

Elektrophysiologische Charakterisierung
des lysosomalen Cl^-/H^+ -Antiporters ClC-7
mit Hilfe der SSM-Technik

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Patrick Schulz
aus Hainburg

Frankfurt 2010
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Fendler

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 02.06.2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Biologische Membranen	1
1.1.1	Ionentransport durch biologische Membranen.....	3
1.2	Chloridkanäle & -transporter.....	4
1.2.1	Die Familie der CLC Chloridkanäle & -transporter.....	4
1.2.2	Die Struktur und Funktion der CLC-Proteine.....	6
1.2.3	Azidifizierung endosomaler Vesikel.....	8
1.2.4	Physiologische Funktion vesikulärer CLC-Transporter.....	9
1.3	CLC-7.....	11
1.3.1	Osteopetrose.....	12
1.3.2	CLC-7 und die Therapie von Osteoporose.....	14
1.4	SSM als Alternative zur klassischen Elektrophysiologie.....	16
1.5	Ziel der Arbeit	19
2	MATERIAL & METHODEN.....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Verbrauchsmaterial	20
2.1.2	Antikörper	20
2.1.3	Zelllinien & Bakterienstämme	21
2.1.3.1	Zelllinien.....	21
2.1.3.2	Bakterienstämme.....	21
2.1.4	Puffer & Medien.....	21
2.2	Molekularbiologie.....	22
2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	22
2.2.2	Transformation von Bakterien	22
2.2.3	Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien.....	22
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA.....	22
2.2.5	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen.....	23
2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.2.7	Agarosegelelektrophorese der Nukleinsäuren.....	23
2.2.8	Reinigung von DNA.....	23
2.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
2.2.10	Rekombinante Polymerasekettenreaktion.....	24
2.2.11	DNA-Sequenzierung & Datenanalyse.....	25
2.2.12	Verwendete Plasmidvektoren	25
2.3	Zellkulturtechnik.....	26
2.3.1	Kulturmedien & Kultivierungsbedingungen.....	26
2.3.2	Passagieren von Zellen.....	26
2.3.3	Einfrieren von Zellen	27
2.3.4	Auftauen von Zellen.....	27
2.3.5	Zellzählung.....	28
2.3.6	Transfektion von Zellen	29
2.3.7	Generierung stabiler Zelllinien.....	29
2.3.7.1	Bestimmung optimaler Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion	30
2.3.7.2	Isolation von Einzelklonen	30
2.4	Das Flp-In™ T-REx™ System.....	31

2.5	Biochemische Methoden	32
2.5.1	Proteinpräparation aus adhärenenten Zellkulturen	32
2.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.5.3	Western Blot.....	32
2.6	Präparation von Membranen aus CHO und HEK-293 Zellen	33
2.6.1	Zellaufschluss.....	33
2.6.2	Membranseparation mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation	33
2.6.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	34
2.7	Fluorometrische Methoden	34
2.7.1	Fluoreszenzspektroskopie	34
2.7.1.1	Spektralphotometer	34
2.7.1.2	Plattenfluorometer.....	35
2.7.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	35
2.7.2.1	Präparation von CHO Zellen	35
2.7.2.2	Färben von Zellen mit LysoTracker® / ER-Tracker™	35
2.7.2.3	Mikroskopie & Bildaufnahme	36
2.8	Elektrophysiologie.....	37
2.8.1	Solid supported membrane (SSM)	37
2.8.2	SURFE ² R One.....	38
2.8.3	Messküvette & Fluidik.....	39
2.8.4	Sensorpräparation.....	40
2.8.5	Elektrische Charakterisierung der Sensoren	41
2.8.6	Messprotokolle und Puffer	41
2.8.7	Datenanalyse	42
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Funktionelle Charakterisierung von CIC-7	44
3.1.1	Expression und Lokalisation von CIC-7 Wildtyp & G213R.....	44
3.1.2	Kontrollmessungen.....	47
3.1.3	Fraktionale & subzelluläre Verteilung von CIC-7	48
3.1.4	CIC-7 vermittelte Ströme an der SSM	50
3.1.5	Aktivitätsvergleich von Wildtyp und G213R CIC-7.....	52
3.1.6	pH-Abhängigkeit von CIC-7	53
3.1.7	Anionen-Selektivität von CIC-7.....	54
3.1.8	Protonen-gekoppelte Transportaktivität von CIC-7	55
3.1.9	Untersuchung potentieller CIC-7 Inhibitoren.....	56
3.2	Charakterisierung des ligandengesteuerten Kationenkanals P2X₂.....	59
3.2.1	Messung P2X ₂ vermittelter Rezeptorströme	59
3.2.2	Spezifität der detektierten Ströme	61
3.2.3	Zeitabhängige Stabilität der Ströme	62
3.2.4	Na ⁺ -Konzentrationsabhängige Sättigung des Rezeptorstroms.....	63
3.2.5	Z'-Faktor des etablierten Assays	64
3.2.6	Einfluss der ATP-Konzentration auf den Rezeptorstrom	65
3.2.7	Inhibition von P2X ₂ durch Suramin	66
3.2.8	Zeitliche Stabilität des etablierten Ionengradienten.....	67
3.3	Lichtgesteuerte Spannungskontrolle an der SSM.....	68
3.3.1	Koexpression von CIC-Ka (+Barttin) & Bakteriorhodopsin in CHO	68
3.3.2	Entwicklung der kombinierten Licht-/Lösungswechselaktivierung	70
3.3.3	Modulation von CIC-Ka mittels bR-induziertem Potential.....	73

3.3.4	Fusion von bR-Purpormembranen in CIC-ec1 Liposomen.....	74
4	DISKUSSION.....	78
4.1	Funktionelle Charakterisierung von CIC-7.....	78
4.1.1	Expressionssystem & Zellaufschluss.....	78
4.1.2	Lokalisation und Aktivität von CIC-7.....	79
4.1.3	G213R-CIC-7 in CHO: Ein Modellsystem für ADOII.....	80
4.1.4	Die Rolle von Ostm1.....	81
4.1.5	Die ADOII beruht auf einem <i>Trafficking</i> -Defekt von CIC-7.....	83
4.1.6	CIC-7 erreicht nicht die Plasmamembran.....	84
4.1.7	Funktionelle Charakterisierung von CIC-7.....	85
4.1.8	Kanal oder Transporter?.....	86
4.1.9	Inhibitoren <i>Screening</i>	87
4.2	Charakterisierung von Ionenkanälen mit der SSM-Technik.....	91
4.2.1	Konventionelle Elektrophysiologie vs. SSM-Technik.....	91
4.2.2	Orientierungsspezifische P2X ₂ -Aktivierung der Membranvesikel.....	93
4.2.3	Stabilität der Na ⁺ -Gradienten.....	95
4.2.4	Spezifität der gemessenen Ströme.....	95
4.3	Lichtgesteuerte Spannungskontrolle an der SSM.....	98
4.3.1	Kapazitive Kopplung und Spannungskontrolle.....	98
4.3.2	Kombinierte Licht- & Lösungswechselaktivierung.....	100
4.3.3	Expression & Spannungskontrolle von bR in CHO Zellen.....	100
4.3.4	Orientierung & Potentialaufbau von bR an der SSM.....	101
4.3.5	Sättigung des bR-induzierten Potentials.....	104
4.3.6	pH-Einfluss & Einsatz von D85T bR.....	105
4.3.7	Alternative Möglichkeiten.....	106
4.4	Zusammenfassung & Ausblick.....	107
5	LITERATUR.....	109
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
7	SUMMARY.....	126
8	DANKSAGUNG.....	128
9	ANHANG.....	130
9.1	Abkürzungen.....	130
9.2	Einheiten.....	131
9.3	Physikalische Größen.....	131
9.4	Abbildungsverzeichnis.....	132
9.5	Tabellenverzeichnis.....	133
9.6	Lebenslauf.....	134
9.7	Publikationen.....	135

1 Einleitung

Eine zentrale evolutionäre Voraussetzung für die Entstehung komplexen Lebens ist die Möglichkeit der Kompartimentierung. Lebende Organismen bestehen aus Zellen, die sich weitgehend von ihrer Umwelt durch Membranen abgrenzen. Dadurch können unabhängige Reaktionsräume mit individuellen Bedingungen geschaffen werden. Eukaryotische Zellen verfügen weiterhin über individuelle intrazelluläre Kompartimente, die wiederum durch Membranen voneinander getrennt sind. Dies ermöglicht eine weitere Spezialisierung und die Effizienzsteigerung komplexer Reaktionsabläufe. Um ihren hohen Anforderungen gerecht zu werden, verfügen biologische Membranen über einige besondere Eigenschaften.

1.1 Biologische Membranen

Trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen haben alle biologischen Membransysteme eine gemeinsame Grundstruktur. Der Aufbau der Membran ist prinzipiell bei Prokaryoten und Eukaryoten sehr ähnlich, weshalb man auch von einer Elementarmembran („*unit membrane*“) spricht. Sie besteht grundsätzlich aus einer Lipid-Doppelschicht. Die Lipide der Membran liegen vorwiegend als Phospholipide (z.B. Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) vor. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften der Phospholipide mit einem hydrophilen „Phosphatkopf“ und einem hydrophoben „Fettsäureschwanz“ ordnen sich diese in wässriger Lösung spontan zu einer geordneten Lipid-Doppelschicht, wobei sich die hydrophilen Kopfgruppen dem wässrigen Milieu zuwenden, während die lipophilen Fettsäurereste in gegenseitigen Kontakt treten.

