Öffnung in Abwesenheit von Magnesium hin.

Die Kinetik der Stromzunahme bei dem Wechsel von Mg- und ATP-freier Lösung zu MgATP unterschied sich von der "normalen" Öffnung, bei der in beiden Lösungen 2 mM Magnesium enthalten war. Eine sehr schnelle Komponente dominierte den Zeitverlauf ( $\tau = 0,33 \pm 0,02 \text{ s}$ ), die in den Messungen, in denen Magnesium die ganze Zeit anwesend war, nur selten auftrat. Für 60 % der ausgewerteten Öffnungskinetiken war eine biexponentielle Anpassung erforderlich, wobei für den langsameren Anteil eine durchschnittliche Relaxationskonstante von  $8 \pm 3 \text{ s}$  bestimmt wurde, aber

diese in einigen Messungen auch nur 1,2 Sekunden betrug (Amplitudenverhältnis:

$$A_{\text{langsam}} / A_{\text{schnell}} = 0,8 \pm 0,2).$$

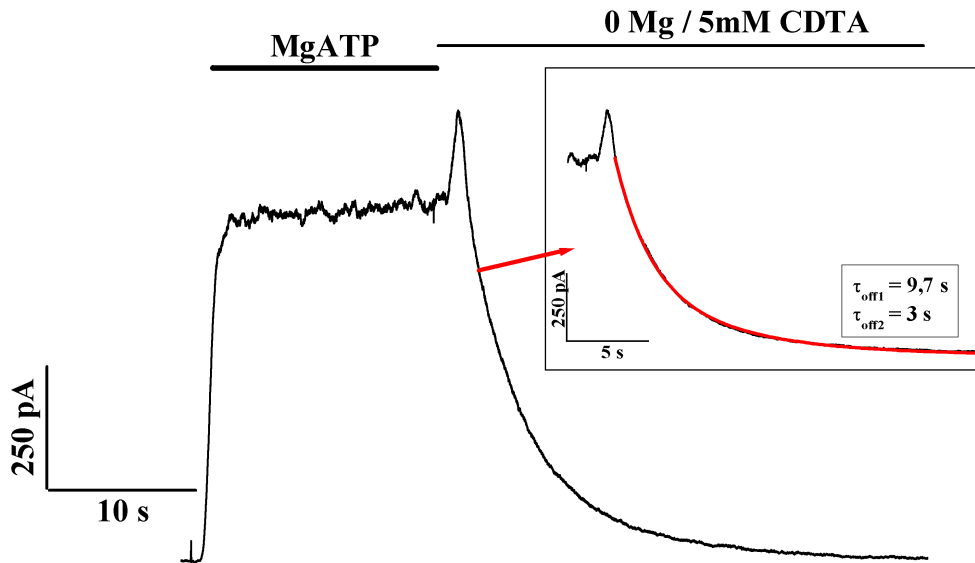


**Abb. 3.6-4 Magnesiumentzug führte zu einer deutlichen Änderung der Öffnungskinetik**

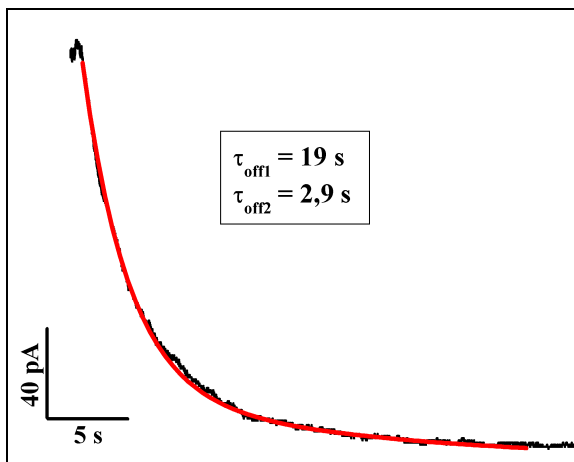
Alle drei hier gezeigten Stromänderungen konnten monoexponentiell angepasst werden. (B) und (C) zeigen Anpassungen aus derselben Messung. Verglichen mit der Kanalöffnung in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  (A,  $\tau = 0,76$  s), war die Aktivierung in Abwesenheit von Magnesium deutlich verlangsamt (B,  $\tau = 1,3$  s). Wurde, ausgehend von einer Mg-freien Badlösung (BSC, 5 mM CDTA), zu einer Lösung mit MgATP und 2 mM freiem Mg gewechselt, dominierte eine deutlich schnellere Rate die Kanalöffnung (C,  $\tau = 0,3$  s). Die mittleren Zeitkonstanten sind in Tab. 3.6-1 zusammengefasst.

Eine transiente Stromzunahme vor dem anschließenden Signlrückgang war das auffälligste Merkmal des Schließens durch die Wegnahme von MgATP bei dem Wechsel zu der magnesiumfreien Badlösung BSC (Abb. 3.6-5). Die Amplitude dieses Transienten betrug zwischen 10 % und 30 % des stationären Stroms bei MgATP-

Perfusion, wobei die Höhe dieses Transienten nicht mit der Lösungswechselgeschwindigkeit korrelierte. Die möglichen Ursachen dieser vorübergehenden Stromzunahme werden in 4.7.2 diskutiert.



**Abb. 3.6-5 Transiente Stromzunahme bei gleichzeitigem ATP- und Magnesiumentzug**  
 Der Wechsel konnte biexponentiell angepasst werden (die transiente Stromzunahme wurde für den Fit nicht berücksichtigt, [MgATP]=1,5 mM).



**Abb. 3.6-6 Stromrückgang durch den ATP-Entzug bei kontinuierlicher Mg-Abwesenheit**  
 Der Verlauf der Signalabnahme wurde biexponentiell angepasst. (Badlösung mit 5 mM CDTA; 1,5 mM ATP).

Die Mittelwerte der Relaxationszeiten nach dem ATP-Entzug in Mg-haltiger Badlösung betragen, bei ausschließlich biexponentiellem Verlauf,  $7 \pm 2$  s bzw.  $1,3 \pm 0,3$  s ( $A_{\text{langsam}} / A_{\text{schnell}} = 1,2 \pm 0,2$ ). Erfolgte hingegen ein Lösungswechsel von Mg-freier ATP-Lösung zu einer Badlösung, die weder Magnesium noch ATP enthielt, so waren beide Zeitkonstanten verlangsamt ( $\tau_{\text{langsam}} = 16 \pm 4$  s;  $\tau_{\text{schnell}} = 2,1 \pm 0,4$  s;  $A_{\text{langsam}}/A_{\text{schnell}} = 0,6 \pm 0,1$ ). Die ermittelten Zeitkonstanten sind in Tab. 3.6-1 zusammengefasst.

ATP-Zugabe			ATP-Wegnahme		
Wechsel	$\tau_1$ [s]	$\tau_2$ [s]	Wechsel	$\tau_1$ [s]	$\tau_2$ [s]
BS2→MgATP	1,2±0,1 s		MgATP→BS2	1,7±0,3 s	
BSC→MgATP	8±3 s	0,33±0,02 s	MgATP→BSC	7±2 s	1,3±0,3 s
BSC→ATP	7±2 s	1,6±0,4 s	ATP→BSC	16±4 s	2,1±0,4 s

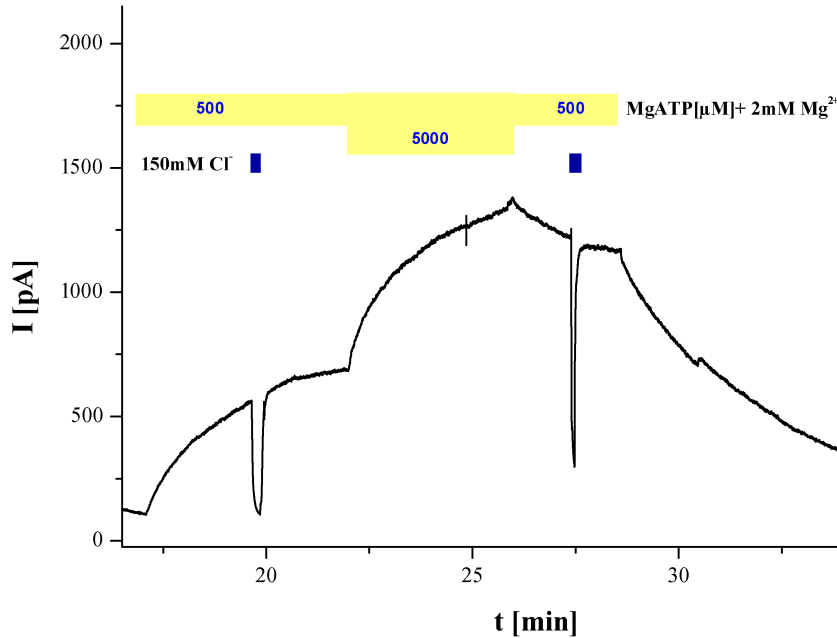
**Tab. 3.6-1 Übersicht über die Kinetik bei ATP-Zugabe und Wegnahme mit und ohne  $Mg^{2+}$**   
 Die Werte sind Mittelwerte ( $\pm$ S.E.) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die mit BS2 bezeichnete Badlösung enthielt 2 mM  $Mg^{2+}$ , der mit BSC bezeichneten Lösung war kein  $Mg^{2+}$  zugesetzt ( $[Mg^{2+}]_{frei} < 1\text{pM}$ ),  $[CDTA] = 5\text{ mM}$ .

### 3.6.3 Messungen mit der Walker-A-Mutante K1250A/Q

Eines der Argumente für eine ATP-Hydrolyse in einem vollständigen Öffnungszyklus des CFTR war die veränderte Schließkinetik von CFTR-Mutanten. Bei diesen wurde ein für die ATP-Hydrolyse (1.6.4) essentieller Lysinrest (K1250) in der Walker-A Domäne der NBD2 in eine ungeladene Aminosäure umgewandelt (Alanin, Methionin, Glutamin). Dies führte zu einer Verringerung der Hydrolyserate des CFTR auf maximal 10 % (NBD1) bzw. eine kaum noch nachweisbare ATPase-Aktivität (NBD2) [108]. Es konnte in zahlreichen Experimenten ein deutlich verlangsamer Schließvorgang beobachtet werden, woraus abgeleitet wurde, dass zum Schließen des CFTR eine ATP-Hydrolyse an der NBD2 erfolgen muss [47].

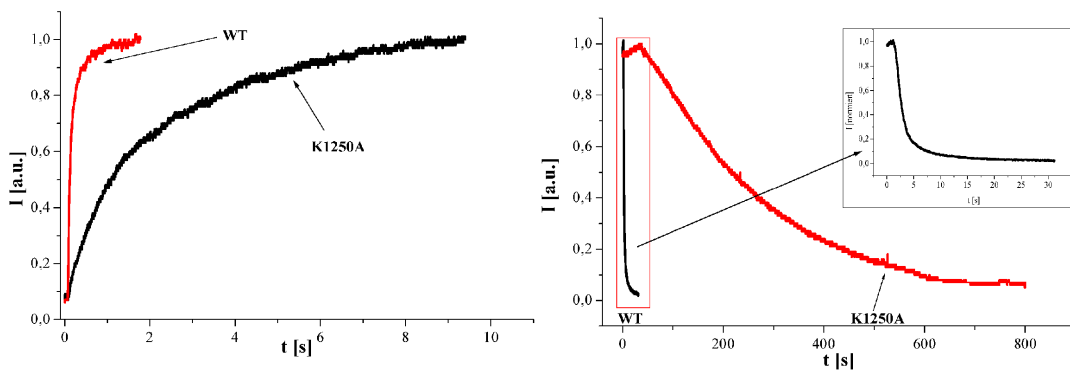
Die Abb. 3.6-7 zeigt Chloridströme, die durch die Zugabe von MgATP bei einer Oozyte hervorgerufen wurden, die den mutanten CFTR-K1250A exprimiert. Die Zugabe von MgATP 500  $\mu\text{M}$  rief einen starken Chlorideinstrom hervor. Die Erhöhung der MgATP-Konzentration auf 5 mM bewirkte eine deutliche Stromzunahme, wobei es nicht möglich war, einen  $K_M$ -Wert zu bestimmen. Nicht nur die Stromabnahme bei ATP-Wegnahme, sondern auch die Zunahme bei ATP-Zugabe waren drastisch verlangsamt. Dies führte dazu, dass der Rundown des stationären Chloridstroms in dem deshalb sehr langen Messzeitraum nicht zu vernachlässigen war und somit die Stromamplituden bei den verschiedenen ATP-Konzentrationen nicht miteinander verglichen werden können. Wurde das Magnesium aus der Badlösung mit ATP

entfernt, so fand keine Öffnung der Kanäle mehr statt, selbst wenn die Nukleotidkonzentration auf 25 mM erhöht wurde und die Zugabe von MgATP (5 mM) vor und nach dieser Perfusion zu Strömen im Nanoamperebereich geführt hatten (nicht gezeigt).



**Abb. 3.6-7 Aktivierung der K1250A-Mutante im Patch-clamp Experiment**

Die Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  MgATP rief eine langsame Stromzunahme hervor, bei Erhöhung auf 5 mM MgATP war in der hier gezeigten Messung ein Verdoppeln des Chloridstroms zu beobachten. ATP-Entzug führte nur sehr langsam zu einem Stromrückgang. Zu beachten ist die Skalierung der Zeitachse (min).



**Abb. 3.6-8 Vergleich der Öffnungs- und Schließkinetiken von Wildtyp und K1250A-Mutante**

Gezeigt sind die normierten Signale bei Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  MgATP (links) und Wegnahme (rechts). In allen Lösungen betrug die freie Mg-Konzentration ca. 2 mM. Es wird deutlich, dass nicht nur das Schließen, sondern auch das Öffnen verlangsamt ist, wobei das Schließen deutlich langsamer verläuft (vgl. Tab. 3.6-2).



Es war eine große Varianz in den Zeitkonstanten sowohl für das Öffnen, als auch für das Schließen der Kanäle (Tab. 3.6-2) zu beobachten, wobei die Mutation des Lysins zu einem unpolaren Alaninrest offensichtlich einen stärkeren Einfluss auf die Kinetik hatte als die Mutation zum Glutamin. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die angegebenen Zeitkonstanten bei der K1250A-Mutante nur Richtwerte sind, da es nur in wenigen Messungen möglich war, bis zur Einstellung eines Gleichgewichts eine bestimmte Lösung zuzugeben, so dass bei den meisten vorgenommenen exponentiellen Anpassungen die stationäre Phase nicht miteinbezogen werden konnte. Daher wurde darauf verzichtet, Mittelwerte für die Öffnungs- bzw. Schließkonstanten anzugeben.

Die in Abb. 3.6-8 gezeigten Vergleiche der Öffnungs- bzw. Schließkinetik von Wildtyp und Mutante belegen die Verlangsamung durch die NBD2-Mutation. Weinreich et al. und andere berichteten über ein beschleunigtes Schließen des Wildtyp-CFTR bei ADP-Zugabe und auch bei Magnesiumentzug [151]. Während der ADP-Effekt auf WT-CFTR auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (nicht gezeigt), war eine deutlich schnellere Schließrate bei Mg-Entzug nicht zu beobachten (s.o.).

K1250A		K1250Q	
$\tau_{\text{Öffnung}}$	$\tau_{\text{Schließen}}$	$\tau_{\text{Öffnung}}$	$\tau_{\text{Schließen}}$
85-305 s (n = 11)	32-400 s (n = 16)	18 ± 4 s (n = 5)	46 ± 13 s (n = 4)

**Tab. 3.6-2 Öffnungs- und Schließkinetiken der Walker-A-Mutanten K1250A/K1250Q**

Die ATP-Konzentration betrug 500  $\mu\text{M}$ , bei einigen Messungen auch 5 mM (es war keine Konzentrationsabhängigkeit bei ATP-Zugabe bzw. -Wegnahme zu beobachten). Bei der K1250A-Mutante wurde auf eine Mittelwertbildung verzichtet (siehe Text).

Die in Abb. 3.6-8 gezeigten Vergleiche der Öffnungs- bzw. Schließkinetik von Wildtyp und Mutante belegen die Verlangsamung durch die NBD2-Mutation. Weinreich et al. und andere berichteten über ein beschleunigtes Schließen des Wildtyp-CFTR bei ADP-Zugabe und auch bei Magnesiumentzug [151]. Während der ADP-Effekt auf WT-CFTR auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (nicht gezeigt), war eine deutlich schnellere Schließrate bei Mg-Entzug nicht zu beobachten (s.o.).

Auch bei K1250A-Mutanten wurden die Schließkinetiken nach der mehrminütigen Aktivierung mit MgATP bei den Wechseln zu ATP-freien Badlösungen a) mit  $\text{Mg}^{2+}$ ,

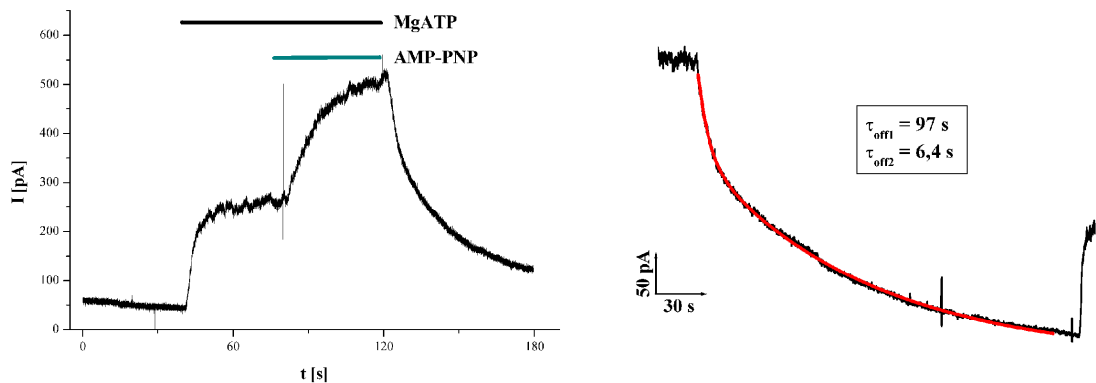
b) mit EDTA und c) mit ADP verglichen. Es waren keine Veränderungen in der Schließkinetik zu beobachten (nicht gezeigt), obwohl ATP ohne Magnesium bei dieser Mutante nicht zur Kanalöffnung führt. Auch Badlösungen, die 500  $\mu\text{M}$  bzw. 5 mM ATP, aber kein Magnesium enthielten, änderten den Schließvorgang nicht.

### 3.6.4 Einfluss von nichthydrolysierbaren ATP-Analoga

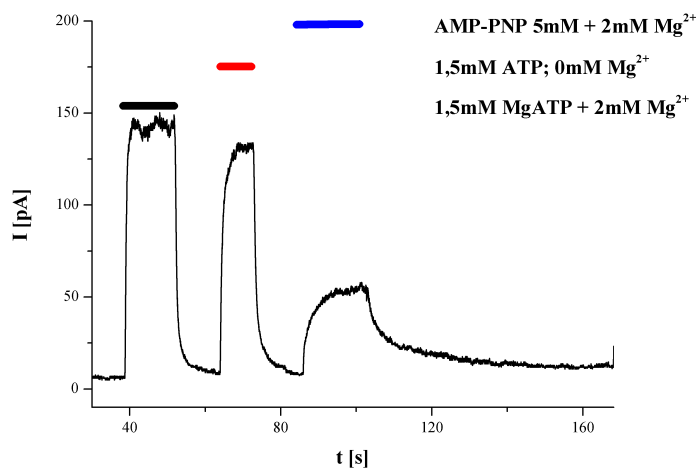
Auf die Notwendigkeit einer ATP-Hydrolyse für eine CFTR-Öffnung wurde auch wegen der Effekte von nicht bzw. kaum hydrolysierbaren ATP-Analoga geschlossen. So fanden weder Anderson et al. [5], noch Nagel et al. [96] eine Öffnung des Kanals durch Adenylyl- $\beta,\gamma$ -imidodiphosphat (AMP-PNP) oder ATP- $\gamma$ -S. Allerdings konnten Hwang et al. und andere Gruppen eine verlängerte Offenzeit der präphosphorylierten CFTR-Kanäle feststellen, wenn die Lösung zusätzlich MgATP enthielt [66, 96]. Die Kanäle blieben auch dann noch einige Minuten geöffnet, wenn das MgATP bereits wieder entfernt worden war. Dies führte zu einem Modell, in dem die ATP-Hydrolyse sowohl Voraussetzung für die Kanalöffnung, als auch für das Schließen des Kanals ist und in dem beide Nukleotidbindestellen in diesen Prozess involviert sind. Weinreich et al. fanden ein verlangsamtes Öffnen der Kanäle in isolierten Makropatches, wenn von MgAMP-PNP zu MgATP gewechselt wurde [151]. Weiterhin wurde berichtet, dass in Abwesenheit von MgATP eine Kanalöffnung möglich war, wenn die Temperatur niedrig (25°C) war und die AMP-PNP-Konzentration mindestens 5 mM betrug [2]. Für weitere Erkenntnisse hierzu wurden Experimente mit nicht bzw. schlecht hydrolysierbaren ATP-Analoga (AMP-PNP, ATP- $\gamma$ -S) durchgeführt. Um zu überprüfen, inwieweit diese eingesetzten Nukleotide durch eine ATPase umgesetzt werden oder ATP enthielten, wurde ein Luciferaseassay durchgeführt. Hierbei wird die ATP-abhängige Lumineszenz des Luciferaseproteins genutzt, um die ATP-Konzentration zu bestimmen. Es ergab sich, dass ATP- $\gamma$ -S 15% des durch die gleiche Konzentration an MgATP hervorgerufenen Signals induzierte. AMP-PNP hingegen bewirkte erst bei 2000fach höherer Konzentration ein entsprechendes Signal und konnte somit als nicht-hydrolysierbar angenommen werden.

Die Abb. 3.6-9 zeigt die in Anwesenheit von 500  $\mu\text{M}$  MgATP durch AMP-PNP hervorgerufenen Signale nach vorhergehender Aktivierung mit MgATP. Sowohl die

langsame Aktivierung, als auch das noch stärker verlangsamte Schließen konnten bestätigt werden. Weiterhin konnten auch mit einer 5 mM AMP-PNP-Lösung ohne MgATP eindeutige Signale beobachtet werden (Abb. 3.6-10).



**Abb. 3.6-9 AMP-PNP-Zugabe induzierte eine Stromzunahme und ein verlangsamtes Schließen**  
Die Perfusion mit 500  $\mu$ M AMP-PNP zusammen mit 500  $\mu$ M MgATP induzierte im Anschluss an die Applikation von MgATP (500  $\mu$ M) eine deutliche und langsame Stromzunahme im Patch-clamp Experiment. Bei Nukleotidentzug nahm der Strom nur langsam ab (rechte Abbildung, vgl. Tab. 3.6-3).

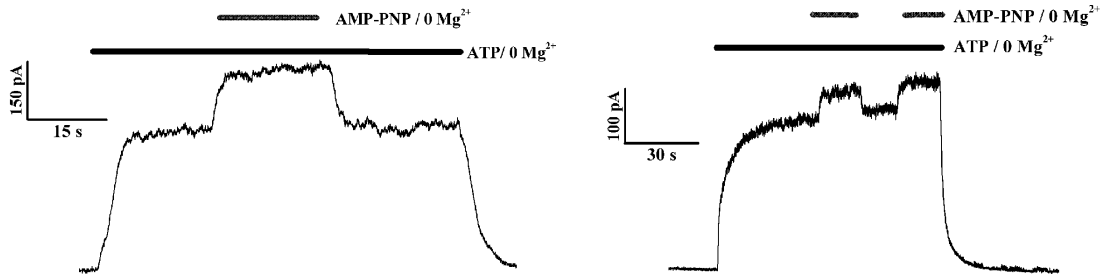


**Abb. 3.6-10 Auch ohne ATP führte MgAMP-PNP zur Kanalöffnung**

Die Zugabe von 5 mM AMP-PNP rief eine deutliche Stromzunahme in Gegenwart von 2 mM  $Mg^{2+}$  hervor. Bei Wegnahme des AMP-PNP schlossen die Kanäle nur langsam.

Eine deutliche Veränderung der Kinetik trat auf, wenn das Magnesium aus der Lösung entfernt wurde (Abb. 3.6-11). Im Vergleich zu den Zeitkonstanten in Anwesenheit von Magnesium (s.o.) erfolgte die Stromzunahme bei dem Wechsel  $ATP \rightarrow ATP + AMP\text{-}PNP$  ca. sechsmal so schnell (Tab. 3.6-3). Auch der Stromrückgang war sehr schnell, unabhängig davon, ob die nachfolgend eingesetzte Badlösung ATP enthielt oder nicht. Aufgrund der durch das Luciferaseassay belegten Hydrolysierbarkeit des  $ATP\gamma S$ , war es nicht möglich, die durch  $ATP\text{-}\gamma S$  hervorgerufene Stromzunahme in Abwesenheit von ATP auf eine nichthydrolytische Kanalöffnung

zurückzuführen (nicht gezeigt), weswegen diese Messergebnisse nicht in die vorliegende Arbeit miteinbezogen wurden.



**Abb. 3.6-11 AMP-PNP-Effekt in Abwesenheit von Magnesium**

Sowohl die Zugabe, als auch der Entzug von AMP-PNP führte zu einer schnellen Stromänderung ([CDTA]=5 mM). Insbesondere der Wechsel von ATP+AMP-PNP zu einer nukleotid- und Mg-freien Badlösung (rechts) verlief, verglichen mit Abb. 3.6-9, deutlich beschleunigt. ([ATP] = 1,5 mM; [AMP-PNP] = 500 µM).

AMP-PNP-Effekt in Gegenwart von Mg <sup>2+</sup>			AMP-PNP-Effekt in Abwesenheit von Mg <sup>2+</sup>	
Wechsel	τ <sub>1</sub> [s]	τ <sub>2</sub> [s]	τ <sub>1</sub> [s]	τ <sub>2</sub> [s]
ATP→ATP+AMP-PNP	14,2±0,6 s		2,5±1 s	
ATP+AMP-PNP→0	45±6s (70 %)	3,7±0,6 s (30 %)	nicht exakt bestimmbar, max. 20 s (A <sub>1</sub> <50 %)	ca. 2s
ATP+AMP-PNP→ATP	nicht gemessen		0,95 s±0,25	

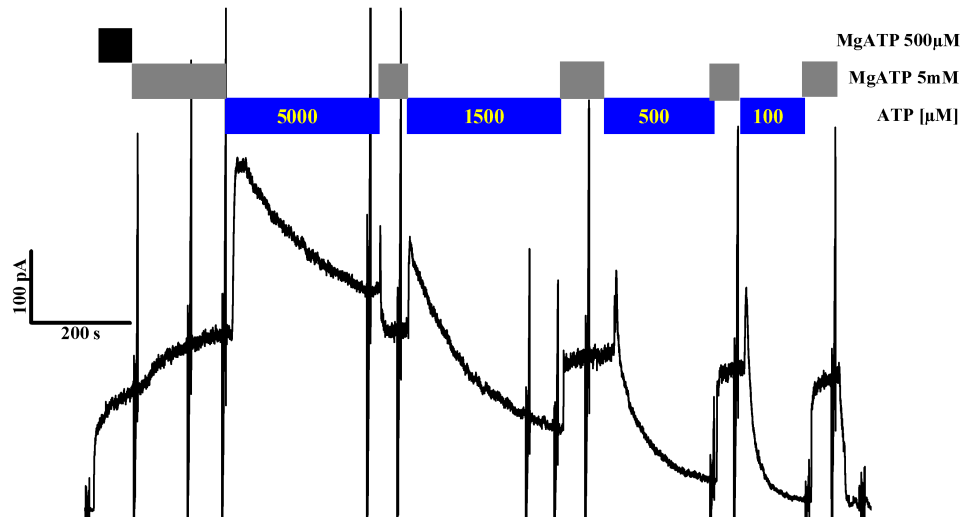
**Tab. 3.6-3 AMP-PNP-Einfluss auf die Kinetik in Gegenwart und Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup>**

Die gezeigten Werte repräsentieren das Mittel (± S.E.) aus mindestens drei unabhängigen Patches. Linke Spalte: [MgATP] = 500 µM, MgAMP-PNP = 500 µM, [Mg<sup>2+</sup>] = 2mM. Rechte Spalte: [AMP-PNP] = 500 µM; [ATP] (ohne Mg) =1,5 mM.

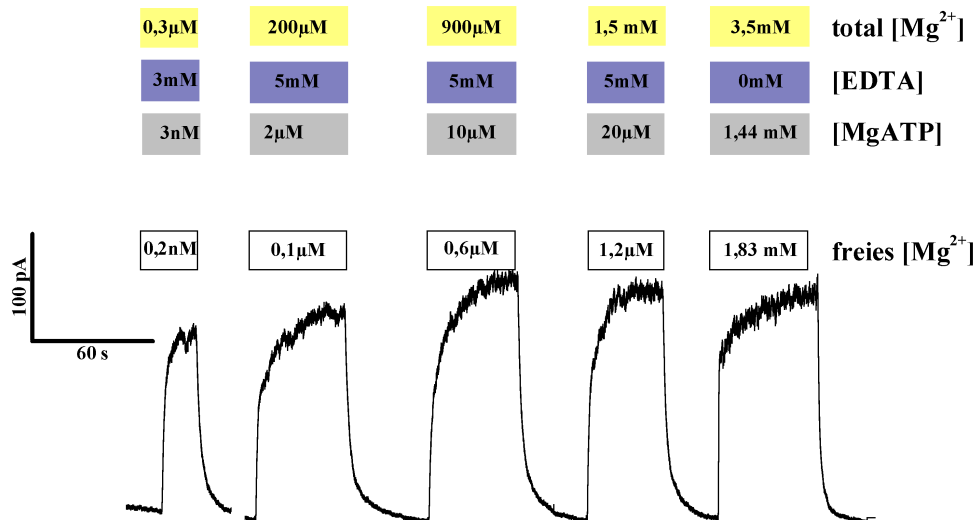
### 3.6.5 Modulation des Öffnungszyklus durch Magnesium

In 3.6.1 wurde gezeigt, dass die CFTR-Kanäle auch in Abwesenheit von Magnesium öffnen können, jedoch eine deutlich verringerte ATP-Affinität aufweisen. Die Maximalströme bei ATP-Konzentrationen von 5 mM waren in vielen Messungen bei Abwesenheit von Magnesium erhöht. Das Auftreten einer vorübergehenden Stromzunahme bei dem Wechsel von MgATP zu einer Mg-freien Badlösung war ein Hinweis darauf, dass das Magnesium auch inhibitorisch wirkt. Abb. 3.6-12 zeigt ein

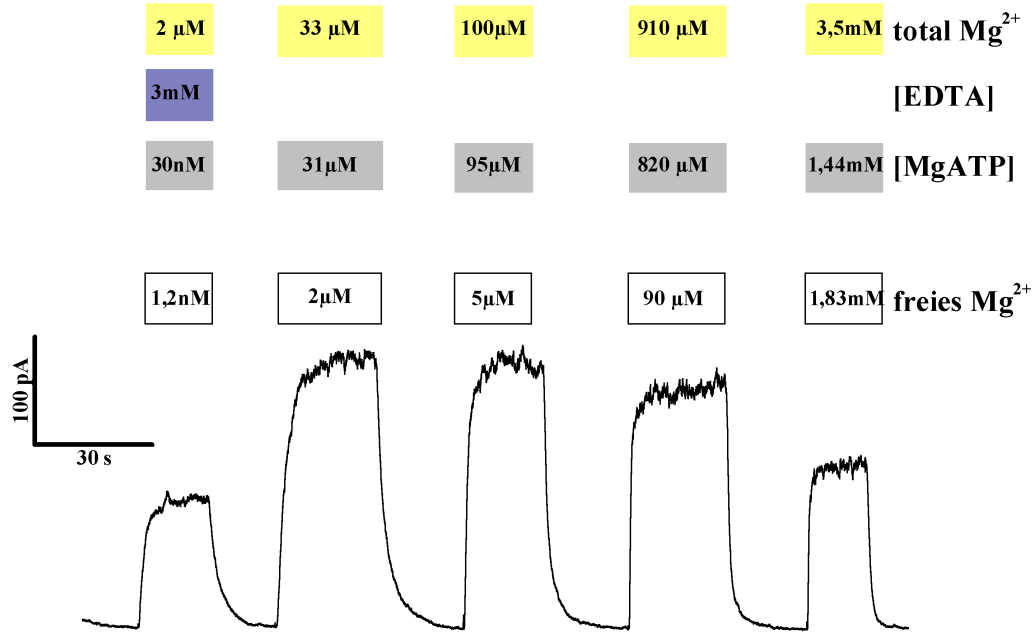
Experiment, in dem durch wiederholte ATP-Zugabe direkt nach der MgATP-Applikation eine weitere Stromerhöhung hervorgerufen wurde. Es konnte nicht nur bei dem Umschalten von MgATP zu ATP, sondern auch bei dem umgekehrten Wechsel ein transientser Strom beobachtet werden.



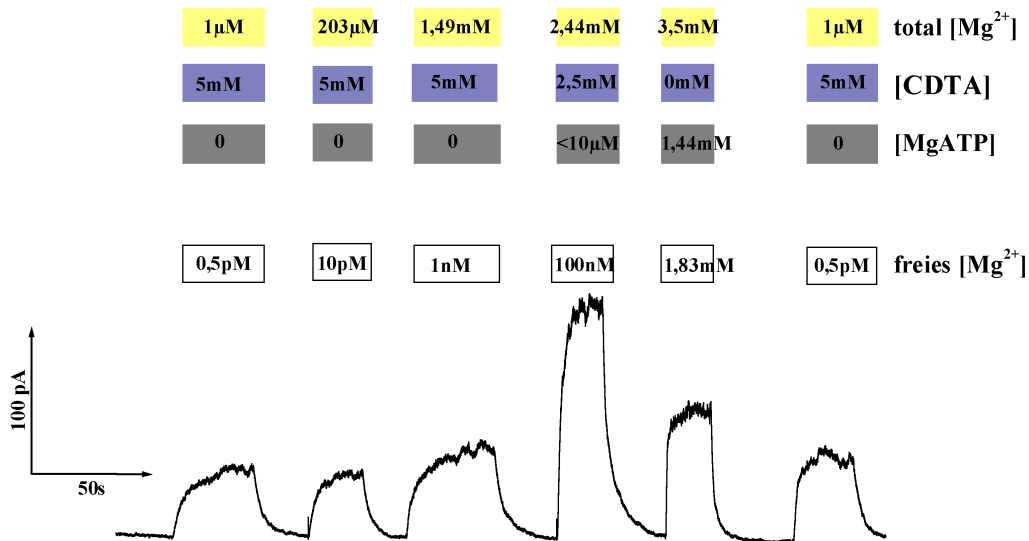
**Abb. 3.6-12 Transiente Effekte von Wechslen zwischen MgATP und TRISATP**  
 In der abgebildeten Messung wurde jeweils zwischen 5 mM MgATP (2 mM freies Mg) und Lösungen ohne Mg (2 mM EDTA;  $[Mg]_{\text{frei}} < 3 \text{ nM}$ );  $[MgATP] < 50 \text{ nM}$ ) und unterschiedlicher ATP-Konzentration gewechselt. Die Schreiberausschläge wurden durch die angelegten Spannungspulse verursacht.



**Abb. 3.6-13 CFTR-Chloridströme bei Titration der Mg-Konzentration mit EDTA**  
 $[ATP]=1,5 \text{ mM}$ ;  $[EDTA]=5 \text{ mM}$ ; die Mg-Konzentration von 0,26 μM (oben links) gibt die im AAS bestimmt residuale  $[Mg]$  wieder. Die Badlösung ohne ATP enthielt 3 mM EDTA und kein  $Mg^{2+}$ .



**Abb. 3.6-14 Titration der Magnesiumkonzentration ohne zusätzlichen Komplexbildner**  
 In der abgebildeten Messung hatte ATP von allen Komponenten der Badlösung die höchste Mg-Affinität, so dass das Magnesium vorwiegend im Komplex mit ATP vorlag. [ATP] betrug 1,5 mM; die Mg-freie Lösung war mit 3 mM EDTA angesetzt.



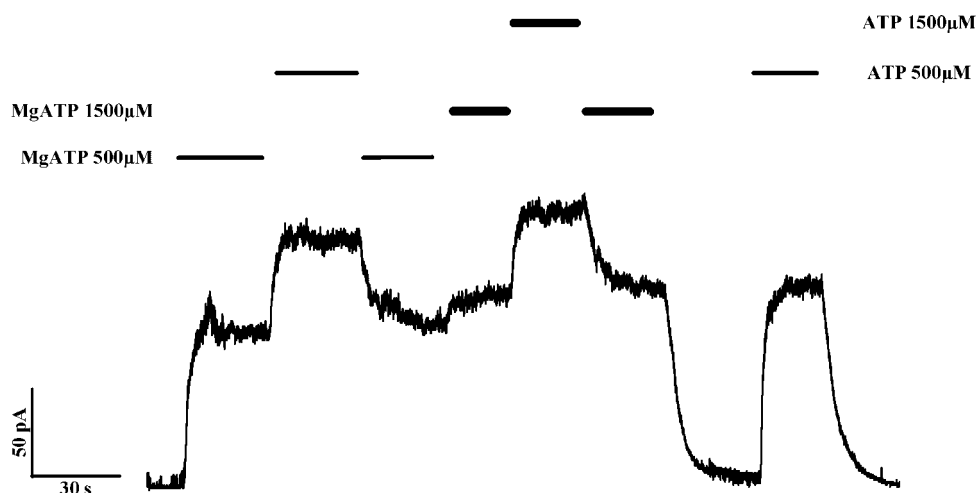
**Abb. 3.6-15 Titration der freien Mg-Konzentration mit CDTA**  
 Die Lösungen enthielten 5 mM CDTA (die mit 1 nM freiem Mg 2,5 mM), 5 mM EGTA und 1,5 mM ATP. Die ATP-freie Badlösung enthielt 5 mM CDTA und kein Mg (mit AAS 1  $\mu\text{M}$  [ $\text{Mg}$ ]<sub>gesamt</sub> bestimmt). Die Werte wurden mit MaxCal errechnet und die dementsprechende  $\text{MgSO}_4$ -Menge (0,5 M) hinzupipettiert. Da die Einstellung einer freien Mg-Konzentration von 1 nM Mg fast äquimolare Mengen an CDTA und  $\text{MgSO}_4$  erforderte, können bei dieser Lösung Abweichungen nicht ausgeschlossen werden.