Zusätzlich zu den Lipiden sind in und an der Membran Proteine und Kohlenhydrate lokalisiert. Man unterscheidet verschiedene Typen von Membranproteinen. Integrale Membranproteine, die die Membran vollständig durchspannen, sowie assoziierte bzw. periphere Proteine, welche nur an der Oberfläche gebunden oder verankert sind. Da die Phospholipide untereinander lediglich über schwache Van-der-Waals-Kräfte interagieren und nicht kovalent verknüpft sind, besitzen Membranen (Abb. 1-1) einen quasi flüssigen Charakter, der eine laterale Diffusion der eingelagerten Proteine ermöglicht.

Jedoch gilt das klassische „flüssige Mosaik Modell“ (nach Singer & Nicolson, 1972), wonach sämtliche Membran-assoziierten Strukturen unabhängig voneinander agieren, mittlerweile als überholt, da Proteine in Membranen teilweise hoch konzentriert vorliegen und daher stark wechselwirken können [Engelman, 2005]. Die räumliche Nähe membran-assoziiierter Proteine ermöglicht eine Organisation, in der enzymatische Reaktionen effizient ablaufen können.

Durch ihren speziellen Aufbau sind Membranen flexibel, wichtig für Zellwachstum und Bewegung, und selektiv permeabel für kleine ungeladene Moleküle und Wasser, während Makromoleküle und geladene Ionen praktisch nicht permeieren. Somit können Membranen unterschiedliche Ionenkonzentrationen im extrazellulären bzw. intrazellulären Raum aufrechterhalten und ermöglichen dadurch eine Stoff- und aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaft als elektrische Isolatoren auch eine Ladungstrennung. Da die Konzentrationen der einzelnen Ionen im intra- und extrazellulären Raum aufgrund unterschiedlicher Transportprozesse nicht ausgeglichen sind, führt dies zu einem zellspezifischen elektrochemischen Gradienten an den Membranen.

Die Ionenzusammensetzung in Zellen und deren Kompartimenten ist wichtig für den Ablauf enzymatischer Reaktionen, die wichtigsten anorganischen Ionen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^-) können die Membran jedoch nicht selbstständig passieren. Deshalb sind selektive Transportsysteme nötig, mit denen die Zelle Verteilung und Konzentration der benötigten Stoffe auf beiden Seiten der Membran kontrollieren kann.

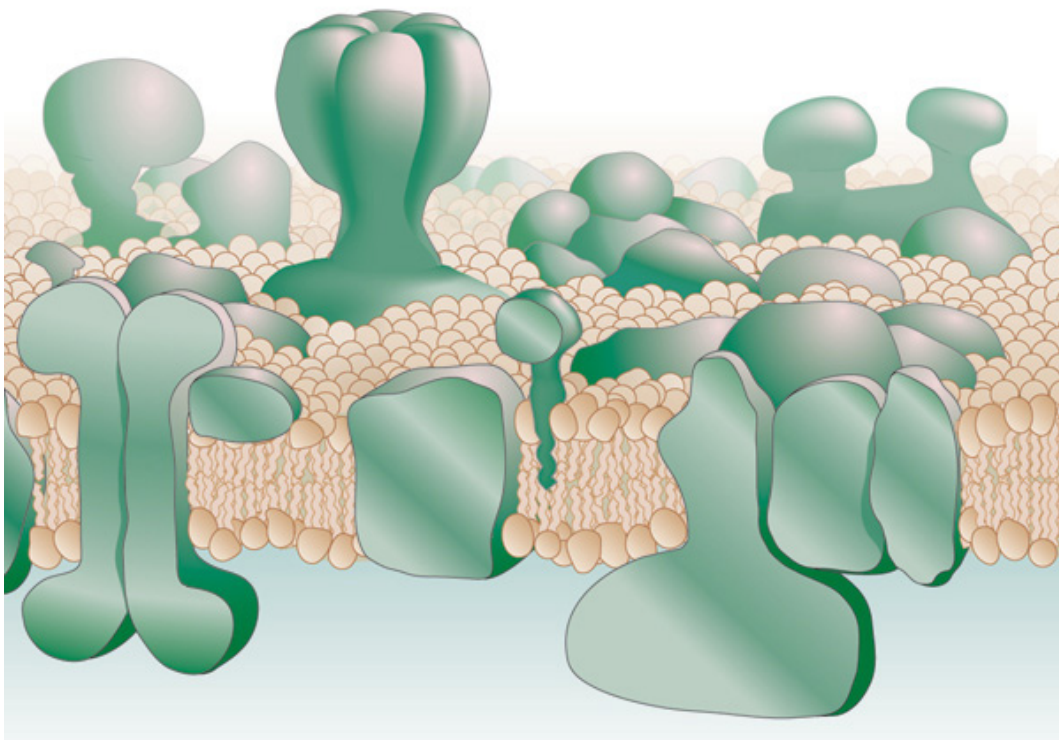


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau von Membranen. Aufbau einer Doppelschicht („lipid bilayer“) aus Phospholipiden mit hydrophoben (innen) und hydrophilen Gruppen (außen), sowie integralen und peripheren Membranproteinen. Die Membranproteine liegen teilweise in hoher Konzentration vor und können miteinander wechselwirken [Engelman, 2005].

1.1.1 Ionentransport durch biologische Membranen

Der Transport von Ionen über die Membran erfolgt über verschiedene spezifische Transportproteine, die sich aufgrund ihrer Energetik in primär und sekundär aktive, sowie passive Transporter und Ionenkanäle klassifizieren lassen.

Eine Untergruppe der primär aktiven Transportsysteme sind die Ionenpumpen. Sie nutzen die Hydrolyseenergie von ATP, um Moleküle entgegen ihres elektrochemischen Gradienten zu transportieren und diese somit auf einer Membranseite zu konzentrieren. Prominentester Vertreter der Pumpen ist die Na^+/K^+ -ATPase, die für den Erhalt des Konzentrationsunterschiedes von Natrium und Kalium an der Plasmamembran verantwortlich ist. Pumpen haben im Allgemeinen eine relativ geringe Transportrate von max. 100 Ionen pro Sekunde. Aber auch die ABC-Transporter gehören zu den primär aktiven Transportern.

Sekundär aktive Transporter können die in den durch die Pumpen generierten Konzentrationsgradienten gespeicherte Energie ihrerseits für den Transport von Molekülen entgegen eines Konzentrationsgradienten nutzen. Dazu koppeln sie den Transport des energieliefernden Ions entlang dessen Konzentrationsgradienten entweder an den Transport eines weiteren Moleküls in die gleiche Richtung (Symport) oder auch in die entgegen gesetzte Richtung (Antiport). Transporter besitzen eine Transportrate von 10^2 - 10^4 Molekülen pro Sekunde. Da für den gekoppelten Transport wie auch bei den Ionenpumpen komplexe Konformationsänderungen des Proteins nötig sind, erreichen sie nicht die Transportraten von Ionenkanälen (bis zu 10^8 Moleküle pro Sekunde).

Ionenkanäle bilden als integrale Membranproteine einen hydrophilen Kanal durch die Membran. Die Steuerung, das sogenannte *Gating* von Ionenströmen entlang ihres Konzentrationsgradienten, erfolgt bei Kanälen z.B. durch die Spannung oder auch gebundene Liganden.

Ionenkanäle können somit allgemein als spannungs- (z.B. spannungsaktivierte Na^+ -Kanäle $\text{Na}_v1.1$ - 1.9) oder ligandengesteuerte Kanäle (z.B. ATP-gesteuerte Kationenkanäle: P2X_{1-7}) klassifiziert werden. Eine weitere Unterscheidung erfolgt über die Selektivität für spezielle Ionen. So unterscheidet man Anionen- und Kationenkanäle und bei letzteren weiterhin z.B. Na^+ -, K^+ - oder Ca^+ -Kanäle. Da Chlorid in Vertebraten das dominierende Anion im Extrazellulärraum ist und daher Anionenströme hauptsächlich Chlorid-getragen sind, werden Anionenkanäle, obwohl sie neben Chlorid weitere Anionen transportieren können, funktionell zu Chloridkanälen zusammengefasst [Jentsch *et al.*, 2002].

1.2 Chloridkanäle & -transporter

Unter physiologischen Bedingungen herrscht an der Plasmamembran von Säuger-Zellen ein starker Chlorid-Gradient. Während Chlorid extrazellulär mit ca. 120 mM relativ hoch konzentriert vorliegt, beträgt die intrazelluläre Konzentration je nach Zelltyp 4-40 mM, so dass bei einem Ruhepotential von rund -60 mV nur geringe Chloridströme über die Membran auftreten. Chloridkanäle und -transporter sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt. Als zelluläre Funktionen lassen sich bei CLC-Plasmamembrankanälen drei Hauptaufgaben nennen: die Regulation des Zellvolumens, transepithelialer Transport und die Regulation der elektrischen Reizbarkeit [Jentsch *et al.*, 2002]. Neben der Lokalisierung auf der Plasmamembran finden sich Chloridkanäle und -transporter weiterhin in den Membranen intrazellulärer Organelle (Endosomen, Lysosomen, synapt. Vesikel), wo sie zur Einstellung physiologischer Ionenkonzentrationen beitragen und elektrokomparatorische Aufgaben bei Transportvorgängen von Ionen (z.B. H⁺-Transport zur Ansäuerung von vesikulären Kompartimenten) erfüllen.

Bisher sind drei unterschiedliche Familien von Chloridkanälen und -transportern bekannt, bei denen bereits ein direkter Chloridtransport nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich hierbei um die ligandengesteuerten Chloridkanäle (Glycin- und GABA-Rezeptoren), dem cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) und die Familie der spannungsgesteuerten Chloridkanäle und -transporter (CLC). Für zwei weitere Familien (Bestropine und TMEM16A) und andere putative Chloridkanäle wie die CLIC-Proteine und CLCAs (Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle) steht der endgültige Nachweis der spezifischen Chloridleitfähigkeit noch aus [Jentsch *et al.*, 2002; Duran *et al.*, 2009].

1.2.1 Die Familie der CLC Chloridkanäle & -transporter

Der erste Vertreter der CLC-Proteine wurde 1990 aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata* kloniert [Jentsch *et al.*, 1990]. Durch Homologiestudien konnte 1991 ClC-1 als erster Vertebraten-CLC identifiziert werden [Steinmeyer *et al.*, 1991]. Heute sind weitere CLC Homologe in Hefen, Eu- und Archaeobakterien beschrieben [Greene *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1994; Lurin *et al.*, 2000] und auch in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis thaliana* wurden CLC Proteine gefunden und teilweise elektrophysiologisch charakterisiert [Hechenberger *et al.*, 1996; Schriever *et al.*, 1999; Rutledge *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2006].

In Säugetieren sind neun Mitglieder der CLC-Familie bekannt (Abb. 1-2), die sich wiederum in drei Unterfamilien mit nur geringer Sequenzhomologie gliedern lassen [Jentsch *et al.*, 2002; Jentsch, 2008].

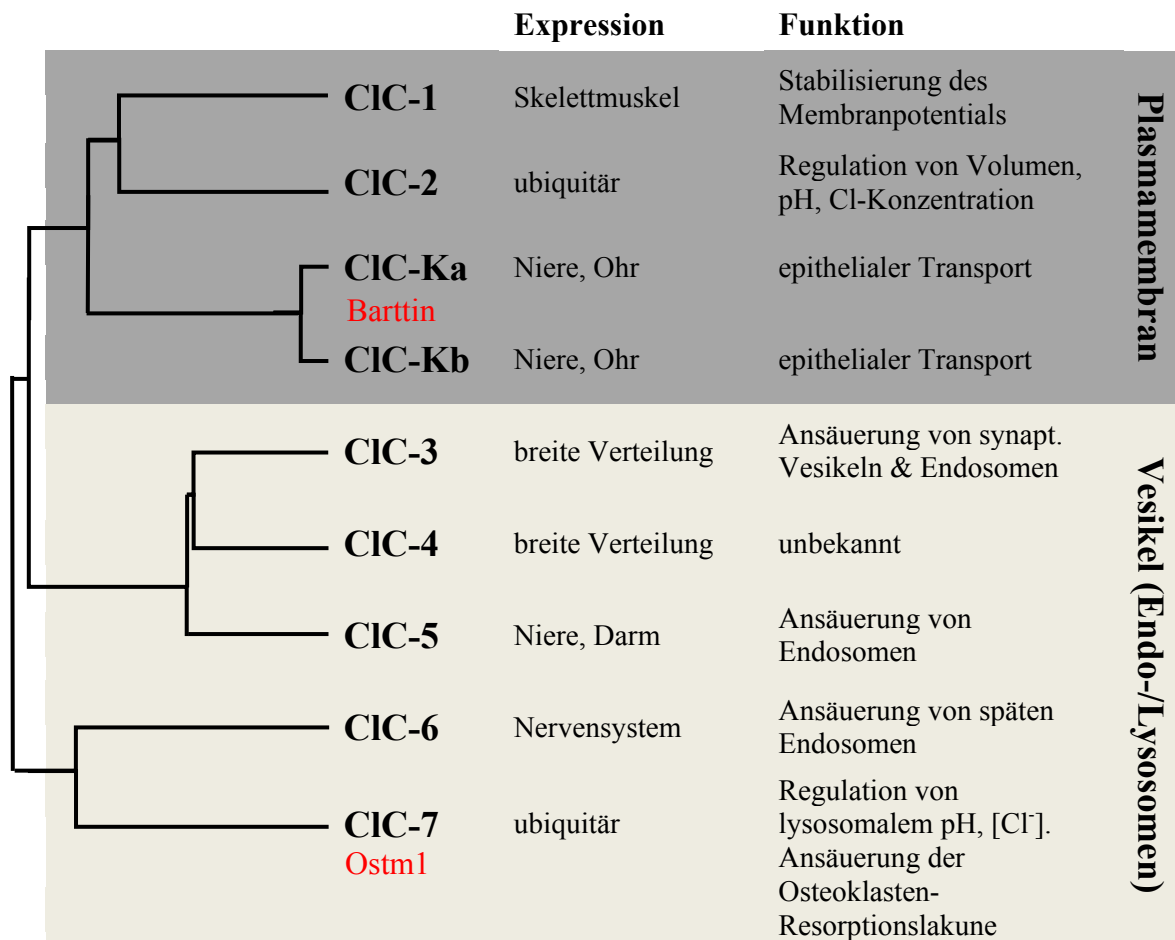


Abb. 1-2: Die Vertreter der CLC-Proteine in Säugetieren. Im Dendrogramm sind die Verwandtschaftsverhältnisse der drei CLC Untergruppen dargestellt. Bei den Vertretern der ersten Gruppe handelt es sich um plasmamembranständige Chloridkanäle, während die Vertreter der zweiten und dritten Gruppe hauptsächlich in intrazellulären Vesikeln lokalisiert sind und wahrscheinlich als Cl/H^+ -Antiporter arbeiten. Funktionelle Untereinheiten in rot. [Verändert nach Jentsch, 2008].

Bei den Vertretern der ersten Gruppe, CIC-1, CIC-2, CIC-Ka und CIC-Kb, handelt es sich um Chloridkanäle, die vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert sind, während die Vertreter der anderen beiden Gruppen (CIC-3/4/5 und CIC-6/7) hauptsächlich in intrazellulären Vesikeln exprimiert werden. Für die Mitglieder der letzten beiden Gruppen wird außerdem vermutet, dass sie nicht als klassische Chloridkanäle, sondern vielmehr als Chlorid-Protonen-Antiporter arbeiten, nachdem dieses Verhalten 2004 für einen der beiden bakteriellen CLC-Vertreter CIC-ec1 nachgewiesen werden konnte [Accardi & Miller, 2004]. Für dieses Protein konnte in *Bilayer*-Experimenten gezeigt werden, dass der Chloridtransport an einen entgegengesetzten Protonentransport im Verhältnis von 2:1 gekoppelt ist. Mittlerweile wurde ein ähnliches Verhalten auch für die Vertreter der zweiten Gruppe nachgewiesen [Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2008]. Die Vertreter der dritten Gruppe (CIC-6/7) konnten bisher noch nicht durch klassische elektrophysiologische Methoden charakterisiert werden, da sich diese Proteine auch bei Überexpression nicht auf der Plasmamembran nachweisen lassen. Allerdings weisen die Vertreter der zweiten und dritten

Gruppe, wie auch der bakterielle Transporter ClC-ec1 einen charakteristischen Glutamat-Rest auf (*proton*-Glutamat), welcher bei den CLC-Antiportern konserviert ist, bei den CLC-Kanälen der ersten Gruppe jedoch fehlt [Accardi *et al.*, 2005]. Aufgrund dessen wird auch für ClC-6 und ClC-7 eine Antiporteraktivität vermutet [Jentsch, 2007], die für ClC-7 mit Hilfe radioaktiver *Uptake* Messungen kürzlich bestätigt werden konnte [Graves *et al.*, 2008].

Während die Expression einiger Vertreter der CLC-Proteine auf bestimmte Gewebe beschränkt ist (ClC-1 in Skelettmuskeln, ClC-Ka & Kb in der Niere), sind andere ubiquitär in vielen Geweben und Organen nachzuweisen. Außerdem benötigen manche CLC-Proteine funktionelle Untereinheiten zur korrekten Funktion. So ist Barttin an *Trafficking* und Funktion der ClC-K Kanäle beteiligt [Estevez *et al.*, 2001; Scholl *et al.*, 2006] und für ClC-7 wurde Ostm1 als funktionelle β -Untereinheit identifiziert, die das Protein zu stabilisieren und vor Degradierung in den Lysosomen zu schützen scheint [Lange *et al.*, 2006].

1.2.2 Die Struktur und Funktion der CLC-Proteine

Biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen zur Strukturaufklärung der CLC-Proteine gestalteten sich lange Zeit schwierig, da einige Transmembrandomänen nur durch sehr kurze Loops miteinander verbunden sind [Schmidt-Rose & Jentsch, 1997]. Bereits 1984 postulierten Miller & White aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen am Torpedo-ClC ein *double barrel*-Modell für die CLC-Proteine, wobei zwei identische Untereinheiten einen funktionellen Kanal bilden. Erst die Kristallstrukturanalyse prokaryotischer CLC-Homologe aus *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* [Dutzler *et al.*, 2002] verschaffte einen vollständigen Überblick über die Struktur der CLC-Proteine. Jede Untereinheit besteht aus 18 α -Helices (davon 17 transmembran), von denen nur wenige die Membran vollständig durchspannen. Außerdem stehen die Transmembrandomänen dabei nicht senkrecht zur Membranoberfläche, sondern sind mehr oder weniger stark geneigt (Abb. 1-3 B). Zudem zeigen die Domänen der einzelnen monomeren Untereinheiten innerhalb der Membranebene eine Strukturwiederholung, wobei sich die N- und C-terminalen Hälften - A bis I und J bis R - in entgegengesetzter Orientierung befinden (Abb. 1-3 A). Beide Termini befinden sich intrazellulär. Die beiden Untereinheiten bilden über den Transmembranbereich eine Kontaktfläche aus, an welcher sich jedoch nicht, wie z.B. bei GABA- und Glycinrezeptoren, die Pore befindet. Jede Untereinheit verfügt vielmehr über eine eigene Pore, wie von Miller postuliert. Weiterhin wurde die Bildung von Heterodimeren aus verschiedenen CLC-Untereinheiten *in vitro* [Lorenz *et al.*, 1996; Weinreich & Jentsch, 2001; Suzuki *et al.*, 2006] und für ClC-4 & 5 bereits *in vivo* beobachtet [Mohammad-Panah *et al.*, 2003]. Eukaryotische CLC-Proteine besitzen im Unterschied zu ihren prokaryotischen