Unter Verwendung geeigneter Magnesiumchelatoren (EDTA (Abb. 3.6-13), CDTA) wurden Badlösungen angesetzt, die über eine genau berechnete Konzentration

(vgl. 2.3) an freiem Magnesium verfügten. Da die Affinität der eingesetzten Chelatoren zu Magnesium um ein Vielfaches die ATP-Affinität übertrafen, war der Anteil an MgATP im Vergleich zur freien ATP-Konzentration gering (max. 1,3 %). Es wurden zusätzlich Bestimmungen durchgeführt, in denen das ATP selbst als Chelator genutzt wurde (Abb. 3.6-13). Somit war einerseits die MgATP-Konzentration (31-820  $\mu\text{M}$ ) hoch, die Menge an freiem Magnesium betrug andererseits nur zwischen 2 und 100  $\mu\text{M}$ . Die nominell Mg-freie ATP-Lösung enthielt 3 mM EDTA, so dass in dieser Lösung die freie Magnesiumkonzentration bei weniger als 1 nM lag. Bei der Komplexierung mit CDTA (MgATP-Konzentration  $\ll$  1  $\mu\text{M}$ ) war der Chloridstrom bei einer freien Mg-Konzentration von 1 nM maximal und ca. 40 % höher als mit 2,5 mM Magnesium (Abb. 3.6-15). Subnanomolare freie Mg-Konzentrationen zeigten keinen Effekt auf den Strom im Vergleich zum ATP. Aufgrund des Rundowns und der begrenzten Vergleichbarkeit der Messungen mit unterschiedlichen Chelatoren war es nicht sinnvoll, eine Magnesiumkonzentrationsabhängigkeit des Chloridstroms darzustellen. Es geht aus den gezeigten Messungen aber eindeutig hervor, dass für die Wechselwirkung des CFTR mit Magnesium ein Konzentrationsoptimum existiert, nach dessen Überschreitung ein hemmender Einfluss dieses Kations auftritt.

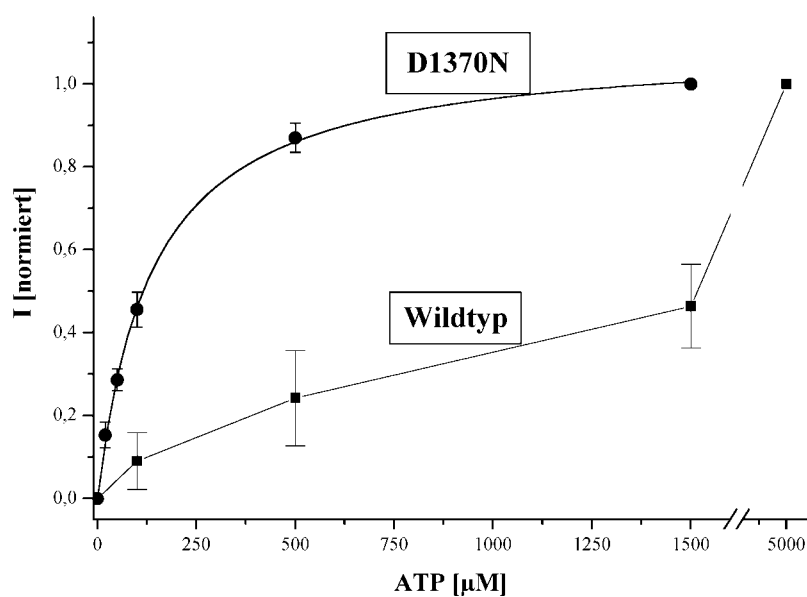
### 3.6.6 Effekt der Mutation des Walker-B-Asparts D1370

Die Veränderung der apparenten ATP-Affinität des CFTR bei der Wegnahme des Magnesiums aus der Badlösung wies auf die Bedeutung dieses Kations für eine Bindung an die Nukleotidbindestelle hin. Das konservierte Walker-B Motiv in beiden Nukleotidbindestellen enthält einen Aspartatrest (NBD1: D572; NBD2: D1370), der als essentiell für eine Magnesiumbindung angenommen wird [64, 71]. Es wurde daher eine Mutation des negativ geladenen Aspartats zu einem ungeladenen Asparagin in den CFTR eingeführt, die die Bindung des Magnesiums verringern sollte [52] (2.6.3). Diese Mutation führte bei anderen ABC-Transportern zu einer Inhibition der ATP-Hydrolyse und reduzierte die CFTR-vermittelten Ströme in Messungen an planaren Lipiddoppelschichten [52]. Die Abb. 3.6-16 zeigt ein Experiment, in dem die durch MgATP bzw. ATP induzierten Chloridströme miteinander verglichen wurden. Die CFTR-Chloridkanäle öffneten sowohl durch die Perfusion mit MgATP (500/1500  $\mu\text{M}$ ), als auch mit ATP ohne Magnesium (500/1500  $\mu\text{M}$ ).



**Abb. 3.6-16 Aktivierung der CFTR-Walker-B-Mutante D1370N**

Sowohl der Wechsel zu einer Badlösung mit 500 μM MgATP (2 mM freies Mg), als auch zu einer Lösung mit 500 μM ATP ohne Mg (5 mM CDTA) rief einen deutlichen Chloridstrom hervor. Die Badlösung enthielt kein Magnesium (5 mM CDTA).



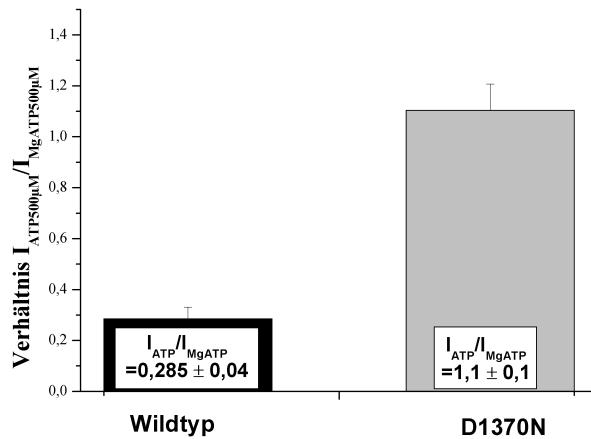
**Abb. 3.6-17 ATP-Abhängigkeit des Chloridstroms**

Die mit (●) versehene Linie zeigt die gemittelte ATP-Konzentrationsabhängigkeit in Abwesenheit von Magnesium im Vergleich zum Wildtyp (■, n= 3-5). Dieser Verlauf konnte durch eine einfache Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden. Die Chloridströme der Mutante wurden auf den Strom bei 1500 μM ATP normiert.

Der  $K_M$ -Wert für ATP in Mg-Abwesenheit war bei der D1370N-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt, während die apparente ATP-Affinität in Gegenwart von Magnesium für WT und D1370N-Mutante offensichtlich vergleichbar war. Es wurde zwar keine vollständige  $K_M$ -Abhängigkeit für die Mutante ermittelt,



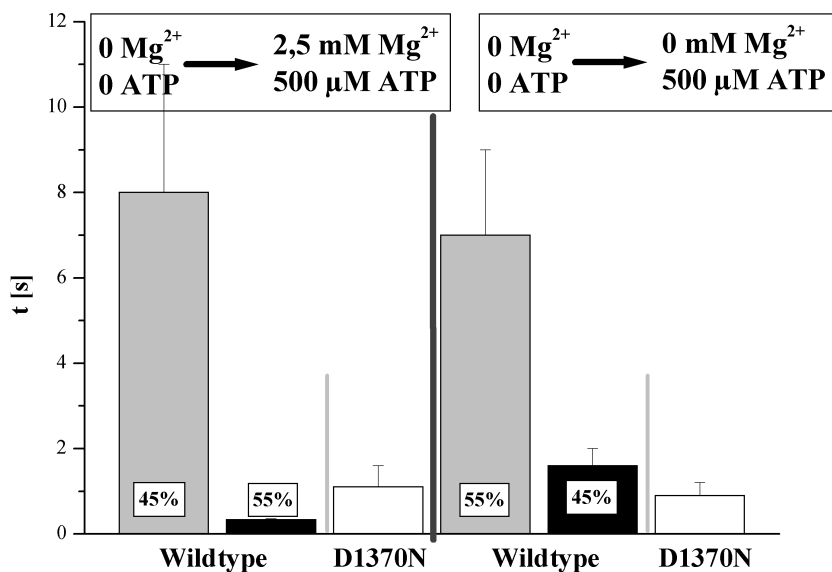
jedoch belegt die Abb. 3.6-18, dass kein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante vorliegt. Während eine exakte  $K_M$ -Wert-Bestimmung für ATP in Mg-Abwesenheit bei dem Wildtyp nicht möglich war, jedoch einen abgeschätzten  $K_M$  von mehr als 1 mM ergab, konnte für die Mutante eine apparente halbmaximale Sättigungskonzentration von  $137 \pm 5 \mu\text{M}$  ( $n=4-7$ ) ermittelt werden (Abb. 3.6-17).



**Abb. 3.6-18 Vergleich der durch 500  $\mu\text{M}$  ATP bewirkten  $\text{Cl}^-$ -Ströme mit und ohne  $\text{Mg}^{2+}$  bei Wildtyp und D1370N-Mutante**  
Bei der Mutante trat weder bei 500  $\mu\text{M}$  ATP, noch bei 1500  $\mu\text{M}$  ATP (nicht gezeigt) ein Unterschied im Chloridstrom in Mg-Anwesenheit und Mg-Abwesenheit auf (WT:  $n=10$ ; D1370N:  $n=6$ ).

### 3.6.7 Öffnungs- und Schließkinetik der Walker-B-Mutante D1370N

Die Geschwindigkeit der durch MgATP-Zugabe induzierten Kanalöffnung war unabhängig davon, ob die nukleotidfreie Badlösung Mg enthielt. Dagegen traten beim Wildtyp deutliche Unterschiede auf (Abb. 3.6-19), wobei die für die D1370N ermittelte mittlere Zeitkonstante von ca. 1 s mit der Öffnungskonstanten des präphosphorylierten Wildtyps in kontinuierlicher Mg-Anwesenheit übereinstimmt (vergleiche 3.4.3). Auch die Geschwindigkeit des Schließvorgangs war unabhängig davon, ob die ATP-haltige Badlösung zusätzlich Magnesium enthielt und konnte im Gegensatz zu den entsprechenden Messungen beim Wildtyp monoexponentiell angepasst werden (Abb. 3.6-20). Zusätzlich konnte in der Mehrzahl der Messungen (5 von 7) der für den Wildtyp in Abb. 3.6-5 gezeigte transiente Strom bei dem Wechsel von ATP zu einer magnesiumhaltigen Badlösung ohne ATP beobachtet werden (nicht gezeigt), der aufgrund der eingeführten Mutation eine Interaktion des Magnesiums mit der ersten Nukleotidbindestelle wahrscheinlich macht.



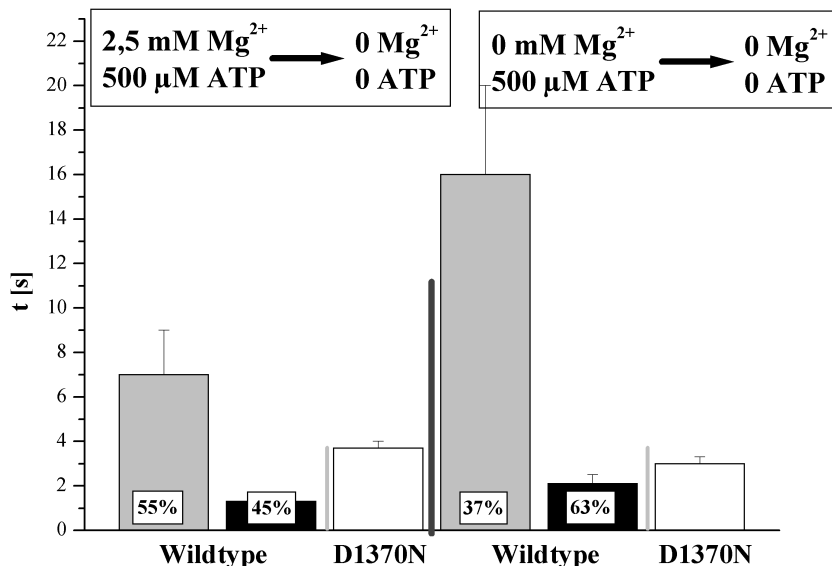
**Abb. 3.6-19 Vergleich der Öffnungskinetik bei ATP-Zugabe mit und ohne Magnesium**

Die Prozentangaben beziehen sich auf das Amplitudenverhältnis bei biexponentieller Anpassung. Die Balken repräsentieren das Mittel aus mindestens drei unabhängigen Patches ( $\pm$  S.E.).

**Links:** Wechsel 0ATP+0Mg  $\rightarrow$  2mM Mg+0,5 mM MgATP: **WT:**  $\tau_1 = 8 \pm 3$ s;  $\tau_2 = 0,33 \pm 0,02$ s /

**D1370N:**  $\tau = 1,1 \pm 0,5$ s.

**Rechts:** Wechsel 0ATP, 0Mg  $\rightarrow$  0Mg + 0,5 mM ATP: **WT:**  $\tau_1 = 7 \pm 2$ s;  $\tau_2 = 1,6 \pm 0,4$ s / **D1370N:**  $\tau = 0,9 \pm 0,3$ s.



**Abb. 3.6-20 Vergleich der Schließkinetik bei ATP-Entzug**

Der Schließvorgang der D1370N-Mutante bei ATP-Entzug konnte monoexponentiell angepasst werden. Alle Balken geben Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen wieder.

**Links:** Wechsel MgATP  $\rightarrow$  0ATP, 0Mg: **WT:**  $\tau_1 = 7 \pm 2$ s;  $\tau_2 = 1,3 \pm 0,3$ s / **D1370N:**  $\tau = 3,7 \pm 0,3$ s.

**Rechts:** Wechsel ATP (0Mg)  $\rightarrow$  0ATP, 0Mg: **WT:**  $\tau_1 = 16 \pm 4$ s;  $\tau_2 = 2,1 \pm 0,4$ s / **D1370N:**  $\tau = 3 \pm 0,3$ s.

## 4 Diskussion

### 4.1 Expression von CFTR

Der CFTR-Chloridkanal konnte in den vergangenen 13 Jahren seit der Klonierung [116] in diversen Zellen, die den Kanal endogen oder heterolog exprimieren, elektro-physiologisch charakterisiert werden [6, 24, 35, 50, 55, 73, 82, 138, 158, 161]. Messungen an rekonstituiertem Protein, das in schwarze Lipiddoppelschichten (*black lipid membrane*, BLM) eingelagert wurde, bewiesen, dass die CFTR-vermittelte Leitfähigkeit auf die Kanaleigenschaften des Proteins selbst zurückzuführen war [13]. Die meisten zur CFTR-Charakterisierung genutzten Systeme können aufgrund der Zellgröße, bzw. der Einlagerung weniger Kanäle (BLM) nur für die Messung einzelner Kanäle verwendet werden. Große Kanalpopulationen wurden bisher in isolierten Patches von NIH-3T3-Fibroblasten [5], Hela-Zellen [27] und *Xenopus*-Oozyten untersucht [149].

Die in dieser Arbeit erfolgte Messung an isolierten Makropatches von *Xenopus*-Oozyten, die das jeweilige Protein heterolog exprimieren, hat sich als gut geeignete Methode zur Untersuchung des CFTR und anderer Membranproteine bewährt [10, 14, 112, 149, 151]. Die Vorteile beim Arbeiten mit Oozyten sind vor allem die leichte Manipulierbarkeit und die große Translationseffizienz dieser Zellen. Nachteile sind, abgesehen vom apparativen Aufwand der Versuchstierhaltung, -operation und der Zellpräparation, vor allem die endogenen Leitfähigkeiten der Zellen, die bei elektro-physiologischen Untersuchungen berücksichtigt und möglichst eliminiert werden müssen [148]. Die Krallenfrösche sind wechselwarme Tiere und leben unter natürlichen Bedingungen bei ca. 20°C, was sich auch auf die Temperatursensitivität der Oozyten auswirkt [130]. Weinreich berichtete davon, dass der Abdichtwiderstand bei Messtemperaturen von mehr als 30°C sehr schnell bis auf wenige Megaohm zurückging, was den Abbruch der Messung zur Folge hatte [150]. Daher sind die hier gezeigten Patch-clamp Messungen bei 19 bis 25°C (in der Regel 20°C) durchgeführt worden. Bei der Interpretation muss der Temperatureinfluss auf den CFTR berücksichtigt werden [1, 2, 90, 121, 150], so dass die vorgestellten Ergebnisse möglicherweise nicht die unter humanphysiologischen Bedingungen vorwiegend auftretenden

Reaktionen darstellen. So beschrieb Schultz in [121] eine Verminderung der Offenwahrscheinlichkeit in Folge einer niedrigen Messtemperatur, Mathews et al. zeigten, dass sowohl der Öffnungs-, als auch der Schließvorgang stark von der Temperatur abhängig ist [89].

## 4.2 Elektrophysiologie an *Xenopus*-Oozyten

### 4.2.1 Zwei-Elektroden-Voltage-clamp

Für die Expressionskontrolle elektrogener Membranproteine in *Xenopus*-Oozyten sind Ganzzellmessungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*two-electrode voltage-clamp*, TEVC) gut geeignet. Durch die Zellgröße von ca. 1,2 mm (A ca. 23 mm<sup>2</sup>, siehe 3.1.2) ist die zeitliche Auflösung bei Spannungssprungexperimenten (einige Millisekunden [130]), in denen zunächst die Membran umgeladen werden muss, und bei Lösungswechselexperimenten (aufgrund der Messkammergröße meist im Sekundenbereich) jedoch eingeschränkt. Bei hohen Leitfähigkeiten (>100 µS) ist der Serienwiderstand ein weiteres Problem (1.8.1), welches in 4.6 diskutiert wird. Ein zusätzlicher Nachteil des TEVC besteht darin, dass die Zusammensetzung des Zytoplasmas nicht direkt beeinflusst werden kann. Stattdessen müssen entweder membranpermeable Substanzen eingesetzt werden (für den CFTR IBMX, Forskolin, dibutyryl-cAMP, 3.1.1) oder es ist für den Transport geladener Moleküle die Koexpression von weiteren Transportern notwendig (z.B. organischer Anionentransporter, rOAT, 3.4.1). Dies ermöglicht zudem eine beschleunigte CFTR-Aktivierung/Deaktivierung in Ganzzellmessungen, da cAMP im Gegensatz zu IBMX und Forskolin in der Zelle schnell wieder abgebaut werden kann (vgl. Abb. 3.1-1 und Abb. 3.4-2).

### 4.2.2 Makropatchmessungen

Die Messung an isolierten Makropatches ermöglicht im Vergleich zur Ganzzellmessung eine bessere Zeitauflösung, sowohl bei Spannungssprüngen (<100 µs), als auch bei Lösungswechseln (<100 ms, 3.2.3). Da in der *inside-out* Konfiguration sowohl die Extrazellulärlösung (Pipettenlösung), als auch die Intrazellulärlösung (Badlösung) vorgegeben werden, können endogene Leitfähigkeiten unterdrückt werden

(2.3.3). Darüber hinaus ist die zytoplasmatische Seite der Membran direkt zugänglich. Nachteile dieser Methode sind vor allem der erhöhte experimentelle und zeitliche Aufwand aufgrund der sehr hohen Messempfindlichkeit (pA-Bereich).