Homologen zwei C-terminale CBS-Domänen (benannt aufgrund der Homologie zur Cystathionin- β -Synthase [Ponting, 1997]), welche interagieren können [Markovic & Dutzler, 2007]. Mutationen in diesen Motiven verursachen verschiedene Krankheiten. Ihre Funktion ist bisher allerdings kaum verstanden [Estevez & Jentsch, 2002; Pusch *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2004]. Neben einer Beteiligung an Lokalisations- und Oligomerisationsmechanismen [Estevez *et al.*, 2004; Hebeisen *et al.*, 2004] wird für die Domänen auch eine regulative Funktion postuliert, da für ClC-1 [Bennetts *et al.*, 2005], ClC-2 [Scott *et al.*, 2004] und ClC-5 [Wellhauser *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2007] eine Bindung von Adenosin-Nukleotiden nachgewiesen werden konnte. Diese regulatorische Funktion wurde mittlerweile an ClC-1 [Bennetts *et al.*, 2005; Bennetts *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2007] und ClC-5 [Zifarelli & Pusch, 2009] bestätigt, wobei die Bindung von Adenosin-Nukleotiden am ClC-1 eine Inhibition des Kanalstroms bewirkt, während bei ClC-5 die Bindung den Strom verstärkt.

Die meisten CLC-Kanäle sind spannungssensitiv, manche vom pH und der extrazellulären Kalzium-Konzentration [Jentsch *et al.*, 2002; Uchida & Sasaki, 2005] reguliert. Das Öffnen und Schließen kann weiterhin durch die Chloridkonzentration beeinflusst werden [Pusch *et al.*, 1995]. Die spannungsabhängige Regulation ist außerdem in zwei Mechanismen unterteilt. Zum Einen dem unabhängigen Öffnen und zum Anderen dem langsameren gemeinsamen Schließen der einzelnen Poren [Ludewig *et al.*, 1996; Weinreich & Jentsch, 2001]. Eine weitere Besonderheit der CLC-Proteine ist ihre Selektivität für Chlorid. Die meisten bisher elektrophysiologisch charakterisierten CLC-Proteine besitzen eine Leitfähigkeit von $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ [Jentsch *et al.*, 2002].

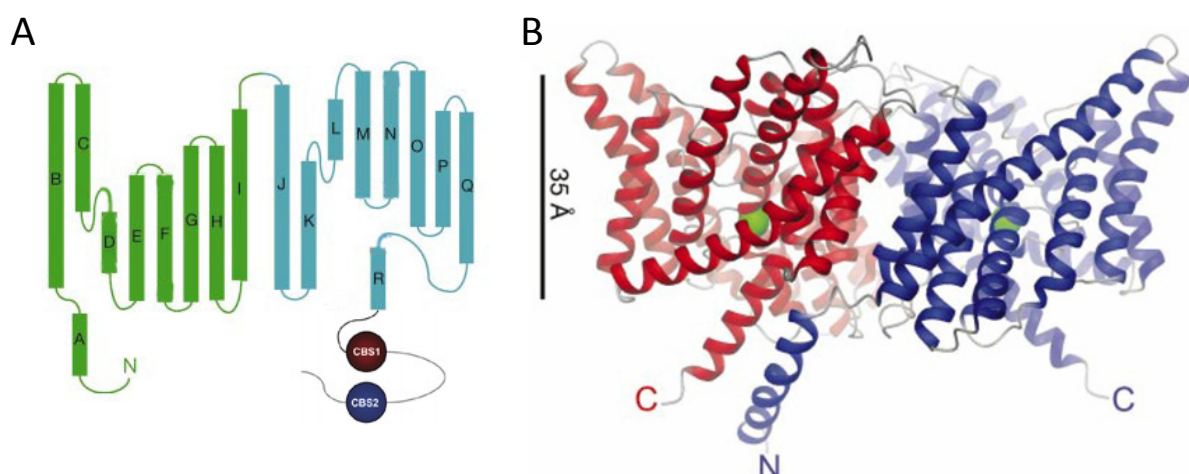


Abb. 1-3: Topologie-Modell und Struktur der CLC-Proteine. (A) Interne Homologie eines Monomers zwischen Helix A-I (grün) und J-R (hellblau). C-terminal befinden sich die beiden für eukaryotische CLC-Proteine typischen CBS Domänen. (B) Struktur eines bakteriellen CLC-Homologs (*Salmonella typhimorium*), basierend auf einer 3 Å-Kristall-Strukturanalyse. Zwei identische Untereinheiten orientieren sich entgegengesetzt als Dimer in der Membran. Die 18 Helices durchspannen die Membran oft nur teilweise und sind außerdem unterschiedlich geneigt. Die im Selektivitätsfilter gebundenen Chloridionen sind in der jeweiligen Pore in grün dargestellt [verändert nach Dutzler *et al.*, 2002; Dutzler *et al.*, 2007].

1.2.3 Azidifizierung endosomaler Vesikel

In den Vesikeln des endozytotischen Wegs herrschen unterschiedliche pH Werte, welche wichtig für die Aktivität von endo- und lysosomalen Enzymen sind, die meist ein pH-Optimum im Sauren haben. Dieser Umstand dient der Zelle als Schutzmechanismus vor unspezifischen Reaktionen, sollten Vesikel zerstört werden und die hydrolytischen Enzyme in das Zytosol gelangen. Auch die endosomale Dissoziation von Rezeptor-Liganden-Komplexen (z.B. LDL) ist stark pH abhängig. Über die verschiedenen Zwischenstufen (frühe, Sortierungs-, späte Endosomen) fällt der pH von ca. 6,8 bis auf 4,5 -5,0 in den Lysosomen ab [Faundez & Hartzell, 2004]. Für diese Ansäuerung ist hauptsächlich die vakuoläre H^+ -ATPase (V-Typ) verantwortlich [Mellman *et al.*, 1986]. Sie konzentriert unter ATP-Verbrauch Protonen im Lumen der Vesikel. Da bei diesem Prozess geladene Ionen (H^+) vektoriell über die Membran transportiert werden, kommt es zur Ausbildung eines positiven Membranpotentials, welches den weiteren Protonentransport behindern würde und die Ansäuerung somit ohne Potentialkompensation früh zum Erliegen käme. Aus diesem Grund sind in den Vesikeln weitere Proteine, darunter Vertreter der CLCs, exprimiert (Abb. 1-4), die Einfluss auf die Azidifizierung haben [Faundez & Hartzell, 2004; Henriksen *et al.*, 2008]. Da die endosomale Azidifizierung abhängig von der Anwesenheit zytosolischen Chlorids ist [Fuchs *et al.*, 1989; Zen *et al.*, 1992] und die Ansäuerung von Clathrin-„gecoateten“ Vesikeln durch den unspezifischen Chloridkanalinhibitor DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) inhibiert werden kann [Xie *et al.*, 1983], scheinen Chloridleitfähigkeiten eine wichtige Rolle bei der Azidifizierung der endosomalen Vesikel zu spielen.

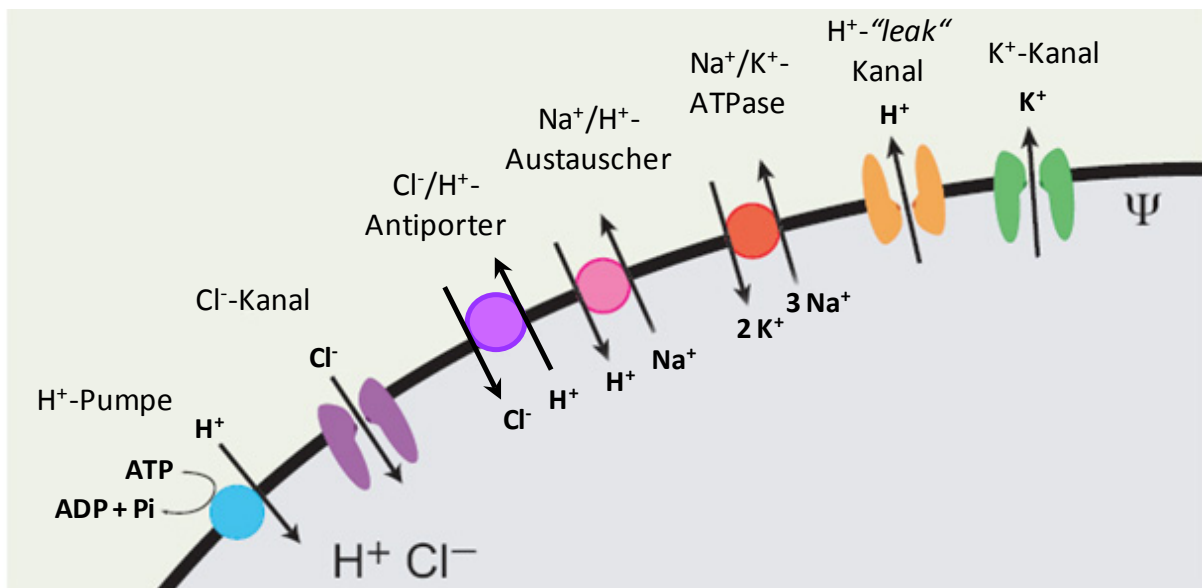


Abb. 1-4: Vesikuläre Transporter und Kanäle mit Einfluss auf das Membranpotential. Der H^+ -Transport der vakuolären H^+ -ATPase (blau) verursacht ein positives elektrochemisches Potential ($\Delta\Psi$). Cl Kanäle bzw. Cl/H^+ -Antiporter (lila) können dieses Potential kompensieren, so dass eine effektive Ansäuerung der Vesikel gewährleistet ist. [Verändert nach Faundez & Hartzell, 2004].