Das häufige Problem geringer Signale am isolierten Makropatch, wie es z.B. beim rOCT2 auftritt (<10 pA, [25]), besteht bei Messungen mit dem CFTR nicht. Nach drei bis viertägiger Expression betrug der durchschnittliche Strom bei CFTR-Aktivierung in über 90 % der Messungen mehr als 50 pA, was auch für kinetische Analysen ausreichend ist. Die CFTR-vermittelten Chloridströme von zwei etwa gleich großen Patches aus ein und derselben Zelle unterschieden sich um den Faktor 50 (3.4.2). Dieses ist nur durch eine Ungleichverteilung der Kanäle in der Membran zu erklären, weswegen TEVC-Expressionskontrollen keine Abschätzung der im Patch zu erwartenden Ströme zulassen und daher zumeist auf diese verzichtet wurde.

Das untersuchte Protein konnte eindeutig als CFTR identifiziert werden. Nur nach Expression der entsprechenden cRNA in die Oozyten traten im Voltage Clamp durch Stimulierung der endogenen Proteinkinasen aktivierbare Leitfähigkeiten auf (3.1.1 und 3.4.1). In allen bislang untersuchten Systemen, einschließlich der in Herzmuskelzellen exprimierten Isoform [96], ist die CFTR-Aktivität von Proteinkinasen und ATP abhängig (1.6), was auch für den in Oozyten exprimierten humanen CFTR bestätigt wurde (3.2.1, 3.3.2 und 3.4.2 [150]). Die gemessenen Umkehrpotenziale bei 40fachen Chloridgradienten zwischen Pipette und Bad ( $U_{rev} = \text{ca. } -90 \text{ mV}$ ) und nahezu symmetrischer Chloridverteilung ( $U_{rev} = \text{ca. } -3 \text{ mV}$ ) stimmten mit denen, aus der Nernst-Gleichung unter der Annahme einer reinen  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit errechneten, überein (3.2.7).

### 4.3 Inhibition des CFTR durch Aspartat

Aus der Spannungsabhängigkeit der Chloridströme ging hervor, dass mit zunehmender Haltespannung die Steigung der Kennlinie bei anliegendem Cl-Gradienten ( $[\text{Cl}_{\text{Pipette}}/\text{Cl}_{\text{Bad}}] = 156/4 \text{ mM}$ ) im Vergleich zu der unter nahezu symmetrischen Chloridbedingungen ( $[\text{Cl}_{\text{Pipette}}/\text{Cl}_{\text{Bad}}] = 156/146 \text{ mM}$ ) abnahm und eine Überschneidung dieser beiden Kennlinie auftrat, die dem aufgrund der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung

abgeschätzten Verlauf widersprach (3.2.7). Da bei positiven Haltespannungen vor allem ein Chloridfluss in die Zelle erfolgt, sollte der Strom primär von der Cl<sup>-</sup>-Konzentration in der Pipette abhängen und daher eine asymptotische Annäherung der IV-Kennlinien mit und ohne Cl-Gradient zu beobachten sein. Da dies nicht der Fall war, muss das Aspartat hemmend auf den CFTR-Chloridstrom wirken.

Linsdell et al beschrieben, dass bestimmte organische Anionen (u.a. Gluconat und Glutamat) den CFTR durch eine intrazelluläre Blockade der Kanalpore hemmten, wobei diese Hemmung im Gegensatz zur hier beobachteten Aspartatinhibition mit zunehmender Haltespannung abnahm [81, 83]. MOPS führte anionisch ebenfalls zu einer CFTR-Inhibition, die sowohl durch einen Block der Kanalpore, als auch durch eine Beeinflussung der Öffnungs- und Schließvorgänge zustande kam und bei Depolarisation zurückging [68]. Wu beschrieb die Abhängigkeit der Kanalleitfähigkeit von der intrazellulären Elektrolytkonzentration [157]. Da der Austausch von Aspartat gegen Chlorid keine Verringerung der Elektrolytkonzentration in der Badlösung darstellt, kann dies die Stromabnahme jedoch nicht erklären. Wie in Abb. 3.2-15 gezeigt, bewirkte der Wechsel von einer Lösung mit 146 mM Chlorid und 500 µM MgATP zu einer ATP-freien Lösung mit 4 mM Chlorid eine vorübergehende Stromzunahme, die in den meisten Messungen den stationären Chloridstrom bei anliegendem Chloridgradienten deutlich überschritt. Dieser Transient war auch bei Chloridkonzentrationswechseln unter kontinuierlicher ATP-Perfusion zu beobachten (Abb. 3.2-7). Ein solcher Strom kann nicht durch ein verzögertes Schließen der Kanäle nach ATP-Entzug erklärt werden, da hierdurch höchstens ein genauso hohes Signal wie unter stationären Bedingungen auftreten könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in den gezeigten Patch-Clamp-Messungen weder ein verzögertes Öffnen, noch ein verzögertes Schließen der Kanäle bei Lösungswechseln auftrat (Systemtotzeit ca. 200 ms).

Ein Vergleich der stationären ATP-induzierten Chloridströme mit Aspartat bzw. Chlorid in der Badlösung bei 0 mV gibt aufgrund der unterschiedlichen treibenden Kraft keinen Aufschluss über die Aspartatinhibition. Da die Geschwindigkeit des Stromrückgangs ( $\tau=1,45$  s) nach transientser Stromzunahme bei Cl-Wegnahme unter kontinuierlicher ATP-Perfusion deutlich langsamer als der Lösungsaustausch ist ( $\tau=200$  ms) und die Hemmung durch Aspartat bei Depolarisation zunimmt, ist eine

Blockade der Kanalpore unwahrscheinlich. Die einfachste Erklärung für die Inhibition durch Aspartat ist demnach ein Einfluss auf die Öffnungs- und/oder Schließvorgänge des CFTR. Aus Einzelkanalmessungen von Nagel et al. [96] kann nicht abgeleitet werden, ob durch Aspartat in der Badlösung die mittlere Geschlossenzeit, oder durch Chlorid die mittlere Offenzeit verlängert wird. In zahlreichen Modellen des CFTR-Öffnungszyklus [11, 98, 126] tritt ein Zwischenschritt auf, in dem ATP zwar gebunden, aber noch nicht hydrolysiert wurde und der Kanal geschlossen ist. Vorstellbar ist, dass das Aspartat eine solche CFTR-Konformation stabilisiert und somit einen Übergang zum Offenzustand erschwert, was auch die langsame Relaxationsrate von  $0,7 \text{ s}^{-1}$  nach vorübergehender Stromzunahme bei der Chloridwegnahme in kontinuierlicher ATP-Anwesenheit erklären würde, da diese dann durch die Öffnung bei ATP-Hydrolyse zustande käme.

#### 4.4 Regulation des CFTR durch Phosphorylierung

Die Phosphorylierung ist ein wichtiger Regulationsmechanismus bei Proteinen und tritt auch bei Membranproteinen häufig auf (Übersicht in [58], S. 187). So wird z.B. die Interaktion des Kaliumkanals Kir6.2 mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor SUR über die Phosphorylierung moduliert [113]. Beim CFTR koppelt die Phosphorylierung die Kanalöffnung an die Aktivität von Proteinkinasen, welche wiederum hormonell aktiviert werden (cGMP/cAMP-Produktion) und dadurch eine Signaltransduktion vermitteln. So induziert beispielsweise die Stimulierung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in Herzmuskelzellen die CFTR-Aktivität über die Proteinkinase A [54]. Die ATP/ADP-Abhängigkeit des CFTR gewährleistet wiederum, dass der Kanal nur dann geöffnet ist, wenn der Energiestatus der Zelle ausreichend hoch ist [104].

Als molekularer Mechanismus der Phosphorylierung wird von vielen Autoren eine Steuerung der Beteiligung der beiden Nukleotidbindestellen am Öffnungszyklus angenommen (u.a. [31, 46], s.u.), wogegen ein ursprüngliches Modell, nach dem durch die Phosphorylierung der regulatorischen Domäne (R-Domäne) eine Blockierung der Kanalpore aufgehoben wird (vergleichbar dem "Ball und Kette"-Prinzip der Shaker-Kaliumkanäle [61, 163]), mittlerweile ausgeschlossen wird [127] (1.6.1). Travis et al. konnten durch die Markierung des CFTR mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP zeigen, dass nicht

die ATP-Bindung, sondern die Hydrolyse durch die Phosphorylierung reguliert wird [139]. In biochemischen Messungen der ATPase-Aktivität des CFTR fanden Li et al. eine Zunahme des Hillkoeffizienten der ATP-Abhängigkeit auf 1,73 in Gegenwart von PKA, die sie auf die Einbeziehung einer zweiten ATPase-Aktivität durch deren Affinitätserhöhung zum ATP zurückführten [80]. Dieses bestätigte ein von Hwang et al. 1994 [66] vorgestelltes Modell, in dem bei niedriger Phosphorylierung nur eine Nukleotidbindestelle (NBD1) an der CFTR-Aktivität beteiligt ist [47, 151] und erst bei höherem Phosphorylierungsgrad die zweite Bindestelle involviert wird (Überblick in [47]).

Weder in Ganzzellmessungen, in denen die Konzentration des Substrats ATP nicht gesteuert werden kann, noch in Messungen an isolierten Makropatches ist eine exakte Kontrolle der Phosphorylierung möglich. So tritt nach PKA-Wegnahme direkt ein Stromrückgang auf, der auf eine partielle Dephosphorylierung zurückzuführen ist (Abb. 3.2-1). Diese führt zu nicht genau definierten Phosphorylierungszuständen, während bei kontinuierlicher PKA-Perfusion vermutlich eine stöchiometrische, aber nicht physiologische Phosphorylierung aller potenziellen Phosphorylierungsstellen des Kanals eintritt [47]. Aus Makropatchmessungen kann weder eine Beeinflussung der Einzelkanalleitfähigkeit, der Anzahl der Kanäle im Patch (N) noch ein Einfluss auf die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) abgeleitet werden. In den publizierten Messungen, in denen nur wenige Kanäle im Patch aktiv waren, trat keine Änderung der Anzahl der beteiligten Kanäle in Abhängigkeit von der Phosphorylierung auf [86]. Da auch keine Hinweise für eine Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit gefunden wurden [66], muss eine phosphorylierungsvermittelte Stromänderung auf die Änderung der Offenwahrscheinlichkeit zurückzuführen sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Bestimmung der apparenten ATP-Konzentrationsabhängigkeit des CFTR-Chloridstroms bei initialer und permanenter Kinaseaktivität im isolierten Makropatch gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades zu einer Erhöhung der apparenten Affinität für ATP führte. Die Koexpression des membranverankerten Fusionsproteins BR-PKA verringerte den apparenten  $K_M$ -Wert für MgATP im Vergleich zu den durch lösliche PKA präphosphorylierten Kanälen von 74 auf 41  $\mu\text{M}$  (Abb. 3.3-10). Diese Affinitätszunahme konnte durch Messungen mit membrangebundener cGMP-abhängiger Proteinkinase (cGKII) bestätigt werden. Der  $K_M$ -Wert für MgATP verringerte sich von



64  $\mu\text{M}$  auf 29  $\mu\text{M}$ , wenn cGMP in allen ATP-Lösungen enthalten war und somit eine kontinuierliche Phosphorylierung gewährleistete, anstatt nur zu Messbeginn eingesetzt zu werden (Abb. 3.4-13). In allen Messungen konnten die Konzentrationsabhängigkeiten am besten mit einer einfachen Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden. Eine gerichtete Veränderung der Konzentrationsabhängigkeiten im Verlauf der Messungen trat nicht auf, womit eine irreversible Deaktivierung der koexprimierten Kinasen auszuschließen ist (3.3.6 und 3.4.4).

Die publizierten Halbsättigungskonzentrationen sind sehr unterschiedlich. Dies hängt vermutlich mit den unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden in den untersuchten Systemen zusammen, die von der jeweiligen Aktivität der anwesenden Kinasen und Phosphatasen (s.o.) bestimmt wird. So wurde in Patchmessungen an Mäusezellen eine Halbsättigungskonzentration von 24  $\mu\text{M}$  [145], am Bilayer 111  $\mu\text{M}$  [51] und in Messungen an Milchdrüsenepithelzellen ein  $K_M$  von 500  $\mu\text{M}$  [7] (niedrig phosphorylierte Kanäle) gemessen. Mathews et al. fanden bei Messungen an CHO-Zellen zwei  $K_M$ -Werte (73 und 1,3 mM) für ATP, räumten aber ein, dass der höhere möglicherweise keine CFTR-Interaktion widerspiegelt. Bei den Messungen der ATP-Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Aktivität ermittelten Li et al., dass die Halbsättigungskonzentration des hoch phosphorylierten CFTR (303  $\mu\text{M}$ ) deutlich geringer war als die des wenig phosphorylierten Proteins (989  $\mu\text{M}$ ), ohne dass sich  $V_{\text{max}}$  änderte [80].

Als weiterer Hinweis für eine erst bei höherem Phosphorylierungsgrad erfolgenden Einbeziehung der NBD1 in die Kanalöffnung wurde die Stromerhöhung aufgrund eines "Offenarrest" durch AMP-PNP im Anschluss an die Perfusion mit ATP gewertet (Interaktion mit der NBD2), die umso geringer ausfiel, je größer der zeitliche Abstand zur Phosphorylierung mit löslicher PKA war [150]. Darüber hinaus führte Weinreich die Beschleunigung der Kanalöffnung bei ATP-Zugabe im Messverlauf darauf zurück, dass der Anteil der höher phosphorylierten Kanäle, bei denen auch die NBD2 an der Öffnung beteiligt sind, zurückgeht [150].

Die Beschleunigung der Öffnungskinetik im Messverlauf konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (3.2.6). Sie trat aber auch in den Messungen auf, in denen durch

die Gegenwart von BR-PKA bzw. cGKII (bei ständiger cGMP-Präsenz) eine permanente Phosphorylierung gewährleistet war. Außerdem wurde gezeigt, dass der Rundown nicht nur auf die fortschreitende Dephosphorylierung zurückzuführen ist (4.5.) und keine Zunahme des Hill-Koeffizienten der ATP-Konzentrationsabhängigkeit bei dauerhafter Kinaseaktivität auftrat. Ein Merkmal der CFTR-Aktivierung durch koexprimierte Proteinkinase war, dass sowohl die stationären Signale, als auch die Öffnungs- und Schließkinetik, nur zu Messbeginn beeinflusst wurden, obwohl die Halbsättigungskonzentration über den gesamten Messzeitraum bei permanenter Kinasestimulierung verringert war. Allerdings führte auch die wiederholte Perfusion mit PKA zu einer Zunahme des stationären Chloridstroms und unterbrach darüber hinaus die während der Messung auftretende Zunahme der Öffnungsrate bei ATP-Zugabe. Vorstellbar ist, dass durch die größere Beweglichkeit der löslichen PKA (katalytische Untereinheit) auch Serin/Threoninreste phosphoryliert werden, die für die membranverankerten Kinasen nicht zugänglich sind, was zu einer veränderten Aktivierung führt [47], die die physiologische Situation nicht widerspiegelt.

## 4.5 Rundown des CFTR-Chloridstroms

Ein häufig in elektrophysiologischen Messungen auftretendes Problem besteht in der zeitabhängigen Abnahme des Signals, dem "Rundown". Da dieses Phänomen vor allem an isolierten Patches, aber auch an dialysierten Zellen und seltener an ganzen, intakten Zellen beobachtet wird, wird dieser Prozess auf die durch Exzision bzw. Dialyse veränderte Regulation durch intrazelluläre Faktoren zurückgeführt [17, 136]. Die CFTR-abhängige Abnahme des Stroms im TEVC (3.1.3) ließ sich mit der Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration erklären, die zu einer Veränderung des elektrochemischen Gradienten und somit auch einem geringeren Chloridstrom führte, da die CFTR-aktivierte Leitfähigkeit über einen längeren Zeitraum (40 min) konstant blieb.

Für verschiedene Ionenkanäle ( $K_{ATP}$ , ORCC, ROMK1) wird eine fortschreitende Dephosphorylierung am isolierten Patch als Ursache für den Rundown vermutet [136], Übersicht in [17], da sich der Stromrückgang durch die Aktivität von Proteinkinase, vor allem der PKA, wieder kompensieren lässt [17]. Dies wird auch für den CFTR angenommen [46, 69, 79, 85, 166].

In den meisten Makropatchmessungen trat neben einer, vor allem nach der Phosphorylierung mit der löslichen PKA auftretenden, schnellen Dephosphorylierung [85], ein langsamer, sowohl in der Amplitude, als auch in der Kinetik stark variierender Signlrückgang auf (s. 3.2.2, 3.3.5, 3.4.5).

Die Signalabnahme durch den Rundown ist grundsätzlich auf eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit ( $P_O$ ) oder eine Abnahme der zu einer Öffnung fähigen Kanäle zurückzuführen [8, 17]. Da eine Verringerung der Kanalanzahl, wie sie für den spannungsaktivierten Calciumkanal als Ursache für den Signlrückgang angenommen [17] wird, für den CFTR bislang nicht beschrieben wurde, ist die Änderung von  $P_O$  als Ursache für den Rundown wahrscheinlich. Die verringerte Offenwahrscheinlichkeit des Kaliumkanals KAT1 wird auf eine verlangsamte Öffnung zurückgeführt [136]. In den hier vorgestellten Messungen war allerdings eine Beschleunigung der Öffnungskinetik (und auch der Schließkinetik bei ATP-Entzug) im Verlauf der Messung zu beobachten (3.2.6). Der Rundown war unabhängig von der verwendeten Phosphorylierungsmethode und konnte durch keine der drei Proteinkinasen (lösliche PKA, BR-PKA, cGKII) wieder vollständig aufgehoben werden. Die wiederholte Zugabe von löslicher PKA rief zwar in zahlreichen Experimenten eine deutliche Stromzunahme hervor (Beispiel in Abb. 3.2-5), erhöhte aber im Gegensatz zum Messbeginn nicht dauerhaft den Phosphorylierungsgrad, da der Strom nach PKA-Wegnahme wieder auf den Ursprungswert zurückging. Daher ist zu vermuten, dass der Rundown auch durch andere Prozesse als die Dephosphorylierung verursacht wird, wobei eine Beteiligung der Proteinkinase C [69] nicht ausgeschlossen werden kann, da in dieser Arbeit keine Experimente mit diesem Enzym durchgeführt wurden.

Von verschiedenen Autoren (Übersicht in [86]) wird der Rundown auf die Aktivität endogener Proteinphosphatasen (vor allem PP2A und PP2C [41, 46, 140, 160, 166], aber auch PP1, PP2B und möglicherweise auch die Alkalischen Phosphatase, siehe aber [46].) zurückgeführt. Da im isolierten Patch alle zytosolischen Proteine ausgeschwemmt werden, könnten nur die membranverankerten Phosphatasen den Rundown verursachen. Die Inhibierung der PP2B durch Calyculin und Microcystin konnte in Makropatchmessungen die Signalabnahme nicht unterdrücken [150]. Zahlreiche Autoren beschreiben die membrangebundene PP2C als physiologischen Regulator des CFTR [85, 86, 140, 159, 166], der in bestimmten Zelllinien kopräzipitiert

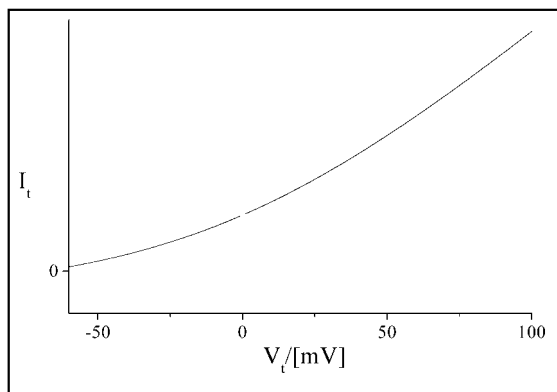
werden kann [166]. Aufgrund der Magnesiumabhängigkeit dieser Phosphatase kann eine Beteiligung der PP2C unter Mg-freien Messbedingungen ausgeschlossen werden. Der Rundown trat jedoch auch in den Messungen, wo Mg nur kurzzeitig präsent war, unverändert auf (3.2.2). Es ist möglich, dass bislang unbekannte Phosphatasen zu dem Rundown beitragen. Trotzdem erscheint es wahrscheinlich, dass auch andere Faktoren für den irreversiblen Anteil dieser Signalabnahme verantwortlich sind. Für die neuronalen Calciumkanäle wird der Rundown auf die Proteolyse durch die Aktivität der membrangebundenen Proteinase Calpain zurückgeführt [17], was zu einer Verringerung der Kanalanzahl führte. Für den CFTR (s.o.) wurde in Einzelkanalmessungen ein solcher Prozess nicht beschrieben.

Die wahrscheinlichste Ursache für die beobachtete Abnahme des Stroms ist der Verlust der Interaktion mit zytosolischen oder membranassoziierten Faktoren durch die Exzision des Patches, die die Aktivität der Kanäle beeinflusst. So wird für den carboxyterminalen Teil des CFTR von einer hochaffinen Bindung der PDZ1 Domäne des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Austauscher regulierenden Faktors (NHERF) berichtet [72], die die zelluläre Lokalisation und die physiologische Regulierung beeinflusst. Der N-Terminus des CFTR kann wiederum Syntaxin-1A binden [100], ein an der Vesikelfusion beteiligtes Protein, was die Aktivität des CFTR reguliert. Da auch für andere Ionenkanäle von einer Rundownregulierung durch solche Interaktionen berichtet wird [17], erscheint dieses auch für den CFTR wahrscheinlich.

#### **4.6 Gibt es eine Interaktion zwischen ENaC und CFTR?**

Der Mechanismus der Beteiligung von CFTR und epitheliale Natriumkanal (ENaC) an der Regulation von Flüssigkeits- und Salzsekretion bzw. Absorption in Epithelien, insbesondere in den Atemwegen [22, 106, 154], ist nach wie vor nicht geklärt. Eine Inhibition des ENaC durch den CFTR wurde erstmals 1995 von Stutts beschrieben [132] und in den folgenden Jahren, insbesondere in Voltage-Clamp-Messungen an *Xenopus*-Oozyten wiederholt beschrieben [23, 29, 60, 76, 77, 87, 120]. Dagegen berichteten Reddy et al. [111], dass in Schweißdrüsen die Aktivierung des CFTR zu einer erhöhten ENaC-Aktivität führte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen am isolierten Makropatch bei Koexpression von ENaC und CFTR zeigten weder eine Inhibition, noch eine Stimulierung des ENaC durch den CFTR. Im Zwei-Elektroden-Voltage-clamp an intakten Oozyten wurde ebenfalls keine Beeinflussung gefunden. Messungen der Aufnahme von  $^{22}\text{Na}^+$  in nicht spannungsgeklemmten Zellen zeigte, dass nur in Gegenwart eines Chloridgradienten die CFTR-Aktivierung zu einer ENaC-Stimulierung führt [99]. Die von Reddy et al. beschriebene Stimulierung des ENaC durch die Aktivierung des CFTR war vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Aktivierung im current-clamp-Modus bei starkem NaCl-Gradienten erfolgte. Daher führte eine CFTR-Aktivierung zu einer Verschiebung des Membranpotenzials und somit gemäß der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung zu einer Erhöhung der Natriumleitfähigkeit (Abb. 4.6-1). Die publizierte Inhibition des ENaC durch den CFTR beruhte hingegen vor allem auf Strommessungen unter Voltage-Clamp-Bedingungen an der ganzen Oozyte [23, 29, 76, 77, 87], wurde aber auch für andere Zelllinien (MDCK-Zellen, 3T3-Zellen) beschrieben [131].



**Abb. 4.6-1 IV-Relation eines spannungsunabhängigen Na-Kanals**

(luminal: 150 mM NaCl; 10 mM NaCl auf permeabilisierter basolateraler Seite). Der Strom wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung errechnet und gegen das transepitheliale Potenzial aufgetragen. Beim Übergang zu positiven Potenzialen nimmt die Natriumleitfähigkeit zu; dies erklärt die offensichtliche Aktivierung.

Da der isolierte Makropatch im Gegensatz zu Ganzzellmessungen die Betrachtung spezifischer Leitfähigkeiten ermöglicht, müsste eine direkte Interaktion von CFTR und ENaC sehr gut zu bestimmen sein, sofern diese nicht über zytosolische Faktoren, die durch das Ausreißen des Patches verloren gehen, erfolgt. Es war kein Unterschied in der Natriumleitfähigkeit zwischen aktivierter und geschlossenem CFTR festzustellen (Abb. 3.5-8). Selbst wenn der Natriumkanal in deutlich geringerer Dichte als der CFTR in der Membran vorlag, so dass eventuelle topologische Interaktionen hätten auftreten müssen (beide Kanäle besitzen unter den Messbedingungen vergleichbare Leitfähigkeiten), trat keine Inhibition auf.

Die für Schweißdrüsen unter Current-clamp-Bedingungen vermutete elektrochemische Kopplung von Natrium- und Chloridleitfähigkeit [63] kann die in Ganzzellmessungen an Oozyten beschriebene Inhibition unter Voltage-Clamp-Bedingungen nicht erklären. Eine mögliche Erklärung für den offensichtlich hemmenden Einfluss von CFTR auf den ENaC [29, 60, 76, 77, 87, 120] lieferte die Analyse der jeweiligen Messbedingungen. Wie in 1.8.1 beschrieben, muss aufgrund der durch Ionenkanäle verursachten sehr großen Leitfähigkeiten in der Oozytenmembran (bisweilen bis 1 mS) beachtet werden, dass bei Ganzzellmessungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme bei der Verwendung von nur einer Referenzelektrode, die Spannung nicht nur über die Oozytenmembran, sondern auch über den Serienwiderstand abfällt. Da es bei einigen kommerziell erwerblichen Voltage-Clamp Verstärkern gar nicht möglich ist, mit zwei Referenzelektroden zu arbeiten [99], ist zu vermuten, dass die beobachtete Inhibition nicht das Resultat einer Protein-Protein-Interaktion ist, sondern auf den beschränkenden Effekt des (relativ konstanten) Serienwiderstandes beruht.

Zur Bestimmung des hemmenden Effekts wurde immer von einer Badlösung mit Natrium und Amilorid zu einer amiloridfreien Lösung gewechselt und aus der Differenz der so bestimmten Ganzzelleitfähigkeiten auf den amilorid-sensitiven Strom geschlossen. Wenn der Strom durch den Serienwiderstand limitiert ist, kann jedoch keine starke Stromzunahme bei ENaC-Aktivierung durch Amilorid-Wegnahme mehr erfolgen. Briel fand eine Abhängigkeit der ENaC-Inhibition von der CFTR-Expression (1 Referenzelektrode, [23]). Wenn die Maximalleitfähigkeit durch den Serienwiderstand limitiert ist, welcher bei den einzelnen Messungen in der Regel vergleichsweise konstant ist, kann bei aktiviertem CFTR die Leitfähigkeit nur noch bis zu dem vom Serienwiderstand begrenzten Wert ansteigen, wobei diese Differenz umso geringer ist, je größer die CFTR-Leitfähigkeit ausfällt. Dies würde dann zu der beobachteten Inhibition führen. Hierdurch lässt sich ebenfalls der Rückgang der beobachteten Inhibition bei Verringerung der extrazellulären Chloridkonzentration erklären [23, 76], da unter diesen Bedingungen der Anteil des CFTR am Gesamtstrom durch den veränderten Chloridgradienten deutlich verringert ist [99]. Es ist nicht auszuschließen, dass auch bei den Messungen an MDCK und 3T3-Zellen die beschriebene Inhibition [131] durch die Limitierung aufgrund des Serienwiderstandes zurückzuführen ist.

Aufgrund der Kanaleigenschaften ist eine Beteiligung des CFTR sowohl an sekretorischen Prozessen, als auch an absorptiven Vorgängen möglich. Wie in 1.4 beschrieben, erlaubt der CFTR in den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen die Rückresorption des Chlorids aus dem Primärschweiß. Zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität wird hierzu Natrium parallel entlang seines elektrochemischen Gradienten über den epithelialen Natriumkanal aufgenommen. Da das Epithel im Drüsengang weitgehend wasserundurchlässig ist, entsteht ein hypotonischer Endschweiß. In Messungen an permeabilisierten Schweißdrüsen wurde gezeigt, dass die CFTR-Stimulierung zu einer Erhöhung der amilorid-sensitiven Natriumleitfähigkeit, des ENaC, führte [111]. Im Gegensatz zur Schweißdrüse besteht die Aufgabe des CFTR im Dünndarm darin, durch Sekretion von Chlorid, Natrium und Wasser den Darminhalt flüssig zu halten, bevor im Enddarm die Rückresorption von Flüssigkeit erfolgt. Damit ein passiver Chloridfluss über den CFTR bei Bedarf erfolgen kann, muss über den basolateral exprimierten Na/K/2Cl-Kotransporter aktiv Chlorid in die Zelle befördert werden, während andere Chloridtransporter nach Greger [48] nicht zu der Chloridanreicherung beitragen. Bei Neugeborenen mit zystischer Fibrose ist diese Flüssigkeitssekretion gestört, es kommt in 10 % aller Fälle zum Darmverschluss (Mekonium Ileus).

Die beiden meistverbreiteten Theorien über den Zusammenhang zwischen dem CFTR, der erhöhten Anfälligkeit der Lunge für Infektionen und der damit einhergehenden erhöhten Viskosität beruhen auf der Annahme, dass im Lungenepithel vor allem die Salzabsorption erfolgt. Die sogenannte "isotonic volume / mucus clearance"-Hypothese [21] basiert darauf, dass Natrium transzellulär absorbiert wird, während das Chlorid vor allem parazellulär aus dem Lumen befördert wird. Aufgrund einer relativ hohen Wasserpermeabilität nehmen die Zellen Wasser auf, so dass die die Epithelzellen bedeckende Flüssigkeit (airway surface liquid, ASL) isoosmolar ist. Nach dieser Theorie ist die bei CF-Kranken fehlende Inhibition des ENaC durch den CFTR dafür verantwortlich, dass zuviel Elektrolyte und damit auch Wasser aufgenommen werden, was zu einer Verringerung der ASL und damit der mukuziliären Clearance führt. Nach der sogenannten "low salt"-Theorie [129, 162] wird das Wasser in der Schicht um das Epithelgewebe durch Oberflächenkräfte [152] und nicht-permeable Osmolyte [162] zurückgehalten, so dass diese Schicht hypoton ist. Bei einer zystischen Fibrose ist die Elektrolytaufnahme gestört, was dazu führt, dass die

in der ASL vorhandenen antibiotischen und antimikrobiellen Substanzen durch die erhöhte Salzkonzentration inaktiviert sind.

Beim Vergleich dieser Theorien fällt auf, dass für die "low volume"-Hypothese die Kanalfunktion des CFTR nahezu überflüssig ist, einen parazellulärer Chloridfluss erfordert und eine Hemmung des ENaC durch den CFTR angenommen werden muss. Bei der "high salt"-Hypothese hingegen ist keine dieser Annahmen erforderlich, die Kanalfunktionen von ENaC und CFTR genügen zur Erklärung der Elektrolytflüsse. Alle Modelle, die auf einem inhibitorischen Einfluss des CFTR auf den ENaC basieren, erfordern die Existenz eines parazellulären Transportwegs für Chlorid [22, 23, 48, 123], dessen Vorhandensein bislang nicht bewiesen werden konnte [22], erscheint es aus physiologischer Sicht wenig sinnvoll, dass Chlorid überwiegend parazellulär passiert, wenn in der basolateralen Membran ein effektiver und genau regulierter Chloridkanal vorhanden ist. Auf der Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse kann eine ENaC/CFTR-Interaktion durch Protein-Protein-Wechselwirkungen im nativen Lungenepithel zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber sehr unwahrscheinlich.

## **4.7 Regulation des Öffnungszyklus des CFTR**

### **4.7.1 Ist für die Kanalöffnung eine ATP-Hydrolyse notwendig?**

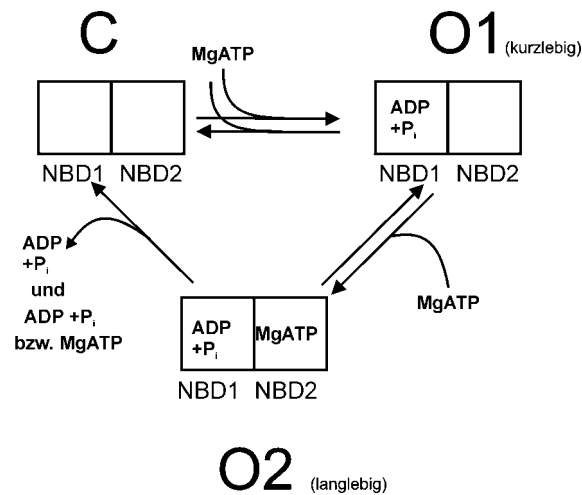
Nachdem aus der Aminosäuresequenz des CFTR die ersten strukturellen Eigenschaften abgeleitet wurden [116], begann eine Diskussion über die Funktionsweise dieses Proteins, insbesondere über die Notwendigkeit einer ATP-Hydrolyse. Da der CFTR sein Substrat nur entlang des elektrochemischen Gradienten befördert, ist eine Energiezufuhr nicht notwendig und ATP-Hydrolyse scheint einen überflüssigen Verbrauch von Energie darzustellen. Der Vergleich der ATP-Umsatzraten des CFTR (ca.  $1-2 \text{ s}^{-1}$ ) mit der Na-K-ATPase ( $60-70 \text{ s}^{-1}$ ) zeigt, dass dieser Verbrauch vernachlässigbar gering ausfällt. Darüber hinaus sind andere, vor allem regulatorische, Proteine bekannt, die die Hydrolyse von Nukleotidtriphosphaten dazu nutzen, die Dauer ihrer katalytischen Aktivität zu kontrollieren. Hierzu gehören unter anderem die GTP-hydrolysierenden Proteine (G-Proteine), von denen beispielsweise der



Elongationsfaktor EF-1 durch "Festhalten" der tRNA am Ribosom vor der Transpeptidierung gewährleistet, dass aufgrund der verlängerten Verweildauer am Ribosom keine Fehlpaarungen zwischen tRNA und mRNA auftreten. Die Aufgabe der Chaperone (z.B. Hsp70), die sehr langsame ATPasen sind, besteht wiederum darin, während der Proteinfaltung durch die von ihnen verursachte Verzögerung, infolge der Bindung an die das Ribosom verlassende Polypeptidkette, das Entstehen der thermodynamisch stabilsten Struktur zu unterstützen. Da für andere ABC-Proteine belegt werden konnte, dass eine ATP-Hydrolyse für eine enzymatische Aktivität notwendig ist [119], erschien dies auch für den CFTR wahrscheinlich. Allerdings ist der CFTR aus verschiedenen Gründen einzigartig, da er sein Substrat entlang des Cl<sup>-</sup>-Gradienten transportiert, über eine regulatorische Domäne verfügt und seine beiden Nukleotidbindestellen (NBD) stark unterschiedlich sind (Homologie ca. 30 %). Bei anderen ABC-Transportern sind die NBDs nahezu identisch, bzw. wird aus zwei Proteinen mit jeweils nur einer NBD ein katalytisch aktives Homodimer gebildet [74].

Nach dem folgenden Modell des CFTR-Öffnungszyklus (stark vereinfacht nach [47, 66, 151, 164]) öffnet die ATP-Hydrolyse an der Nukleotidbindestelle 1 den Kanal und die Umsetzung eines zweiten ATP-Moleküls an der Nukleotidbindestelle 2 führt zu seinem Schließen. Messungen der ATP-Hydrolyse von aufgereinigtem CFTR-Protein zeigten, dass die Hydrolyserate der Öffnungsrate des Kanals von ca.  $1 \text{ s}^{-1}$  entsprach [80]. Darüber hinaus wiesen Walker-A-Mutanten (K464A, K1250A), neben einem veränderten Hydrolysemuster, auch veränderte Öffnungs- und Schließkinetiken auf [47, 127]. Da in zahlreichen Experimenten weder mit nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga, noch mit ATP in Abwesenheit zweiwertiger Kationen, die für eine Hydrolyse notwendig sind (v.a. Magnesium), eine messbare Kanalaktivität auftrat [5, 26, 96, 121], schien die Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse für eine CFTR-Aktivierung belegt. Dieses widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die Messung eines CFTR-Chloridstroms (Abb. 3.6-1) im Patch unter Mg-freien Bedingungen, wobei auch keine anderen zweiwertigen Metallionen anwesend waren, kann nur dadurch erklärt werden, dass entweder Magnesium am Kanal gebunden bleibt, oder der Kanal auch nicht-hydrolytisch aktiviert werden kann. Die permanente Magnesiumbindung ist sehr unwahrscheinlich, da dann eine Stromabnahme zu erwarten wäre, wenn überwiegend mit magnesiumfreien Badlösungen perfundiert wird. Die Beobachtung eines CFTR-Chloridstroms mit Mg-freiem ATP ist

offenbar nicht abhängig von der verwendeten Zelllinie, da sowohl an nativen Schweißdrüsen [110], Hela-Zellen [67], als auch an Oozyten (diese Arbeit) eine entsprechende Stromantwort bei präphosphorylierten Kanälen gefunden wurde.



**Abb. 4.7-1 Modell der CFTR-Aktivierung durch ATP** (stark vereinfacht nach [47, 66, 151, 164]) Zunächst sind beide NBDs unbesetzt und der Kanal geschlossen (C). Die Bindung und die nachfolgende Hydrolyse führen zum Übergang in einen Kanalzustand (O1), der durch eine sehr kurze Lebensdauer oder geringe Leitfähigkeit gekennzeichnet ist [47]. Bindet jedoch vor der Abdissoziation der Hydrolyseprodukte ein weiteres ATP-Molekül an die zweite NBD, wobei angenommen wird, dass dies nur bei höherer Phosphorylierung möglich ist [66], dann entsteht der "eigentliche", längere Offenzustand O2 des Kanals. Das Schließen wiederum erfolgt, je nach Modell, durch die Hydrolyse und/oder Abdissoziation der gebundenen Nukleotide.

In der Mehrzahl der veröffentlichten Messungen, einschließlich Makropatchmessungen an Oozyten [150], traten unter magnesiumfreien ATP-Bedingungen keine oder nur sehr geringfügige Chloridströme auf [5, 28, 80, 150]. Eine mögliche Erklärung liefert die drastisch veränderte ATP-Konzentrationsabhängigkeit des stationären Chloridstroms (3.4.4). So erhöhte sich in den hier vorgestellten Messungen mit vermutlich vergleichsweise hoher Phosphorylierung die apparente ATP-Halbsättigungskonzentration bei der Wegnahme des Magnesiums von ca. 70  $\mu\text{M}$  auf über 1 mM, was einer Affinitätsabnahme um den Faktor 14 entsprach. In anderen Systemen wurden  $K_M$ -Werte für MgATP von bis zu 500  $\mu\text{M}$  [7] bestimmt. Wenn bei diesen Zellen eine vergleichbare Mg-Abhängigkeit des  $K_M$ -Werts besteht, wäre bei der eingesetzten ATP-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  [80] bzw. 1 mM [28] ohne Mg kein nennenswerter Chloridstrom zu erwarten.