Die CLC-Proteine in den Membranen der Vesikel ermöglichen den gleichzeitigen Einstrom von Chloridionen mit den ATPase-getriebenen Protonen, die eine Ladungskompensation bewirken und dadurch die weitere Ansäuerung ermöglichen. An *Knockout*-Mausmodellen für CLC-3 und CLC-5 konnte den Einfluss dieser CLC-Proteine auf die effektive Ansäuerung gezeigt werden (vgl. Kap. 1.2.4). Da es sich bei den meisten intrazellulären CLC-Proteinen um Cl^-/H^+ -Antiporter handelt, bei denen wahrscheinlich für zwei einströmende Chloridionen ein Proton aus dem Vesikel transportiert wird [Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005], verschlechtert sich die Energiebilanz der Ansäuerung unter Beteiligung der CLC-Transporter. Die exportierten Protonen gehen für die Ansäuerung verloren. Die ATPase muss diese Energie zusätzlich aufbringen, was bei einem rein passiven Chloridstrom über Kanäle nicht nötig wäre. Dafür ist der Chloridstrom jedoch direkt an den Protonengradienten gekoppelt. Somit könnten die CLC-Transporter auch an der Regulation der vesikulären Chloridkonzentration beteiligt sein, welche mit sinkendem pH signifikant ansteigt [Sonawane *et al.*, 2002; Sonawane & Verkman, 2003].

1.2.4 Physiologische Funktion vesikulärer CLC-Transporter

Die Vertreter der zweiten (CLC-3/4/5) und dritten (CLC-6/7) CLC-Untergruppe sind intrazellulär in den Vesikeln des endozytotischen Systems exprimiert. CLC-3 und CLC-4 finden sich in vielen unterschiedlichen Geweben. CLC-3 ist dort neben den Endosomen auch in synaptischen Vesikeln lokalisiert [Salazar *et al.*, 2004]. Aufgrund seiner geringen Plasmamembranexpression in heterologen Systemen gestaltet sich die elektrophysiologische Charakterisierung als schwierig [Zhao *et al.*, 2007]. Die gewonnenen Ergebnisse werden kontrovers diskutiert [Jentsch, 2008]. Mäuse, bei denen CLC-3 ausgeschaltet ist, leiden unter einer starken postnatalen Degeneration des Hippocampus und der Retina [Stobrawa *et al.*, 2001]. Als physiologische Funktion wird für CLC-3 eine Beteiligung an der Azidifizierung und Regulation der Chloridkonzentration von synaptischen Vesikeln und Endosomen angenommen, wobei für ersteres auch VGLUT1 in Frage kommt [Schenck *et al.*, 2009].

Während die physiologische Funktion von CLC-4 bisher weitgehend unbekannt ist, konnte für CLC-5 eindeutig ein Zusammenhang mit der Dent'schen Krankheit hergestellt werden. CLC-5 ist hauptsächlich in Endosomen der Niere exprimiert [Mohammad-Panah *et al.*, 2003]. Mutationen im CLCN5 Gen führen vorwiegend bei Männern (das CLCN5 Gen liegt auf dem X-Chromosom) zu stark erhöhten Konzentrationen an niedermolekularen Proteinen und Kalzium im Urin, was wiederum die Bildung von Nierensteinen begünstigt, die das Organ bis zu seiner vollständigen Zerstörung schädigen können [Wrong *et al.*, 1994]. Untersuchungen an *Knockout*-Mausmodellen und Messungen der endosomalen Chloridkonzentration und des

pH bestätigten die Vermutung, dass die Endozytose aufgrund einer verminderten Azidifizierung der frühen Endosomen stark beeinträchtigt war [Piwon *et al.*, 2000; Hara-Chikuma *et al.*, 2005]. Obwohl CIC-4 und CIC-5 physiologisch intrazellulär lokalisiert sind, ist ihre elektrophysiologische Charakterisierung möglich, da bei heterologer Expression eine ausreichende Oberflächenexpression erreicht wird. Somit konnten für die beiden eng verwandten Proteine stark auswärts gleichrichtende Ströme gemessen werden [Steinmeyer *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1999]. Die Ionenselektivität wurde für beide Proteine mit $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$ bestimmt [Friedrich *et al.*, 1999; Hebeisen *et al.*, 2003]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sie nicht als Kanal, sondern als Cl^-/H^+ -Antiporter arbeiten [Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005]. Die genaue Stöchiometrie des Antiports konnte noch nicht bestimmt werden, wird aber wie beim bakteriellen Homolog CIC-ec1 (2:1) vermutet.

Während die Vertreter der zweiten CLC-Untergruppe im frühen, Sortierungs- und Recycling-Endosom zu finden sind, vervollständigt die dritte Untergruppe mit einer Lokalisierung im späten Endosom und Lysosom die Expression der CLC-Proteine in den Vesikeln des endozytotischen Wegs (Abb. 1-5 A). Ein weiterer wichtiger Unterschied zu den CLCs der zweiten Gruppe ist, dass sowohl CIC-6 als auch CIC-7 bei heterologer Expression in verschiedenen Systemen nicht auf der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte [Brandt & Jentsch, 1995; Buyse *et al.*, 1997]. Daher war eine detaillierte elektrophysiologische Untersuchung der beiden Proteine bisher nicht möglich.

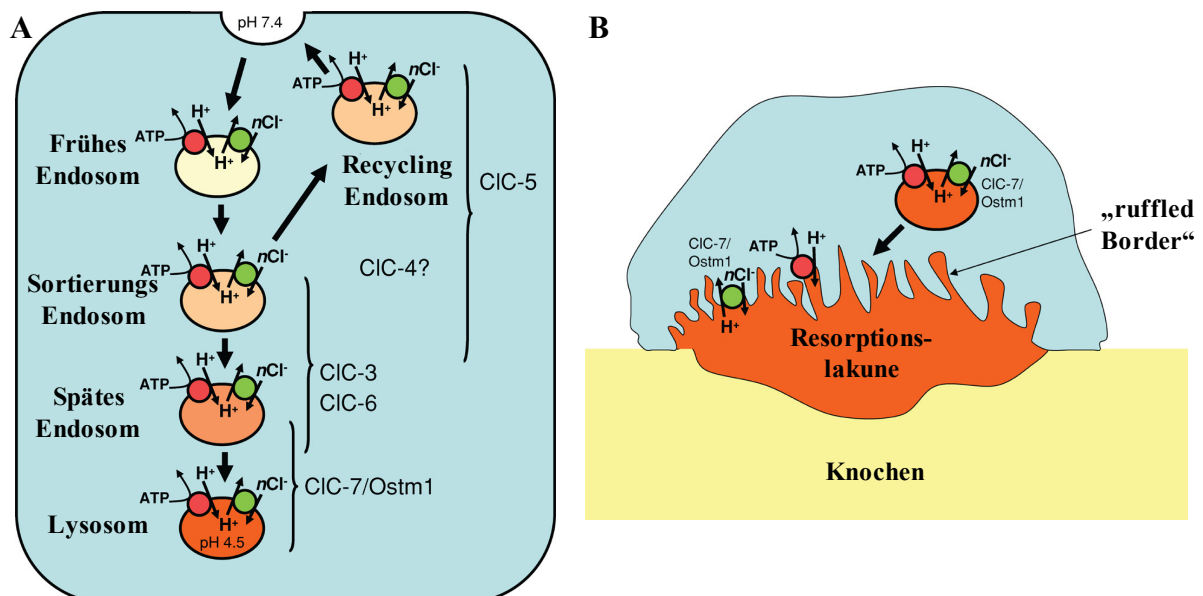


Abb. 1-5: Subzelluläre Lokalisation vesikulärer CLC-Proteine. (A) Lokalisierung der CLC-Proteine in den Vesikeln des endo- und lysosomalen Wegs. Vertreter der zweiten Untergruppe sind vorwiegend in den frühen, Vertreter der dritten Untergruppe in späten Endosomen und Lysosomen exprimiert. Die Vesikel werden während ihrer Reifung sukzessiv durch eine V-Typ H^+ -ATPase angesäuert (rosa bis rote Färbung). Die CLC-Transporter liefern bei diesem Prozess möglicherweise das kompensierende Cl^- -Anion. (B) Osteoklasten während der Knochenresorption. Die Resorptionslakune wird durch die H^+ -ATPase angesäuert, CIC-7 ist hier stark exprimiert und an der Azidifizierung beteiligt [Jentsch, 2007].

CLC-6 ist fast ausschließlich in Neuronen exprimiert [Poet *et al.*, 2006]. Eine zur Klärung der physiologischen Funktion generierte *Knockout*-Maus für CLC-6 zeigte eine leichte Form von lysosomaler Speicherkrankheit, war jedoch normal fertil und lebte genauso lange wie Kontrollmäuse [Poet *et al.*, 2006]. Untersuchungen des lysosomalen pH zeigten keine signifikanten Veränderungen. Da im lysosomalen Speichermaterial auch die C-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase gefunden wurde, könnte CLC-6 in der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (CLN), einer neurodegenerativen Erkrankung, eine Rolle spielen [Jentsch, 2008]. Auch wenn eine direkte elektrophysiologische Untersuchung bisher erfolglos war, wird für CLC-6 und CLC-7 von einer Antiporteraktivität analog zu den Vertretern der zweiten Untergruppe ausgegangen, da ein bei allen CLC-Transportern konservierter Glutamat-Rest auch in diesen beiden Proteinen zu finden ist [Accardi *et al.*, 2005; Zdebik *et al.*, 2008]. CLC-Kanäle der ersten Untergruppe besitzen diesen Rest nicht.