Die CFTR-Aktivierung durch AMP-PNP oder andere nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga wurde sowohl beschrieben [2, 110], als auch bestritten [45, 51, 66]. Im

Luciferaseassay rief ATP $\gamma$ S ein nur 7fach kleineres Signal als die gleiche MgATP-Konzentration hervor (3.6.4). Dagegen induzierte die gleiche Menge AMP-PNP ein zweitausendfach geringeres Signal. ATP $\gamma$ S konnte außerdem als Substrat zur CFTR-Phosphorylierung durch die PKA genutzt werden (nicht gezeigt), was seine Hydrolysierbarkeit bestätigt. Die beobachteten Chloridströme mit 5 mM AMP-PNP (Abb. 3.6-10) ohne ATP sind dagegen ein Beleg für eine nichthydrolytische Aktivierung und können aufgrund der Signalamplitude nicht durch mögliche ATP-Verunreinigungen (maximal 2,5  $\mu$ M) erklärt werden (Abb. 3.6-10).

Aleksandrov et al. fanden in Einzelkanalmessungen heraus, dass unter nichthydrolytischen Bedingungen (5 mM AMP-PNP) mit sinkender Temperatur die Wahrscheinlichkeit zur Kanalöffnung zunahm, während dies für die Öffnung unter hydrolytischen Bedingungen (MgATP) umgekehrt war, wie es für einen enzymatischen Prozess zu erwarten ist [3]. Somit wäre nur bei niedrigeren Temperaturen, wie auch in dieser Arbeit, die Wahrscheinlichkeit nichthydrolytischen Öffnens erhöht. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass unter bestimmten Bedingungen (Temperatur, Phosphorylierungsgrad, ATP-Konzentration) eine Kanal-Öffnung ohne ATP-Hydrolyse möglich ist. Ein entsprechend modifiziertes Modell des Öffnungszyklus erfolgt unter Berücksichtigung der Experimente mit NBD-2 Punktmutanten, AMP-PNP, TRISATP und der Analyse der kinetischen Daten in 4.7.5.

#### **4.7.2 Beteiligung von Magnesium an der Kanalöffnung**

Aus den Patch-Clamp-Messungen ging außerdem hervor, dass die Bedeutung des Magnesiums für den CFTR-Öffnungszyklus über die eines Kofaktors für die ATP-Hydrolyse hinausgeht. Bei vielen ATPasen wird die Bindung des MgATP-Komplexes über die Interaktion des Magnesiums mit der hochkonservierten Walker-B-Domäne [67] vermittelt. Die transienten Ströme bei dem Wechsel von Lösungen mit MgATP zu Lösungen, die weder Magnesium noch ATP enthielten (Abb. 3.6-12), belegten darüber hinaus, dass Magnesium auch einen inhibitorischen Einfluss auf den CFTR hat. Über konzentrationsabhängige Einflüsse des Magnesiums auf den Öffnungszyklus liegen bislang keine Erkenntnisse von anderen Gruppen vor.

Travis et al. berichteten, dass die Markierung des CFTR durch 8-N<sub>3</sub>-Azido[ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-ATP von der Magnesiumanwesenheit abhing, so dass die apparente 8-N<sub>3</sub>-AzidoATP-Affinität von ca. 10  $\mu$ M (3 mM Mg<sup>2+</sup>) auf etwa 100  $\mu$ M (ohne Mg-Zugabe, keine Angabe der Chelatorkonzentration) anstieg [139]. Mit unterschiedlich affinen Mg-Chelatoren (EDTA, CDTA) wurde die freie Mg<sup>2+</sup>-Konzentration in dieser Arbeit über einen großen Bereich (10<sup>-3</sup>-10<sup>-12</sup> M) bei gleichzeitig niedriger MgATP-Konzentration ( $[MgATP]/[ATP] \ll 0,01$ ) titriert und mit Messungen verglichen, in denen das ATP selbst als Mg-Chelator diente, so dass der Anteil an freien Mg-Ionen gering, die MgATP-Konzentration aber vergleichsweise hoch war (31  $\mu$ M-820  $\mu$ M, Abb. 3.6-13, Abb. 3.6-14 und Abb. 3.6-15). Es wird deutlich, dass die stationären Ströme bei höheren Magnesiumkonzentrationen verringert sind und schon bei geringen freien Mg-Mengen sehr hohe Ströme auftreten, so dass für eine maximale Kanalaktivität offensichtlich eine freie Mg-Konz. von weniger als 1  $\mu$ M ausreicht.

Aus Abb. 3.6-12 geht hervor, dass bei dem Umschalten von einer Lösung mit 5 mM MgATP (+ 2 mM freies Mg) zu Lösungen, denen statt Magnesium 2 mM EDTA zugesetzt waren und die unterschiedliche Mengen an ATP (5; 1,5; 0,5; und 0,1 mM) enthielten, die rundown-korrigierte Höhe der jeweiligen Transienten konstant war. Dagegen traten bei dem umgekehrten Umschalten transiente Ströme (mit geringerer Amplitude) nur bei den Wechseln von hohen ATP-Konzentrationen in Abwesenheit von Magnesium auf. Aus der fehlenden Abhängigkeit der Amplitude des Transienten von der Mg-Konzentration folgt, dass die Stromzunahme nicht vom ATP vermittelt wird, sondern durch die, in allen Lösungen gleiche, Zugabe des Magnesiumchelators EDTA verursacht sein muss. Da ein Transient auch dann auftrat, wenn von einer Lösung mit MgATP zu einer Lösung ohne ATP, aber mit Chelator (auch bei CDTA statt EDTA) gewechselt wurde, bestätigt dies, dass der Effekt durch das Abfangen der freien Magnesiumionen verursacht sein muss. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die transiente Stromzunahme dadurch hervorgerufen wird, dass an den CFTR gebundenes Magnesium sehr schnell freies ATP bindet und dadurch öffnet. Es erscheint daher gerechtfertigt, auf einen inhibitorischen Effekt des Magnesiums zu schließen, der nicht direkt an die ATP-Bindung gekoppelt ist. Insbesondere die Messungen ohne Chelatorzusatz bestätigen dies auch für die stationären Ströme. So ist das Signal mit 910  $\mu$ M Gesamtmagnesium, 90  $\mu$ M freiem Magnesium und

ca. 820  $\mu\text{M}$  MgATP deutlich höher als das in der Standard-ATP-Lösung, die 3,5 mM Gesamtmagnesium, 2 mM freies Magnesium und ca. 1,5 mM MgATP enthält (Abb. 3.6-14).

Die komplexen Einflüsse des Magnesiums zeigten sich auch in den Öffnungsraten bei ATP-Zugabe. So erfolgte die Öffnung der Kanäle in kontinuierlicher Anwesenheit millimolarer Magnesiumkonzentrationen mit einer durchschnittlichen Rate von ca.  $0,8 \text{ s}^{-1}$ , wohingegen bei dauerhafter Mg-Abwesenheit eine biexponentielle Anpassung nötig war, die Öffnungsraten von  $0,14 \text{ s}^{-1}$  (55 %) bzw.  $0,63 \text{ s}^{-1}$  (45 %) ergab. Wurde dagegen, ausgehend von einer nukleotid- und magnesiumfreien Badlösung zu MgATP gewechselt, beschleunigte sich die schnellere Rate zu  $3 \text{ s}^{-1}$  (55 %) wohingegen die langsame weitestgehend konstant blieb ( $0,125 \text{ s}^{-1}$ ; (45 %), (Tab. 1.2-1)).

Es ist vorstellbar, dass ein Teil der Kanäle vor der ATP-Zugabe durch die Magnesiumbindung in einer Konformation vorliegt, die nicht zu einer sofortigen Aktivierung fähig ist und zunächst einer geschwindigkeitsbestimmenden Abdissoziation des Magnesiums unterliegt. Andererseits bindet das ATP selbst, wie auch anhand der Vergleiche der Affinitäten deutlich wurde (Abb. 3.6-2), erheblich besser, wenn es in einem Komplex mit Magnesium vorliegt. Die Messungen mit der Walker-B Mutante D1370N unterstützen dies. So zeigte diese Mutante keine Unterscheidung zwischen MgATP und Mg-freiem ATP, sowohl hinsichtlich der apparenten Affinität, als auch der Maximalströme und der Öffnungs- und Schließraten (Abb. 3.6-19 und Abb. 3.6-20).

Von vornherein ist es mit Hilfe der angewendeten Messmethode nicht möglich, zwischen den Reaktionen der beiden Nukleotidbindestellen (NBD) zu unterscheiden und somit abzuleiten, an welcher der NBDs die Interaktion mit dem Magnesium die beobachteten Effekte hervorruft. Da Magnesium einen eindeutigen Einfluss auf die Öffnungskinetik des Wildtyps, nicht jedoch auf die der D1370N-Mutante hatte (Abb. 3.6-19), kann die Interaktion des Magnesiums mit der NBD2 als gesichert gelten. Diese Messungen werden im Folgenden eingehender diskutiert.

### **4.7.3 Sind beide Nukleotidbindestellen an der Öffnung beteiligt?**

Zunächst soll geklärt werden, inwieweit eine der beiden oder beide Nukleotidbindestellen an dem Öffnungsvorgang des Kanals beteiligt sind. Geht man davon aus,

dass bei "mäßiger" Phosphorylierung nur die NBD1 involviert ist, so dürfte eine Mutation in der NBD2 den Öffnungsvorgang nicht negativ beeinflussen. Da aber eindeutig nicht nur der Schließvorgang, sondern auch die Öffnung des Kanals bei der Walker-A Mutante K1250A drastisch verlangsamt ist (Abb. 3.6-8), deutet dies darauf hin, dass die zweite Nukleotidbindestelle ebenfalls von Bedeutung für die Kanalöffnung ist. So verringert sich auch die apparente ATP-Affinität des gesamten Proteins bei dieser Mutante (Abb. 3.6-7).

Die publizierten Resultate mit der NBD1-K464A Mutante sind widersprüchlich, so wurde zunächst eine verlangsamte Öffnung beschrieben [28, 52], neuere Experimente [108] und auch Makropatchmessungen an *Xenopus*-Oozyten (B. Himmel, persönliche Mitteilung) ergaben dagegen, dass sowohl die Geschwindigkeit des Öffnens, als auch des Schließens im Vergleich zum Wildtyp kaum verringert waren. Allerdings wiesen die Makropatchmessungen auch bei der K464A-Mutante auf eine verringerte apparente ATP-Affinität hin (B. Himmel). Messungen von Ramjeesingh et al., in denen der Einfluss dieser beiden Walker-A Mutanten in Bezug auf die ATPase-Aktivität des aufgereinigten Proteins mit dem Effekt auf die Öffnungs- und Schließkinetik verglichen wurde, ergaben, dass die ATPase-Aktivität durch jede der beiden Mutationen um mehr als 50 % abnahm. Von diesen beiden Mutanten wies jedoch nur die K1250A-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlängerte mittlere Offen- und Geschlossendauer bei Einzelkanalmessungen auf [108]. Die Makropatchmessungen (Abb. 3.6-8) bestätigten dieses sehr langsame Öffnungs- und Schließverhalten der K1250A-Mutante. Während die NBD1-Mutante K464A auch unter Mg-freien Bedingungen bei ATP-Zugabe öffnet (B. Himmel), konnten auch 25 mM ATP in Magnesiumabwesenheit keine Ströme bei K1250A-exprimierenden Zellen hervorrufen (3.6.3), was die Beteiligung der NBD2 an der Kanalöffnung bestätigt.

Die Messungen mit der Walker-B Mutante D1370N gaben weitere Hinweise auf die Beteiligung der NBD2 an der Kanalöffnung, da diese im Vergleich zu der K1250A-Mutante sowohl schnell öffnete, als auch schloss (Abb. 3.6-19 und Abb. 3.6-20). Zusätzlich ist die Magnesiumabhängigkeit, sowohl der Kanalöffnung, als auch des Schließvorgangs, verglichen mit dem Wildtyp, drastisch verändert (3.6.6). Eindeutig ist, dass bei der D1370N-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp, weder bei der

Öffnungskinetik, noch bei der Geschwindigkeit des Schließvorgangs, ein Unterschied zwischen MgATP und ATP besteht (Abb. 3.6-19 und Abb. 3.6-20).

Unter der Annahme, dass in Magnesiumabwesenheit eine Hydrolyse an keiner der beiden Nukleotidbindestellen möglich ist, ergeben sich aus dem Vergleich der Öffnungskinetiken von Wildtyp und D1370N bei ATP-Zugabe in der kontinuierlichen Abwesenheit des Magnesiums Hinweise auf die Öffnungsvorgänge: Während der Wildtyp mit einem biexponentiellen Stromanstieg auf die ATP-Zugabe reagiert, verläuft die Stromzunahme bei der D1370N-Mutante etwa 1,8fach schneller (monoexponentielle Anpassung). Da die Kinetik der D1370N unverändert ist, wenn der Wechsel stattdessen zu einer Lösung mit MgATP erfolgt, was bei dem Wildtyp zu einer drastischen Beschleunigung der schnellen Komponente führt, muss die magnesiuminduzierte Veränderung auf die NBD2 zurückzuführen sein (Abb. 3.6-19 und Abb. 3.6-20). Dass dies bei der D1370N-Mutante nicht der Fall ist, kann entweder daran liegen, dass dieser schnelle Schritt wegen der Mutation nicht mehr stattfinden kann, oder dass eine andere Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Da die schnelle Rate des Wildtyps von  $3 \text{ s}^{-1}$  bei dem Wechsel von magnesiumfreier Badlösung zu MgATP die der publizierten ATPase-Aktivität [80] deutlich überschreitet, lässt sich darüber hinaus vermuten, dass nicht die MgATP-Hydrolyse, sondern die Bindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Kanalöffnung ist. Verschiedene Autoren berichten über zwei Offenzustände  $O_1$  und  $O_2$  des CFTR [33, 52, 56, 164], die möglicherweise auf die Beteiligung von nur einer oder beider Nukleotidbindestellen zurückzuführen seien, wobei nach Gunderson et al. nur ein Offenzustand Magnesium erfordert [52]. Auf der Grundlage von Makropatchmessungen kann eine Differenzierung der gemessenen Ströme nicht erfolgen, allerdings würde die Annahme zweier Offenzustände einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erklären (vergl. Abb. 4.7-2).

Aus den beschriebenen Ergebnissen folgt, dass das Modell eines Öffnungsvorgangs mit der Abfolge von ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse erst an der NBD1, dann an der NBD2 zumindest unter bestimmten Bedingungen nicht ausreichend ist. Nimmt man jedoch an, dass es zwei Möglichkeiten für den ersten Schritt in der Öffnung gibt, so lassen sich die meisten der geschilderten Beobachtungen sehr gut erklären.

#### 4.7.4 Nichthydrolytische Aktivierung des CFTR

Ausgangspunkt ist die Annahme, dass eine hydrolytische Öffnung erfolgt, wenn der erste Schritt der Kanalaktivierung über die NBD1 verläuft. Im Gegensatz dazu erlaubt der alternative Weg, in dem sich zunächst die Nukleotidinteraktion an der NBD2 ereignet, eine nichthydrolytische Öffnung.

Unter physiologischen Bedingungen (ausreichend Magnesium und ATP) findet wie in Abb. 4.7-1 gezeigt, zunächst die Bindung und Hydrolyse an der NBD1 statt. Nachfolgend kann dann ein weiteres ATP-Molekül an die zweite NBD binden und der Eintritt in den langlebigen Offenzustand erfolgt. In der Abwesenheit von Magnesium (und bei hohen ATP-Konzentrationen) hingegen verläuft die Aktivierung dann so, dass die ATP-Bindung an die NBD2 die Öffnung ermöglicht, ohne dass die NBD1 involviert sein muss. Wird nun die NBD2 so mutiert, dass deren ATPase-Aktivität und vermutlich auch die ATP-Bindung [67] verringert ist, so müsste die Öffnung ausschließlich über die ATP-Hydrolyse an der NBD1 erfolgen. Ist jedoch das Lysin in der Walker-A Domäne der NBD2 zu einem Alanin mutiert (K1250A), ist diese CFTR-Mutante kaum noch zu einer MgATP-Bindung und überhaupt nicht mehr zu einer Bindung des stark negativ geladenen ATPs in Magnesiumabwesenheit fähig. Daher kann, wenn auch das Magnesium aus der Lösung entfernt ist, gar keine Aktivierung mehr erfolgen, weil sowohl die hydrolytische Öffnung über die NBD1 durch das Entfernen des Magnesiums, als auch die nichthydrolytische Öffnung über die NBD2, durch die Mutation und die daraus resultierende Unfähigkeit, das magnesiumumfreie ATP zu binden, nicht möglich ist.

Wird das Walker-A-Lysin der NBD1 zu einem Alanin mutiert, so findet die nichthydrolytische Öffnung über die NBD2 statt, die auch in Magnesiumabwesenheit ATP binden kann und deswegen auch unter diesen Bedingungen zu messbaren Chloridströmen führt, wie es von B. Himmel beobachtet wurde. Bestätigt wird diese Hypothese durch die Vermutung von Ikuma und Welsh, dass analog zu anderen ABC-Proteinen, die NBD1 des CFTR eine hohe ATP-Affinität besitzt, aber nur einen geringen Anteil zu den Öffnungsvorgängen beiträgt, während dies bei der NBD2 genau umgekehrt ist [67]. Die niedrige ATP-Affinität der Nukleotidbindestelle 2 (3.6.3), im nativen und vor allem im mutierten Zustand, würde die stark verringerte



ATP-Affinität in Mg-Abwesenheit erklären, da sie nur durch die Wechselwirkung mit der NBD2 zustande kommt. Andererseits wäre zu erwarten, dass die Mutation der Walker-B Domäne in der NBD2 die Titration der MgATP-Affinität der NBD1 ermöglicht und somit zwei Halbsättigungskonzentrationen ergeben sollte. Dies konnte in den hier präsentierten Messungen allerdings nicht bestätigt werden.

Weiterhin sprechen auch die Ergebnisse der Messungen mit der D1370N-Mutante für ein solches Modell. Zwar erscheint zunächst widersprüchlich, dass die K1250A-Mutante absolut Mg-sensitiv und darüber hinaus sehr langsam ist (3.6.3), während bei der D1370N-Mutante genau das Gegenteil der Fall ist (Abb. 3.6-19). Berücksichtigt man jedoch, dass die Bindung des MgATP-Komplexes an die Nukleotidbindestelle zum einen über die Walker-A-Domäne unter Einbeziehung der negativen Ladungen des ATP stattfindet und zum anderen über die Koordination des Magnesiums an der Walker B, so wird deutlich, dass die ATP-Bindung nach dem Austausch des Walker A-Lysins gegen ein Alanin vor allem durch die Walker-B-Domäne erfolgen muss. Daher kann bei einer Wegnahme des Magnesiums keinerlei Stabilisierung der ATP-Bindung erfolgen. Ist wiederum die Walker B-Domäne mutiert, so erfolgt die ATP-CFTR-Interaktion ohnehin über die Walker A-Domäne (der NBD2), so dass es keine Rolle spielt, ob Magnesium anwesend ist oder nicht, was sich sowohl in der gleich hohen - und nicht gleich niedrigen- apparenten ATP-Affinität niederschlägt (jeweils ca. 100  $\mu\text{M}$ ), als auch aus der identischen Kinetik mit und ohne Magnesium deutlich wird (Abb. 3.6-19 und Abb. 3.6-20). Letzteres ist darüber hinaus ein Hinweis, dass nicht die hydrolytischen Ereignisse an der NBD1 die Kinetik dominieren (s.o.).

#### **4.7.5 Vorschlag eines erweiterten CFTR-Öffnungszyklus**

Der durch die AMP-PNP-Zugabe nach ATP-Perfusion verursachte "Offenarrest" in Mg-Gegenwart (Abb. 3.6-9) wird darauf zurückgeführt, dass zunächst MgATP an die NBD1 bindet und hydrolysiert wird. Anschließend wird das nun zusätzlich applizierte AMP-PNP an die NBD2 gebunden und der Kanal geht in einen Zustand über (locked open, [66]), aus dem der Schließvorgang über die Hydrolyse und die Abdissoziation der Nukleotide nicht erfolgen kann. Es ist nur das langsame Schließen über die Abdissoziation von AMP-PNP von der NBD2 möglich. Die beobachtete schnelle

(und bei Entzug schnell zurückgehende) Stromerhöhung bei Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  AMP-PNP in Mg-Abwesenheit weist darauf hin (Abb. 3.6-11), dass nur die Prozesse an der NBD2 die Geschwindigkeit des Öffnens und Schließens des Kanals regulieren. Vermutlich ist die AMP-PNP-vermittelte Stromerhöhung auf eine Erhöhung der Nukleotidkonzentration in der Badlösung zurückzuführen, da unter Bedingungen, bei denen ohnehin keine Hydrolyse erfolgen kann, der Unterschied zwischen ATP und AMP-PNP keine Rolle spielt. In Abwesenheit von Magnesium ist die AMP-PNP-Bindung an die NBD2 offenbar geschwächt, so dass die Abdissoziation beschleunigt ist (Tab. 3.6-3).

Ein mit dem MgAMP-PNP-induzierten Offenarrest vergleichbarer Vorgang ist bei der K1250A-Mutante zu beobachten. Der Schließvorgang dieser Mutante war unbeeinflusst von der Zusammensetzung der deaktivierenden Badlösung, solange sie kein MgATP enthielt. Es konnten keine Unterschiede zwischen ADP, welches in Wildtyp-Messungen das Schließen beschleunigte [151], einer Badlösung mit Magnesium aber ohne ATP, einer Badlösung, die weder Magnesium, noch ATP enthielt, und sogar einer ATP-haltigen Badlösung ohne Magnesium festgestellt werden. Daher ist zu vermuten, dass das ATP an die NBD2 gebunden bleibt und nur sehr langsam abdissoziiert, was zu der langsamen Schließkinetik führt. Die Tatsache, dass dieser Schließvorgang unabhängig von der Lösungszusammensetzung ist, deutet darauf hin, dass das Magnesium an der NBD2 eingeschlossen ("occluded") ist und nicht vom Kanal abdissoziiert, bevor nicht das ATP entfernt ist. Vorstellbar als Erklärung für die veränderte Kinetik der K1250A Mutante im Vergleich zum Wildtyp ist, dass die mit einer Kanalöffnung/Schließung verbundenen Konformationsänderungen durch die NBD2-Walker-B-Mutation deutlich verlangsamt sind. Aus den hier vorgestellten Messungen können keine direkten Aussagen hinsichtlich einer Interaktion der beiden Nukleotidbindestellen gemacht werden. Berücksichtigt man aber, dass

- die apparente MgATP-Affinität (in Einzelkanalmessungen die Offenwahrscheinlichkeit [134]) von der Phosphorylierung abhängig ist ([89], Abb. 3.3-10, Abb. 3.4-13),
  - der Mg-AMP-PNP-locked-open Effekt nur bei relativ hoher Phosphorylierung auftritt [66, 151] und in den Makropatchmessungen mit zunehmender zeitlicher Distanz zur initialen Phosphorylierung abnahm [150],

- die Markierung des CFTR mit  $8N_3$ -azido[ $\alpha^{32}P$ ]-ATP nicht von der Phosphorylierung, aber von der  $Mg^{2+}$ -Anwesenheit abhing [139],
- ein NBD1-R-Domänenfragment (Aminosäuren 403-830) in der Nukleotidbindung unabhängig vom Phosphorylierungsgrad war [102],

ergibt sich folgendes Bild für die phosphorylierungsregulierte Kanalöffnung. Auch bei niedriger Phosphorylierung kann die NBD1 MgATP binden, aber nicht hydrolysieren, was nicht zu einer Kanalöffnung führt, während an der NBD2 keine Nukleotidwechselwirkung auftritt. Die Vermutung, dass die ATP-Bindung an der NBD1 stattfindet, wird dadurch unterstützt, dass hierfür Magnesium nötig ist.

Wird die Phosphorylierung erhöht, findet vermutlich folgendes statt: Die Hydrolyse rate an der NBD1 wird stimuliert (vergleiche [80]), weswegen die NBD2 nun ebenfalls mit erhöhter Affinität ATP (bzw. AMP-PNP) binden kann. Demnach bewirkt die Phosphorylierung und die hiermit (und möglicherweise mit der ATP-Hydrolyse an NBD1) verbundene Konformationsänderung eine bessere Interaktion der NBDs, die zu der Öffnung des Kanals führt.

Bei den hier geäußerten Modellvorstellungen wurden bisher vor allem die Öffnungs- und weniger die Schließvorgänge berücksichtigt. Nimmt man, genauso wie für den Öffnungsvorgang, die Möglichkeit von hydrolytischer und nicht-hydrolytischer Reaktion an, so verläuft der Schließvorgang folgendermaßen: Unter den normalen Bedingungen wird das ATP an der NBD2 langsam hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte werden abgegeben, was zu einem Schließen des Kanals führt. Ist dagegen aufgrund einer NBD2-Mutation oder der Besetzung durch nicht hydrolysierbare ATP-Analoga dieser Weg nicht möglich, so schließt der Kanal langsam aufgrund der Abdissoziation der Nukleotide. In Magnesiumabwesenheit hingegen ist eine einfache (aber schnellere) Loslösung des ATP von der NBD2 (dies lässt sich nur vermuten) für das Schließen verantwortlich. Verändert sich die Wechselwirkung mit dem ATP aufgrund einer Walker-B-Mutation an der NBD2, schließt der Kanal unabhängig von der Magnesiumanwesenheit mit einer schnelleren Rate als die Walker-A Mutante, aber mit einer langsameren als der Wildtyp, wobei die einfache Bindung und Abdissoziation des ATP geschwindigkeitsbestimmend ist. Daraus ergibt sich zusammengefasst folgendes Schema für die Regulation des Öffnens und Schließens des CFTR (Abb. 4.7-2).



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des humanen CFTR an isolierten Makropatches von *Xenopus*-Oozyten untersucht. Die *inside-out*-Konfiguration ermöglicht den einfachen Zugang zu den zytosolischen Domänen, welche die CFTR-Aktivität steuern. Daher ist es mit dieser bewährten Methode möglich, die Interaktion des CFTR mit Nukleotiden, insbesondere unter dem Einfluss der Phosphorylierung, weitergehend zu charakterisieren.

Die Strom-Spannungskennlinie des ATP-induzierten CFTR-Chloridstroms weicht bei zunehmendem Haltepotenzial von dem Verlauf ab, der aufgrund der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung zu erwarten ist. Dies weist auf einen hemmenden Einfluss des in der Badlösung vorhandenen Aspartats hin. Die transienten Ströme bei schnellen Chloridkonzentrationswechseln bestätigen diese Hemmung und legen einen inhibitorischen Einfluss auf das CFTR-Gating nahe.

Die Koexpression des CFTR mit dem Fusionsprotein Bakteriorhodopsin-PKA katalytische Untereinheit (BR-PKA) ermöglicht die Kanalaktivierung durch einfache ATP-Zugabe. Es wurde gezeigt, dass diese Koexpression die apparente Affinität für MgATP erhöhte. Eine naheliegende Vermutung ist, dass diese Affinitätszunahme durch einen erhöhten Phosphorylierungsgrad hervorgerufen wird, was durch die Messungen mit dem Proteinkinaseinhibitor PKI unterstützt wird. Durch die Aktivierung der koexprimierten membrangebundenen cGMP-abhängigen Proteinkinase II (cGKII) kann der CFTR sowohl in Ganzzellmessungen, als auch in Makropatches phosphoryliert werden. Der Vergleich der ATP-Konzentrationsabhängigkeiten des CFTR unter permanenter ( $K_M = 29 \mu\text{M}$ ) und vorübergehender cGKII-Stimulierung ( $K_M = 64 \mu\text{M}$ ) belegt eine Abnahme des apparenten  $K_M$  bei kontinuierlicher Kinaseaktivität und somit vermutlich erhöhter Phosphorylierung. Die Öffnungs- und Schließkinetik des Kanals wird durch diese permanente Kinaseaktivität nicht beeinflusst.

Die zeitabhängige Abnahme des CFTR-Chloridstroms, der Rundown, kann nicht durch eine permanente Proteinkinaseaktivität von BR-PKA oder cGKII aufgehoben werden. Die Signalabnahme tritt auch unter Bedingungen auf, bei denen mögliche

vorhandene Phosphatasen (v.a. PP2C) inaktiv sind. Daraus folgt, dass der Rundown des CFTR nicht nur durch Dephosphorylierung verursacht wird.

Für Einzelkanalmessungen wird eine Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit des epithelialen Natriumkanals ENaC durch den aktivierten CFTR beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Makropatchmessungen bestätigen diese Inhibition nicht. Die CFTR- und Natriumkanal-vermittelten Ströme sind, unabhängig von dem Verhältnis der Einzelströme und dem anliegenden Haltepotenzial, generell additiv.

Der präphosphorylierte CFTR kann auch durch ATP-Zugabe geöffnet werden, wenn die Badlösung kein Magnesium enthält. Da unter diesen Bedingungen keine ATP-Hydrolyse erfolgen kann, muss eine Kanalaktivierung durch einfache ATP-Bindung möglich sein. Es tritt eine Verringerung der apparenten ATP-Affinität, nicht aber des maximalen Chloridstroms auf, wenn das Magnesium aus der Badlösung entfernt wird ( $K_M[\text{MgATP}] \approx 70 \mu\text{M}$ ;  $K_M[\text{ATP}] > 1 \text{ mM}$ ). Die Möglichkeit der nichthydrolytischen Aktivierung wird dadurch bestätigt, dass auch mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analog AMP-PNP eine Kanalöffnung erfolgt.

Magnesium ist nicht nur an der ATP-Hydrolyse beteiligt, sondern beeinflusst darüber hinaus die Kanalaktivität. Aus den Messungen bei unterschiedlichen freien  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen in der Badlösung geht ein inhibitorischer Einfluss dieses Kations auf den stationären Maximalstrom und ein komplexer Einfluss auf die Öffnungskinetik hervor. Die Walker-A und die Walker-B-Domänen von Nukleotidbindestellen sind an der Bindung und Hydrolyse von MgATP in ATPasen beteiligt. Mit CFTR-Mutanten, in denen die Walker-A (K1250A), bzw. die Walker-B (D1370N)-Domäne der zweiten Nukleotidbindestelle (NBD2) mutiert sind, kann die Beteiligung der NBD2 an der Kanalöffnung belegt werden. Die langsame K1250A-Mutante öffnet in Abwesenheit von Magnesium nicht. Dagegen ist sowohl die Öffnungs- und Schließkinetik, als auch die ATP-Affinität der D1370N-Mutante mit der des Wildtyps vergleichbar, weist aber im Gegensatz zu diesem keinerlei Magnesiumabhängigkeit auf.

Auf Grundlage dieser Daten wird ein Modell vorgeschlagen, in dem alternativ zu dem hydrolytischen Öffnungszyklus, in dem zunächst eine ATP-Hydrolyse an der NBD1 erfolgt, auch die nichthydrolytische Öffnung über die NBD2 möglich ist.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aleksandrov, A.A. and J.R. Riordan, *Regulation of CFTR ion channel gating by MgATP*. FEBS Lett, 1998. **431**(1): p. 97-101.
2. Aleksandrov, A.A., et al., *The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating*. J Physiol, 2000. **528**(Pt 2): p. 259-265.
3. Aleksandrov, L., et al., *Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12918-23.
4. Andersen, D.H.a.R.G.H., *Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of the etiology*. Am. J. Dis. Child., 1946. **72**: p. 62-80.
5. Anderson, M.P., et al., *Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel*. Cell, 1991. **67**(4): p. 775-84.
6. Anderson, M.P., et al., *Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR*. Science, 1991. **251**(4994): p. 679-82.
7. Anderson, M.P. and M.J. Welsh, *Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains [published erratum appears in Science 1992 Dec 11;258(5089):1719]*. Science, 1992. **257**(5077): p. 1701-4.
8. Armstrong, D. and R. Eckert, *Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(8): p. 2518-22.
9. Awayda, M.S., *Specific and nonspecific effects of protein kinase C on the epithelial Na (+) channel [In Process Citation]*. J Gen Physiol, 2000. **115**(5): p. 559-70.
10. Bachmann, A., et al., *Potent stimulation and inhibition of the CFTR Cl(-) current by phloxine B*. British Journal of Pharmacology, 2000. **131**(3): p. 433-40.
11. Baukowitz, T., et al., *Coupling of CFTR Cl- channel gating to an ATP hydrolysis cycle*. Neuron, 1994. **12**(3): p. 473-82.
12. Bear, C.E., et al., *Cl- channel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(29): p. 19142-5.
13. Bear, C.E., et al., *Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)*. Cell, 1992. **68**(4): p. 809-18.
14. Beck, E.J. and M. Covarrubias, *Kv4 channels exhibit modulation of closed-state inactivation in inside-out patches*. Biophys J, 2001. **81**(2): p. 867-83.
15. Becq, F., et al., *Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells*. FEBS Letters, 1993. **327**(3): p. 337-42.
16. Becq, F., et al., *Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 9160-4.
17. Becq, F., *Ionic channel rundown in excised membrane patches*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1286**(1): p. 53-63.
18. Benos, D.J. and B.A. Stanton, *Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels*. Journal of Physiology, 1999. **520 Pt 3**: p. 631-44.
19. Berger, H.A., S.M. Travis, and M.J. Welsh, *Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel by specific protein kinases and protein phosphatases*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 2037-47.
20. Boucher, R.C., *Human airway ion transport. Part two*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(2): p. 581-93.
21. Boucher, R.C., *Human airway ion transport. Part one*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(1): p. 271-81.
22. Boucher, R.C., *Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid*. J Physiol (Lond), 1999. **516**(Pt 3): p. 631-8.

23. Briel, M., R. Greger, and K. Kunzelmann, *Cl<sup>-</sup> transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaCs) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC*. J Physiol (Lond), 1998. **508**(Pt 3): p. 825-36.
24. Buchwald, M., R. Sood, and W. Auerbach, *Regulation of expression of CFTR in human intestinal epithelial cells*. Advances in Experimental Medicine & Biology, 1991. **290**: p. 241-50; discussion 250-2.
25. Budiman, T., *Elektrophysiologische Charakterisierung des Transporters für organische Kationen rOCT2*. Dissertation, 2001.
26. Carson, M.R. and M.J. Welsh, *5'-Adenylylimidodiphosphate does not activate CFTR chloride channels in cell-free patches of membrane*. American Journal of Physiology, 1993. **265**(1 Pt 1): p. L27-32.
27. Carson, M.R., et al., *Phosphate stimulates CFTR Cl<sup>-</sup> channels*. Biophysical Journal, 1994. **67**(5): p. 1867-75.
28. Carson, M.R., S.M. Travis, and M.J. Welsh, *The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(4): p. 1711-7.
29. Chabot, H., et al., *Downregulation of epithelial sodium channel (ENaC) by CFTR co-expressed in Xenopus oocytes is independent of Cl<sup>-</sup> conductance*. J Membr Biol, 1999. **169**(3): p. 175-88.
30. Chalfant, M.L., et al., *Regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels from M-1 cortical collecting duct cells*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 2): p. F861-70.
31. Chang, X.B., et al., *Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11304-11.
32. Cheng, S.H., et al., *Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel*. Cell, 1991. **66**(5): p. 1027-36.
33. Csanady, L. and D.C. Gadsby, *CFTR channel gating. Incremental progress in irreversible steps [In Process Citation]*. J Gen Physiol, 1999. **114**(1): p. 49-54.
34. Cunningham, S.A., et al., *cAMP-stimulated ion currents in Xenopus oocytes expressing CFTR cRNA*. Am J Physiol, 1992. **262**(3 Pt 1): p. C783-8.
35. Davis, P.B., *Molecular and cell biology of cystic fibrosis*. Journal of Applied Physiology, 1991. **70**(5): p. 2331-3.
36. Drumm, M.L., et al., *Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in Xenopus oocytes*. Science, 1991. **254**(5039): p. 1797-9.
37. Dulhanty, A.M. and J.R. Riordan, *Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Biochemistry, 1994. **33**(13): p. 4072-9.
38. Dulhanty, A.M., X.B. Chang, and J.R. Riordan, *Mutation of potential phosphorylation sites in the recombinant R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator has significant effects on domain conformation*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 207-14.
39. Egan, T.M., et al., *Properties and rundown of sodium-activated potassium channels in rat olfactory bulb neurons*. J Neurosci, 1992. **12**(5): p. 1964-76.
40. Erlinger, S., *Review article: new insights into the mechanisms of hepatic transport and bile secretion*. Journal of Gastroenterology & Hepatology, 1996. **11**(6): p. 575-9.
41. Fischer, H., B. Illek, and T.E. Machen, *Regulation of CFTR by protein phosphatase 2B and protein kinase C*. Pflugers Archiv - European Journal of Physiology, 1998. **436**(2): p. 175-81.
42. Flockhart, D.A., et al., *ATP analog specificity of cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase, and phosphorylase kinase*. Eur J Biochem, 1984. **140**(2): p. 289-95.
43. French, P.J., et al., *Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 1995. **270**(44): p. 26626-31.