1.3 CLC-7

CLC-7 ist neben den späten Endosomen und Lysosomen auch stark in der „*ruffled border*“-Membran von knochenresorbierenden Osteoklasten lokalisiert (Abb. 1-5 B) und findet sich in praktisch allen untersuchten Geweben [Brandt & Jentsch, 1995; Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005]. Wie für CLC-6 war auch bei CLC-7 bislang eine elektrophysiologische Charakterisierung aufgrund der fehlenden Oberflächenexpression nicht möglich. Allerdings konnten mit Hilfe radioaktiver *Uptake*-Messungen an Lysosomen gezeigt werden, dass CLC-7 tatsächlich als Cl^-/H^+ -Antiporter arbeitet und in Lysosomen für den Chloridtransport verantwortlich ist [Graves *et al.*, 2008].

Lange *et al.* konnten nachweisen, dass CLC-7 mit dem Protein *Ostm1* eine funktionale β -Untereinheit besitzt [Lange *et al.*, 2006]. CLC-7 benötigt *Ostm1* nicht zur korrekten lysosomalen Lokalisation, während *Ostm1* ohne CLC-7 nicht in Lysosomen gefunden werden kann. Ohne die Untereinheit ist die Expression von CLC-7 in den Lysosomen allerdings stark vermindert. Da CLC-7 als einziges eukaryotisches CLC-Protein nicht glykosyliert ist, wird vermutet, dass die stark glykosylierte Untereinheit CLC-7 in den Lysosomen vor der sauren Umgebung und der Degradation schützt [Lange *et al.*, 2006]. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion wurde auch für CLC-7 ein *Knockout*-Mausmodell erstellt. Die geborenen Mäuse waren sehr klein und starben innerhalb von 6 Wochen (Abb. 1-6 A). Sie litten unter einer postnatalen neuronalen und retinalen Degeneration und unter einer schweren Osteopetrose [Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005]. Die detaillierte Analyse ihrer Osteoklasten zeigte, dass diese nicht in der Lage waren, effektiv Knochenmaterial zu resorbieren, da sie ihre Resorptionslakune nicht mehr ansäuern konnten [Kornak *et al.*, 2001].

Daher wird auch für CIC-7 in Osteoklasten von einer Ladungs-kompensatorischen Funktion (ähnlich der von CIC-3 und CIC-5 in Endosomen) ausgegangen, da die Ansäuerung der Resorptionslakune analog durch eine V-Typ H^+ -ATPase geschieht.

Die neuronale Degeneration beruht auf einer lysosomalen Speicherkrankheit. Wie für CIC-6 wurden auch hier Marker der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose gefunden [Kasper *et al.*, 2005] und es konnte gezeigt werden, dass CIC-7 obligatorisch für die lysosomale Degradation endozytierten Materials ist [Wartosch *et al.*, 2009]. Während für den Einfluss von CIC-7 auf die Azidifizierung von Lysosomen unterschiedliche Ergebnisse vorliegen [Kasper *et al.*, 2005; Graves *et al.*, 2008], kann außerdem eine Beteiligung von CIC-7 an der Regulation der lysosomalen Chloridkonzentration von Bedeutung sein [Jentsch, 2007]. Mutationen im humanen CIC-7 (und Ostm1) führen auch bei Menschen zu schwerer Osteopetrose und Neurodegeneration [Kornak *et al.*, 2001; Frattini *et al.*, 2003; Maranda *et al.*, 2008].

1.3.1 Osteopetrose

Knochen unterliegen einer ständigen Veränderung. Besonders während des Wachstums, aber auch im ausgewachsenen Zustand müssen sich Knochen an die äußeren Bedingungen anpassen können. Um eine optimale Stabilität zu gewährleisten, verändern Knochen je nach mechanischer Belastung ihre Struktur. Dabei besteht ein ständiges empfindliches Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und abbau. Für diese Prozesse sind Osteoblasten (Aufbau) und Osteoklasten (Abbau) zuständig, deren Aktivität aufeinander abgestimmt ist.

Die Osteoklasten, die einzigen Zellen im Organismus, die zum Knochenabbau befähigt sind, entstehen aus Monozyten, die unter Stimulation von Wachstumsfaktoren zu vielkernigen Zellen fusionieren können und eine Größe von bis zu 100 μ M erreichen. Zum Knochenabbau heften sich die Zellen mit Hilfe von Integrinen an die Knochenoberfläche an. Es bildet sich um die Fläche der Anhaftung ein Aktinring, was zu einem sehr engen Kontakt zwischen Knochen und Osteoklasten führt. Anschließend fusionieren viele saure Vesikel (Lysosomen) mit der zum Knochen gerichteten Membran und bilden somit die sogenannte „*ruffled border*“. In dieser Membran ist die vakuoläre H^+ -ATPase hoch exprimiert, durch deren Aktivität der Innenraum zwischen Knochen und Osteoklast, die Resorptionslakune, stark angesäuert wird (ca. pH 4,5). Der saure pH bietet den sauren Hydrolasen optimale Reaktionsbedingungen und löst das Hydroxyapatit, welches dem Knochen seine Härte verleiht. CIC-7 ist in der *ruffled border* stark exprimiert und es wird vermutet, dass er für die Bereitstellung der kompensatorischen Anionen für die gepumpten Protonen verantwortlich ist, um die Bildung eines stark positiven Membranpotentials zu vermeiden [Kornak *et al.*, 2001]. Ist die knochenresorbierende Aktivität der Osteoklasten vermindert, kommt es zur

unkontrollierten Anhäufung von Knochenmaterial, wodurch der Knochen seine Mikrostruktur und somit massiv an Stabilität verliert. Folge ist die so genannte Marmorknochenkrankheit (Osteopetrose).

Als genetische Ursache für eine verminderte Osteoklastenaktivität bzw. -entwicklung kommen zehn Gene in Betracht, von denen drei an der Ansäuerung der Resorptionslakune beteiligt sind [Stark & Savarirayan, 2009]. Je nach Mutation kommt es zu unterschiedlich starken Formen der Osteopetrose. Mutationen in der Carboanhydrase II, welche die zytosolischen Protonen für die Ansäuerung der Resorptionslakune bereit stellt, führen zu einer eher milden Form, der autosomal rezessiven Osteopetrose (ARO) [Sly *et al.*, 1983]. Mutationen in der $\alpha 3$ -Untereinheit der vakuolären H^+ -ATPase führen hingegen zu einer schweren rezessiv vererbten infantilen Osteopetrose, einer lebensbedrohlichen Form, die meist mit Blind- und Taubheit einhergeht [Kornak *et al.*, 2000]. Die beim Menschen am häufigsten vorkommende Form ist die autosomal dominante Osteopetrose (ADO) [Cleiren *et al.*, 2001]. Verschiedene Mutationen im CLCN7 Gen konnten bisher mit dieser eher milden Form (langsamer Krankheitsverlauf, keine Blindheit) der Osteopetrose (ADOII oder Albers-Schönberg Krankheit) in Verbindung gebracht werden. Mutationen im CLCN7 Gen treten aber auch bei den anderen Formen der Osteopetrose auf, insgesamt wurden über 30 verschiedene identifiziert [Campos-Xavier *et al.*, 2003; Frattini *et al.*, 2003; Waguespack *et al.*, 2003; Waguespack *et al.*, 2007]. Osteoklasten von ADOII Patienten mit einer G215R *missense*-Mutation im CLCN7 Gen weisen eine verminderte Azidifizierung und Resorptionsfähigkeit auf [Henriksen *et al.*, 2004; Henriksen *et al.*, 2009]. Clc-7 defiziente Mäuse, die an einer schweren Form der Osteopetrose leiden, sind viel kleiner als gleichaltrige Artgenossen, haben einen dysmorphen Kopf, eine unnatürliche Körperhaltung und ihre Tibia-Knochen besitzen keinen Markraum, eine erhöhte Knochendichte und eine unstrukturierte Corticalis (Abb. 1-6) [Kornak *et al.*, 2001].

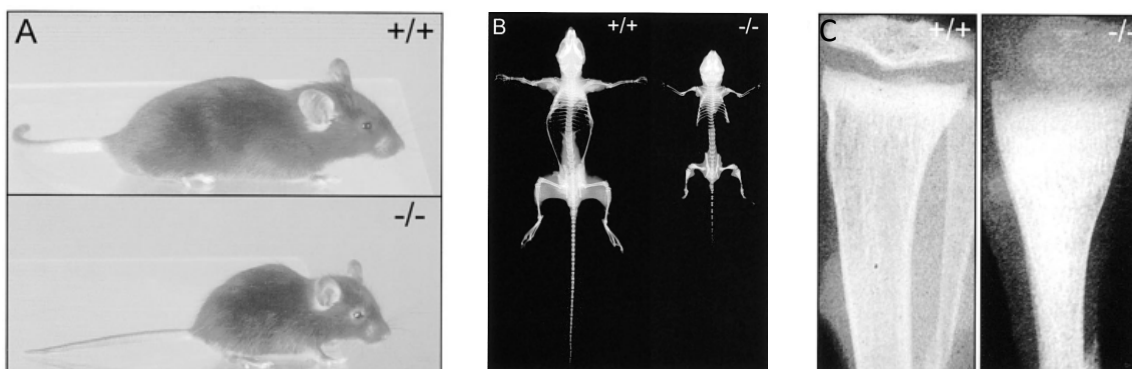


Abb. 1-6: Die osteopetrotische *Clcn7^{-/-}* Knockoutmaus. (A) Die *Clcn7^{-/-}* Tiere (-/-) sind wesentlich kleiner als Wildtypiere (+/+) gleichen Alters und haben eine unnatürliche Körperhaltung. (B) Röntgenaufnahme im Vergleich. (C) Röntgenaufnahme des Tibia-Knochens im Vergleich. *Clcn7^{-/-}* Knochen besitzen keinen Markraum und eine erhöhte Knochendichte, außerdem eine unstrukturierte Corticalis [Kornak *et al.*, 2001].

1.3.2 CIC-7 und die Therapie von Osteoporose

Die Osteoporose ist eine der zehn wichtigsten Erkrankungen weltweit auf der Liste der WHO. Allein in Deutschland gibt es ca. sieben Millionen Betroffene bei steigender Tendenz. Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer (aufgrund von Erkrankungen, Hormon- oder Kortisontherapie, Immobilisierung) Osteoporose. Vor allem Frauen gehören zur Hauptrisikogruppe. Etwa 30% aller Frauen entwickeln nach der Menopause eine primäre Osteoporose. Aber auch Männer sind von der sogenannten senilen- oder Altersosteoporose betroffen.

Zur Anpassung an äußere Belastungen und Reparatur von Mikroschäden unterliegen jährlich 5-10% der gesamten Knochenmasse einer Remodellierung [Martin & Seeman, 2007], dem präzise koordinierten Prozess aus Knochenauf- und -abbau.

Durch den Östrogenmangel verlieren Frauen nach der Menopause einen wichtigen regulierenden Faktor im Knochenstoffwechsel. Östrogen ist an der Regulation der Lebenszeit und somit der Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten beteiligt [Manolagas, 2000]. Bei Östrogenmangel verkürzt sich die Lebenszeit der Osteoblasten, während sich gleichzeitig die Lebenszeit der Osteoklasten verlängert. Das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels bekommt somit netto eine negative Bilanz. Zusätzlich bewirkt der Östrogenmangel eine vermehrte Remodellierungsaktivität, was den negativen Effekt nochmals verstärkt [Seeman, 2004]. Unabhängig vom Hormonspiegel verringert sich die Knochenbildung durch die Osteoblasten im Alter (über 70 Jahre), so dass auch Männer betroffen sind [Seeman, 2003].

Während es bei der Osteoporose durch eine verminderte Osteoklastenaktivität zum Aufbau von unstrukturiertem Knochen und damit einhergehend zu einem Stabilitätsverlust kommt, führt bei der Osteoporose eine netto verminderte Knochenbildung langsam zu einer Abnahme der Knochendichte. Auch hier ist die Folge ein Stabilitätsverlust. Es kommt bereits bei geringen Belastungen vermehrt zu Brüchen, vor allem

- im Halswirbelbereich
- am Oberschenkelhals
- an den Handgelenken
- am Becken

Diese verheilen zwar in derselben Geschwindigkeit wie bei gesunden Patienten. Trotzdem stellen die zur Regeneration notwendigen langen Ruhezeiten besonders bei älteren Menschen ein hohes Risiko für eine dauerhafte Immobilisierung und sekundäre Infektionen (z.B. Lungenentzündungen) dar.

Bei der Therapie der Osteoporose unterscheidet man zwischen Strategien, die den Knochenaufbau stimulieren oder solchen, die den Knochenabbau inhibieren (Antiresorptiva). Die klassische Therapie erfolgt mittels Bisphosphonaten (Alendronat, Risedronat, Ibandronat), Östrogenen und weiteren Therapeutika wie Raloxifen oder Strontiumranelat [Mitchner & Harris, 2009]. Auch monoklonale Antikörper (Denosumab) befinden sich in klinischen Studien [Silverman, 2009]. Allerdings unterliegen viele der etablierten Therapeutika Einschränkungen. So sind manche nur intravenös in langen Zeitabständen verabreichbar und lediglich für die Behandlung von postmenopausaler Frauen zugelassen. Zusätzlich sind Östrogenpräparate prinzipiell nur für Frauen geeignet. Der Einsatz von Östrogenen ist im Hinblick auf Nebenwirkungen und Risiken (Brustkrebs, Herzinfarkt, Schlaganfall) prinzipiell kritisch zu bewerten.

Ziel aller Therapieansätze ist die Wiederherstellung des Gleichgewichtes im Knochenstoffwechsel, entweder durch eine Erhöhung der Knochenbildung oder durch eine Inhibition der Knochenresorption (Abb. 1-7).

Da für CIC-7 eine direkte Beteiligung an der Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten gezeigt werden konnte [Kornak *et al.*, 2001; Neutzsky-Wulff *et al.*, 2008; Henriksen *et al.*, 2009], scheint dieser Transporter ein interessanter Angriffspunkt für die Entwicklung neuartiger Osteoporosetherapeutika zu sein [Schaller *et al.*, 2005; Verkman & Galiotta, 2009; Zhao *et al.*, 2009]. Mit der Substanz NS3736 wurde bereits ein Inhibitor identifiziert, der die Knochenresorption in einem Rattenmodell signifikant beeinflusste [Schaller *et al.*, 2004].

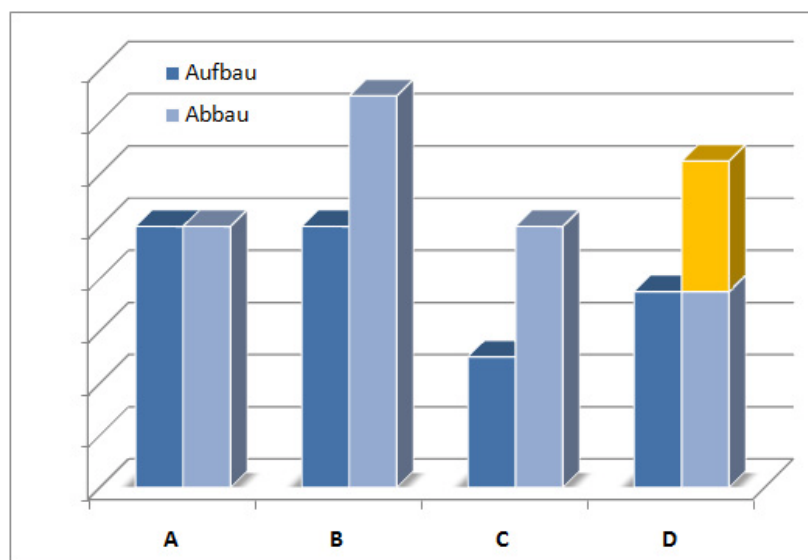


Abb. 1-7: Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels. Bei normalem Knochenstoffwechsel befinden sich Knochenaufbau (dunkelblau) durch Osteoblasten und Knochenabbau (hellblau) durch Osteoklasten im Gleichgewicht (A). Steigt einseitig die Aktivität der Osteoklasten (B) oder vermindert sich die Aktivität der Osteoblasten (C), wird das Gleichgewicht gestört, es kommt zu einem netto-Abbau von Knochenmaterial. (D) Eine Therapie mit CIC-7 Inhibitoren (gelb) könnte helfen, die Aktivität der Osteoklasten an die der Osteoblasten anzupassen und somit das Gleichgewicht wiederherzustellen.

1.4 SSM als Alternative zur klassischen Elektrophysiologie

Zur Untersuchung von katalytisch aktiven Proteinen sind geeignete Testsysteme notwendig, die mit hinreichender Genauigkeit die Aktivität der jeweiligen Zielproteine wiedergeben müssen. Für lösliche Proteine existiert eine große Zahl valider Standardmethoden, die eine genaue Charakterisierung erlauben. Im Gegensatz dazu gestaltet sich jedoch die Untersuchung von membranständigen Transportproteinen oft als schwierig. Für ihre funktionelle Charakterisierung existieren nur wenige Methoden:

- Patch-Clamp Technik
- Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemme (TEVC) an Oozyten von *Xenopus laevis*
- Fluoreszenz-*Assays* auf Basis von spannungs- oder ionenabhängigen Farbstoffen
- Flux-*Assays* auf Basis der Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)
- radioaktive Flux-*Assays*
- Bindungs-*Assays*

In den letzten Jahren wurden einige neuartige Detektionsmethoden entwickelt, darunter verschiedene Chip-basierte Systeme (Patch-on-a-chip, μ ARCSTM etc.) und *Bilayer*-Methoden [Brüggemann *et al.*, 2006; Dunlop *et al.*, 2008]. Während es sich bei Patch-Clamp und TEVC um direkte Messmethoden handelt, zählen Bindungs-*Assays* und *Assays* auf Basis von spannungs- oder ionenabhängigen Fluoreszenzfarbstoffen (FLIPR) zu den indirekten Methoden. Zum Vergleich der verschiedenen Systeme und zur Abschätzung einer eventuellen *Screening*-Tauglichkeit ist es nötig, spezielle *Assay*-Attribute wie Sensitivität, Spezifität, Durchsatz, Informationsgehalt, Robustheit, Flexibilität, Kosten und physiologische Relevanz zu bestimmen und zu vergleichen. Tab. 1-1 zeigt, dass die verschiedenen Systeme aufgrund unterschiedlichster Einschränkungen nur begrenzt für ein pharmazeutisches Hochdurchsatz-Wirkstoffscreening geeignet sind. So stellt die Patch-Clamp-Technologie, der Gold-Standard der elektrophysiologischen Methoden, zwar eine äußerst präzise Methodik mit Ergebnissen hohen Informationsgehalts und hoher physiologischer Relevanz dar, jedoch ist der Durchsatz extrem gering und die Anwendung bedarf sehr gut geschulten Personals, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Durch den großen apparativen Aufwand sind außerdem die Kosten sehr hoch [Southan & Clark, 2009]. Für das Screening eignen sich besser Fluoreszenz- oder radioaktiv-basierte Systeme. Mit diesen lassen sich in entsprechend automatisierten Systemen sehr hohe Durchsätze bei moderaten Kosten (10-30 US Cent pro Datenpunkt) erzielen, wobei es allerdings sehr schwierig ist, die *Assays* hinreichend robust gegen exogene Einflüsse zu gestalten.