44. Gabriel, S.E., et al., *Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. [see comments]*. Science, 1994. **266**(5182): p. 107-9.
45. Gadsby, D.C., et al., *Regulation of CFTR channel gating*. Jpn J Physiol, 1994. **44**(Suppl 2): p. S183-92.
46. Gadsby, D.C. and A.C. Nairn, *Regulation of CFTR Cl<sup>-</sup> ion channels by phosphorylation and dephosphorylation*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1999. **33**: p. 79-106.
47. Gadsby, D.C. and A.C. Nairn, *Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S77-S107.
48. Greger, R., et al., *Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. J Mol Med, 1996. **74**(9): p. 527-34.
49. Greger, R., *Role of CFTR in the colon [In Process Citation]*. Annu Rev Physiol, 2000. **62**: p. 467-91.
50. Gregory, R.J., et al., *Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. [see comments]*. Nature, 1990. **347**(6291): p. 382-6.
51. Gunderson, K.L. and R.R. Kopito, *Effects of pyrophosphate and nucleotide analogs suggest a role for ATP hydrolysis in cystic fibrosis transmembrane regulator channel gating*. J Biol Chem, 1994. **269**(30): p. 19349-53.
52. Gunderson, K.L. and R.R. Kopito, *Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role ATP binding and hydrolysis*. Cell, 1995. **82**(2): p. 231-9.
53. Gurdon, J.B., et al., *Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells*. Nature, 1971. **233**(5316): p. 177-82.
54. Harvey, R.D. and J.R. Hume, *Autonomic regulation of a chloride current in heart*. Science, 1989. **244**(4907): p. 983-5.
55. Haws, C., et al., *CFTR in Calu-3 human airway cells: channel properties and role in cAMP-activated Cl<sup>-</sup> conductance*. American Journal of Physiology, 1994. **266**(5 Pt 1): p. L502-12.
56. Hennager, D.J., et al., *A conditional probability analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gating indicates that ATP has multiple effects during the gating cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3594-3599.
57. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
58. Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes, 2nd Edition*. 1992.
59. Holland, I.B. and M.A. Blight, *ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans*. J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 381-99.
60. Hopf, A., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits epithelial Na<sup>+</sup> channels carrying Liddle's syndrome mutations*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 13894-9.
61. Hoshi, T., W.N. Zagotta, and R.W. Aldrich, *Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation*. Science, 1990. **250**(4980): p. 533-8.
62. Huang, P., et al., *PKA holoenzyme is functionally coupled to CFTR by AKAPs*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(2): p. C417-C422.
63. Hug, M. and D. Sheppard, *CFTR-Newsletter*. European Working Group on CFTR Expression, 2001.
64. Hung, L.W., et al., *Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter [see comments]*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 703-7.
65. Hwang, T.C., M. Horie, and D.C. Gadsby, *Functionally distinct phospho-forms underlie incremental activation of protein kinase-regulated Cl<sup>-</sup> conductance in mammalian heart*. J Gen Physiol, 1993. **101**(5): p. 629-50.
66. Hwang, T.C., et al., *Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels by phosphorylation and ATP hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4698-702.

67. Ikuma, M. and M.J. Welsh, *Regulation of CFTR Cl<sup>-</sup> channel gating by ATP binding and hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8675-8680.
68. Ishihara, H. and M.J. Welsh, *Block by MOPS reveals a conformation change in the CFTR pore produced by ATP hydrolysis*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 1): p. C1278-89.
69. Jia, Y., C.J. Mathews, and J.W. Hanrahan, *Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 4978-84.
70. Jiang, Q., et al., *Epithelial sodium channels regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in Xenopus oocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13266-74.
71. Jones, P.M. and A.M. George, *Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **179**(2): p. 187-202.
72. Karthikeyan, S., T. Leung, and J.A.A. Ladas, *Structural basis of the NHERF PDZ1 interaction with the carboxyl-terminal region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. J. Biol. Chem., 2001: p. C100154200.
73. Kartner, N., et al., *Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance*. Cell, 1991. **64**(4): p. 681-91.
74. Klein, I., B. Sarkadi, and A. Varadi, *An inventory of the human ABC proteins*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 237-62.
75. Knowles, M.R., J. L. CARSON, A. M. COLLIER, J. T. GATZY and Boucher, *Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo*. Am. Rev. Respir. Dis., 1981. **124**: p. 484-490.
76. König, J., et al., *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibits ENaC through an increase in the intracellular Cl<sup>-</sup> concentration*. EMBO Rep, 2001. **2**(11): p. 1047-1051.
77. Kunzelmann, K., et al., *Inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. FEBS Lett, 1997. **400**(3): p. 341-4.
78. Kunzelmann, K., et al., *Control of epithelial Na<sup>+</sup> conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator [In Process Citation]*. Pflugers Arch, 2000. **440**(2): p. 193-201.
79. Lansdell, K.A., et al., *Regulation of murine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels expressed in Chinese hamster ovary cells*. J Physiol (Lond), 1998. **512**(Pt 3): p. 751-64.
80. Li, C., et al., *ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. J Biol Chem, 1996. **271**(45): p. 28463-8.
81. Linsdell, P. and J.W. Hanrahan, *Flickery block of single CFTR chloride channels by intracellular anions and osmolytes*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C628-34.
82. Linsdell, P., et al., *Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions*. J Gen Physiol, 1997. **110**(4): p. 355-64.
83. Linsdell, P., *Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel currents by arachidonic acid*. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology, 2000. **78**(6): p. 490-9.
84. Lohmann, S.M., et al., *Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(8): p. 307-12.
85. Luo, J., et al., *Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 1): p. C1397-410.
86. Luo, J., et al., *Role of protein phosphatases in the activation of CFTR (ABCC7) by genistein and bromotetramisole*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2000. **279**(1): p. C108-19.
87. Mall, M., et al., *Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na<sup>+</sup> conductance when coexpressed in Xenopus oocytes*. FEBS Lett, 1996. **381**(1-2): p. 47-52.
88. Marks, F.E., *Protein Phosphorylation*. VCH Weinheim, 1996.

89. Mathews, C.J., et al., *Dibasic protein kinase A sites regulate bursting rate and nucleotide sensitivity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel*. J Physiol (Lond), 1998. **508**(Pt 2): p. 365-77.
90. Mathews, C.J., J.A. Tabcharani, and J.W. Hanrahan, *The CFTR chloride channel: nucleotide interactions and temperature-dependent gating*. J Membr Biol, 1998. **163**(1): p. 55-66.
91. Methfessel, C., et al., *Patch clamp measurements on Xenopus laevis oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels*. Pflugers Arch, 1986. **407**(6): p. 577-88.
92. Middleton, L.M. and R.D. Harvey, *PKC regulation of cardiac CFTR Cl<sup>-</sup> channel function in guinea pig ventricular myocytes*. American Journal of Physiology, 1998. **275**(1 Pt 1): p. C293-302.
93. Miledi, R., *A calcium-dependent transient outward current in Xenopus laevis oocytes*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1982. **215**(1201): p. 491-7.
94. Miledi, R., I. Parker, and K. Sumikawa, *Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1982. **216**(1205): p. 509-15.
95. Miller, A.J. and J.J. Zhou, *Xenopus oocytes as an expression system for plant transporters*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1465**(1-2): p. 343-58.
96. Nagel, G., et al., *The protein kinase A-regulated cardiac Cl<sup>-</sup> channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Nature, 1992. **360**(6399): p. 81-4.
97. Nagel, G., et al., *Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping*. FEBS Lett, 1995. **377**(2): p. 263-6.
98. Nagel, G., *Differential function of the two nucleotide binding domains on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 263-74.
99. Nagel, G., et al., *Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel*. EMBO Reports, 2001. **2**(3): p. 249-254.
100. Naren, A.P., et al., *Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10972-7.
101. Neher, E., *Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments*. Methods Enzymol, 1992. **207**: p. 123-31.
102. Neville, D.C., et al., *Expression and characterization of the NBD1-R domain region of CFTR: evidence for subunit-subunit interactions*. Biochemistry, 1998. **37**(8): p. 2401-9.
103. Quinton, P.M., *Abnormalities in electrolyte secretion in cystic fibrosis*. Fluid and Electrolyte Abnormalities in Cystic Fibrosis, 1982: p. 53-76.
104. Quinton, P.M., *Cystic fibrosis. Righting the wrong protein*. Nature, 1990. **347**(6290): p. 226.
105. Quinton, P.M., *Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport*. FASEB J, 1990. **4**(10): p. 2709-17.
106. Quinton, P.M., *Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S3-S22.
107. Raghuram, V., D.O.D. Mak, and J.K. Foskett, *Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 1300-1305.
108. Ramjeesingh, M., et al., *Walker mutations reveal loose relationship between catalytic and channel-gating activities of purified CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)*. Biochemistry, 1999. **38**(5): p. 1463-8.
109. Reddy, M.M. and P.M. Quinton, *Deactivation of CFTR-Cl<sup>-</sup> conductance by endogenous phosphatases in the native sweat duct*. American Journal of Physiology, 1996. **270**(2 Pt 1): p. C474-80.

110. Reddy, M.M. and P.M. Quinton, *Hydrolytic and nonhydrolytic interactions in the ATP regulation of CFTR Cl<sup>-</sup> conductance*. American Journal of Physiology, 1996. **271**(1 Pt 1): p. C35-42.
111. Reddy, M.M., M.J. Light, and P.M. Quinton, *Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) requires CFTR Cl<sup>-</sup> channel function*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 301-4.
112. Rettinger, J., *Novel properties of the depolarization-induced endogenous sodium conductance in the Xenopus laevis oocyte*. Pflugers Arch, 1999. **437**(6): p. 917-24.
113. Ribalet, B., S.A. John, and J.N. Weiss, *Regulation of cloned ATP-sensitive K channels by phosphorylation, MgADP, and phosphatidylinositol bisphosphate (PIP(2)): a study of channel rundown and reactivation*. J Gen Physiol, 2000. **116**(3): p. 391-410.
114. Rich, D.P., et al., *Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels*. Science, 1991. **253**(5016): p. 205-7.
115. Rich, D.P., et al., *Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by negative charge in the R domain*. J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20259-67.
116. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. [erratum appears in Science 1989 Sep 29;245(4925):1437]*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
117. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [published erratum appears in Science 1989 Sep 29;245(4925):1437]*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
118. Sato, K. and F. Sato, *Defective beta adrenergic response of cystic fibrosis sweat glands in vivo and in vitro*. J Clin Invest, 1984. **73**(6): p. 1763-71.
119. Schneider, E. and S. Hunke, *ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains*. FEMS Microbiol Rev, 1998. **22**(1): p. 1-20.
120. Schreiber, R., et al., *The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5310-5.
121. Schultz, B.D., et al., *Regulation of CFTR Cl<sup>-</sup> channel gating by ADP and ATP analogues*. J Gen Physiol, 1995. **105**(3): p. 329-61.
122. Schultz, B.D., R.J. Bridges, and R.A. Frizzell, *Lack of conventional ATPase properties in CFTR chloride channel gating*. J Membr Biol, 1996. **151**(1): p. 63-75.
123. Schwiebert, E.M., et al., *CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S145-66.
124. Seibert, F.S., et al., *Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 275-83.
125. Sekine, T., et al., *Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18526-9.
126. Senior, A.E. and D.C. Gadsby, *ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR*. Seminars in Cancer Biology, 1997. **8**(3): p. 143-50.
127. Sheppard, D.N. and M.J. Welsh, *Structure and function of the CFTR chloride channel*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S23-45.
128. Sim, A.T. and J.D. Scott, *Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains*. Cell Calcium, 1999. **26**(5): p. 209-17.
129. Smith, J.J., et al., *Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. [erratum appears in Cell 1996 Oct 18;87(2):following 355]*. Cell, 1996. **85**(2): p. 229-36.
130. Stuehmer, W. and A. Parekh, *Electrophysiological Recordings from Xenopus oocytes. Single Channel Recordings* (Eds. B Sakmann and E Neher), 2nd ed, plenum press, 1995.
131. Stutts, M.J., et al., *CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels [see comments]*. Science, 1995. **269**(5225): p. 847-50.

132. Stutts, M.J., et al., *CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels*. Science, 1995. **269**(5225): p. 847-50.
133. Sun, F., et al., *Protein kinase A associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via an interaction with ezrin [In Process Citation]*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14360-6.
134. Tabcharani, J.A., et al., *Phosphorylation-regulated Cl<sup>-</sup> channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 628-31.
135. Tabcharani, J.A., et al., *Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. [see comments]*. Nature, 1993. **366**(6450): p. 79-82.
136. Tang, X.D. and T. Hoshi, *Rundown of the hyperpolarization-activated KAT1 channel involves slowing of the opening transitions regulated by phosphorylation*. Biophys J, 1999. **76**(6): p. 3089-98.
137. Tilly, B.C., et al., *Cyclic AMP-dependent protein kinase activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in planar lipid bilayers*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(14): p. 9470-3.
138. Trapnell, B.C., et al., *Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6565-9.
139. Travis, S.M., et al., *Interaction of nucleotides with membrane-associated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15336-9.
140. Travis, S.M., H.A. Berger, and M.J. Welsh, *Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 11055-60.
141. Vaandrager, A.B., et al., *N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(12): p. 7025-9.
142. Vaandrager, A.B., et al., *Endogenous type II cGMP-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoforms*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 11816-23.
143. Vaandrager, A.B., et al., *cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type I beta*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4195-200.
144. Vaandrager, A.B., et al., *Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1466-71.
145. Venglarik, C.J., et al., *ATP alters current fluctuations of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: evidence for a three-state activation mechanism*. Journal of General Physiology, 1994. **104**(1): p. 123-46.
146. Wagner, C.A., et al., *The use of Xenopus laevis oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins*. Cell Physiol Biochem, 2000. **10**(1-2): p. 1-12.
147. Walker, J.E., et al., *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. Embo J, 1982. **1**(8): p. 945-51.
148. Weber, W.M., *Endogenous ion channels in oocytes of Xenopus laevis: Recent developments [Review]*. J Membr Biol, 1999. **170**(1): p. 1-12.
149. Weinreich, F., et al., *Direct action of genistein on CFTR*. Pflugers Arch, 1997. **434**(4): p. 484-91.
150. Weinreich, F., *Untersuchungen zur Aktivierung und zum Öffnungszyklus von humanen CFTR-Chloridkanälen in Oozyten von Xenopus laevis*. Dissertation, 1998.
151. Weinreich, F., J.R. Riordan, and G. Nagel, *Dual effects of ADP and adenylylimidodiphosphate on CFTR channel kinetics show binding to two different nucleotide binding sites [In Process Citation]*. J Gen Physiol, 1999. **114**(1): p. 55-70.
152. Widdicombe, J.H. and J.G. Widdicombe, *Regulation of human airway surface liquid*. Respir Physiol, 1995. **99**(1): p. 3-12.

153. Wilkinson, D.J., et al., *CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain*. American Journal of Physiology, 1997. **273**(1 Pt 1): p. L127-33.
154. Wine, J., *The genesis of cystic fibrosis lung disease*. Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**: p. 309-313.
155. Winter, M.C. and M.J. Welsh, *Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 294-6.
156. Woodgett, R.E., *Protein Kinases*. Oxford University Press, 1996.
157. Wu, J.V., et al., *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gating Requires Cytosolic Electrolytes*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(9): p. 6473-6478.
158. Xie, J., et al., *Human epithelial cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without exon 5 maintains partial chloride channel function in intracellular membranes*. Biophysical Journal, 1996. **71**(6): p. 3148-56.
159. Yamazaki, J., et al., *Regulation of recombinant cardiac cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by protein kinase C*. Biophys J, 1999. **76**(4): p. 1972-87.
160. Yang, I.C., et al., *Modulation of CFTR chloride channels by calyculin A and genistein*. American Journal of Physiology, 1997. **272**(1 Pt 1): p. C142-55.
161. Yoshimura, K., et al., *Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin*. Nucleic Acids Research, 1991. **19**(19): p. 5417-23.
162. Zabner, J., et al., *Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 397-403.
163. Zagotta, W.N., T. Hoshi, and R.W. Aldrich, *Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB*. Science, 1990. **250**(4980): p. 568-71.
164. Zeltwanger, S., et al., *Gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by adenosine triphosphate hydrolysis. Quantitative analysis of a cyclic gating scheme*. J Gen Physiol, 1999. **113**(4): p. 541-54.
165. Zhou, Z., S. Hu, and T.C. Hwang, *Voltage-dependent flickery block of an open cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel pore*. Journal of Physiology-London, 2001. **532**(2): p. 435-448.
166. Zhu, T., et al., *Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and protein phosphatase 2C*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(41): p. 29102-29107.

## **7 Häufig verwendete Abkürzungen**

ABC	ATP-Binding-Cassette
AMP-PNP	Adenylyl, $\beta$ , $\gamma$ -imidodiphosphat
ATP	Adenosintriophosphat
ATP $\gamma$ S	Adenosin 5'- $\gamma$ -thiotriophosphat
BR-PKA	Fusionsprotein Bakteriorhodopsin-PKA (katalytische Untereinheit)
BS2	Badstandardlösung mit 2 mM Magnesium
BSC	Badstandardlösung mit 5 mM CDTA
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CDTA	Diaminocyclohexantetraessigsäure
CF	cystic fibrosis (zystische Fibrose)
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-Tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
GHK	Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
NBD	Nukleotidbindedomäne
NMG	N-Methyl- D-glucamin
ORi	modifizierte Oozyten-Ringerlösung
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKI	Proteinkinase-Inhibitorpeptid
PP	Proteinphosphatase
rOAT	organischer Anionentransporter der Ratte
TEVC	two-electrode voltage clamp

## 8 Danke...

- ... an alle Kollegen am MPI, ich glaube nicht, dass es viele Institute gibt, wo Hilfsbereitschaft jederzeit so selbstverständlich ist!
- ... Dr. Georg Nagel für die intensive Betreuung dieser Arbeit, die vielen konstruktiven Vorschläge und das bisweilen notwendige kritische Nachfragen, vor allem aber dafür, ständig ein offenes Ohr für mich und meine Überlegungen zu haben.
- ... Prof. Bamberg für die Förderung meiner Arbeit.
- ... Thomas Budiman für seine Hilfe beim Einstieg in die Patch-Clamp-Technik und die viele Diskussionen.
- ... Doris Ollig für die Präparation der RNA und bei der Hilfe in molekularbiologischen Fragen.
- ... Dagmar Stiegert für viele kleine und große Hilfen im Laboralltag.
- ... Thomas Friedrich für die Bereitschaft, meinen Ideen zuzuhören und sie zu diskutieren.
- ... Sven für zahllose, nicht immer wissenschaftliche Gespräche und die Hilfe bei Luciferase-Assays.
- ... meiner Büro-Mitbewohnerin Tina, die mir durch ihre ansteckende gute Laune bewies, dass es doch viel schöner ist, nicht allein im Büro zu sitzen. Außerdem danke für die Hilfe bei den molekularbiologischen Arbeiten.
  
- ... Vor allem danke ich meiner Frau Dagmar für die tolle Unterstützung und dafür, dass sie, fast immer ohne sich zu beschweren, alle aus den Widrigkeiten des Laboralltag entstandenen Stimmungsschwankungen ertrug. Außerdem dafür, den Kampf gegen meine Endlossätze in dieser Arbeit aufgenommen zu haben. Und für alles andere erst recht!



## 9 Lebenslauf

22.6.1972	Geboren in Eckernförde
1979-1983	Besuch der Grundschule in Eckernförde
1983-1992	Besuch des Jungmann-Gymnasiums in Eckernförde
5.6.1992	Allgemeine Hochschulreife
12/1992-02/1994	Zivildienst
04/1994-03-1996	Studium der Chemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main bis zum Vordiplom (Anorganische Chemie; Organische Chemie; Physikalische Chemie; Physik)
04/1996-03/1999	Studium der Biochemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main
07/1996	Heirat mit Dagmar Szellas, geb. Semma
05/1998-06/1998	Diplomprüfungen (Biochemie: Prof. H. Fasold; Biophysikalische Chemie: Prof. E. Bamberg; Pharmakologie: Prof. E. Lambrecht)
07/1998-03/1999	Diplomarbeit über "Elektrophysiologische Charakterisierung des Natrium-Iodid-Symporters" am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main bei Prof. Dr. Ernst Bamberg unter der Anleitung von PD Dr. Georg Nagel
ab 03/1999	Dissertation "Regulation des CFTR" am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main bei Prof. Dr. Ernst Bamberg unter der Anleitung von PD Dr. Georg Nagel