Tab. 1-1: Vergleich von Membrantransport-Assay-Methoden. [Gonzalez et al., 1999; Lachnit & Costantin, 2002; Gill et al., 2003; Zheng et al., 2004; Dunlop et al., 2008; Southan & Clark, 2009].

Method	Durchsatz	Vorteile	Nachteile
TEVC	sehr gering	Hohe Expressionsraten Große Zellen	Geringe Sensitivität Variable Oozytenqualität Hohe Kosten
Patch-Clamp	sehr gering	Informationsgehalt Physiologische Relevanz Flexibilität Sensitivität	Hochqualifiziertes Personal Hohe Kosten geringe Sensitivität bei langsamen Transportern
Automatisiertes Patch-Clamp	gering-MTS ¹	s.o. deutlich höherer Durchsatz	s.o. optimierte Zellkultur geringe Reproduzierbarkeit
Fluoreszenz	HTS ²	Einfaches Assay-Design Geringe Kosten	Farbstoff-Substanz WW ³ Farbstoff-Zell WW Viele Falsch-Positive und Falsch-Negative Farbstoffverlust
Flux (AAS)	MTS	Spezifität Geringe Kosten	rel. geringe Sensitivität geringe Robustheit
Flux (radioaktiv)	MTS	Robustheit Sensitivität Geringe Kosten	Zeitauflösung Informationsgehalt niedrig nicht generisch
Bindungs-Assays	HTS	Durchsatz Geringe Kosten	Viele Falsch-Positive und Falsch-Negative nicht generisch

Vor allem Farbstoff-Substanz-Interaktionen und Farbstoffbeeinflussung durch zelluläre Bestandteile generieren große Artefakte und führen so zu einer hohen Falsch-Positiven-Rate bei Fluoreszenz-Assays. Monitoring-Methoden für Chlorid sind durch den Umstand limitiert, dass bei physiologischem Membranpotential nur geringe Chloridströme existieren und daher sehr sensitive Farbstoffe zur Detektion nötig sind [Bregestovski et al., 2009]. Radioaktiv-Messungen haben zusätzlich den Nachteil der radioaktiven Komponenten, die eines großen technischen Aufwands bedürfen, um die Messungen ausreichend sicher durchführen zu können. Außerdem müssen für jedes zu untersuchende Ion entsprechende Isotope vorhanden sein. Ein großes Potential wird in automatisierten Patch-Clamp-Systemen gesehen und hier

¹ MTS: Medium Throughput Screening

² HTS: High Throughput Screening

³ WW: Wechselwirkungen

vor allem in den „planaren Patch-Clamp-Systemen“, die ohne klassische Mikroelektroden auskommen [Lachnit & Costantin, 2002; Brüggemann *et al.*, 2006; Dunlop *et al.*, 2008]. Mit diesen Systemen lassen sich deutlich höhere Durchsätze als beim manuellen Patch-Clamp bei gleichem Informationsgehalt erreichen. Allerdings benötigen diese Systeme eine sorgfältig optimierte Zellkultur, HTS-Daten sind nur bedingt reproduzierbar und die Kosten pro Datenpunkt relativ hoch [Zheng *et al.*, 2004]. Bindungs-*Assays* bieten zwar einen hohen Durchsatz bei moderaten Kosten, jedoch liefern diese Systeme keine Informationen über die funktionale Wirkung der getesteten Substanzen [Gonzalez *et al.*, 1999].

Die SURFE²R-Technologie (Iongate Biosciences GmbH, Frankfurt) stellt eine weitere Methode für die funktionelle Untersuchung von Membranproteinen dar [Geibel *et al.*, 2001]. Diese Methode basiert auf der SSM-Technik (*solid supported membrane*) [Pintschovius & Fendler, 1999; Schulz *et al.*, 2008]. Dabei werden Membranen auf einer Goldelektrode adsorbiert. Über die kapazitiv gekoppelte Elektrode können dann Transportprozesse von Ionen als Strom detektiert werden. Somit liefert die Methode einen direkten Nachweis für die Proteinaktivität.

Die Sensitivität der Technologie ermöglicht es, sowohl langsame Transporter als auch Ionenkanäle zu untersuchen. Die Methode kommt außerdem ohne kontinuierliche Zellkultur aus, da das benötigte Membranmaterial *batch*-weise präpariert und gelagert werden kann und so auch große Versuchskampagnen mit einheitlichem Ausgangsmaterial durchzuführen sind. Während klassische elektrophysiologische Methoden auf die Expression des Zielproteins in der Plasmamembran angewiesen sind, können mit Hilfe der SSM-Technik auch intrazelluläre Transporter untersucht werden. Weiterhin ist die Charakterisierung bakterieller Transporter (rekonstituiert in Liposomen oder in nativen Membranen) möglich.

Im Gegensatz zu klassischen elektrophysiologischen Methoden kann der Ladungstransport an der SSM nicht über eine extern angelegte Spannung kontrolliert werden. Stattdessen erfolgt die Transportaktivierung über einen schnellen Lösungswechsel substrathaltiger Puffer.

Bisher konnte die SSM-Technik bereits erfolgreich zur Untersuchung primär und sekundär aktiver Transporter wie der Na⁺/K⁺-ATPase [Pintschovius & Fendler, 1999; Pintschovius *et al.*, 1999], der Ca²⁺-ATPase [Bartolommei *et al.*, 2004; Tadini Buoninsegni *et al.*, 2004], des ADP/ATP Carriers [Gropp *et al.*, 1999], der F₀/F₁-ATPase [Burzik *et al.*, 2003], des Prolin-Transporters PutP [Zhou *et al.*, 2004], des Glutamat-Transporters EAAC1 [Krause *et al.*, 2009], des Na⁺/H⁺-Antiporters NhaA [Zuber *et al.*, 2005], des Zuckertransporters LacY [Garcia-Celma *et al.*, 2009] und kürzlich auch erstmals zur Charakterisierung von ligandengesteuerten Ionenkanälen (P2X₂, nAChR) [Schulz *et al.*, 2009] eingesetzt werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Chloridkanäle und -transporter sind an wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt [Jentsch *et al.*, 2002; Zifarelli & Pusch, 2007; Jentsch, 2008] und mutationsbedingte Funktionsdefekte können mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht werden [Planells-Cases & Jentsch, 2009]. Trotz der großen physiologischen Relevanz bilden diese Proteine eine unterrepräsentierte Klasse in der pharmakologischen Wirkstoffsuche [Verkman & Galietta, 2009], auch aufgrund fehlender adäquat robuster und durchsatzstarker Testsysteme. Vor allem die Vertreter der intrazellulären CLC-Proteine, von denen bereits zwei eindeutig relevanten Krankheiten zugeordnet werden konnten (CLC-5 – Dent'sche Krankheit; CLC-7 – Osteopetrose), entziehen sich aufgrund ihrer vesikulären Lokalisation den klassischen elektrophysiologischen Methoden.

Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Arbeit auf der funktionellen Charakterisierung des lysosomalen potentiellen Cl^-/H^+ -Antiporters CLC-7 mit Hilfe der SSM-Technik. Dafür sollte dieser als Wildtyp und in Form einer physiologisch wichtigen, der Osteopetrose zuzuordnenden Mutante (G215R) zusammen mit seiner β -Untereinheit Ostm1 heterolog in CHO Zellen exprimiert werden. Neben der klassischen biophysikalischen Charakterisierung war außerdem die Etablierung eines Screening-tauglichen *Assays* von Interesse, der es ermöglicht, potentielle CLC-7 Inhibitoren für den Einsatz in der Osteoporosetherapie zu identifizieren.

Zwei weitere Projekte galten der methodischen Entwicklung zur Optimierung der Sensitivität und Flexibilität der SSM-Technik. Da die SSM-Technik in dieser Form bisher ausschließlich zur Charakterisierung primär und sekundär aktiver Transporter genutzt wurde (vgl. Kap. 1.4 und [Schulz *et al.*, 2008; Ganea & Fendler, 2009]), sollte in einem ersten Schritt die Eignung der Technologie zur Untersuchung von ligandengesteuerten Ionenkanälen anhand des gut charakterisierten ATP-abhängigen P2X_2 -Rezeptors bestimmt werden.

Die fehlende Spannungskontrolle bei der SSM-Technik erschwert jedoch die Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten zu klassischen elektrophysiologischen Methoden bzw. verhindert die Charakterisierung spannungsaktivierter Ionenkanäle (z.B. Na_v). Daher sollte in einem weiteren Projekt die Möglichkeit untersucht werden, mit Hilfe der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin eine Licht-gesteuerte Spannungskontrolle an der SSM zu etablieren.

2 Material & Methoden

Chemikalien wurden, soweit nicht abweichend beschrieben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Enzyme und Nukleinsäuren waren von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Lipide von AVANTI Polar Lipid Inc. (USA). Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Zellkulturflaschen T ₂₅ , T ₇₅ , T ₁₇₅	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Petrischalen f. Zellkultur P ₇₅ , P ₁₇₅	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
6, 12, 24, 48, 96-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmal-Injektionsspritzen 1 ml - 50 ml	Braun AG, Melsungen
Pipettenspitzen 1 - 10 µl, 10 - 200 µl, 10 - 300 µl,	Eppendorf AG, Hamburg
200 - 1000 µl, 1000 - 2500 µl	
Combitips 0,1, - 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten steril 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilfilter	Pall Filtersysteme GmbH, Crailsheim
Puffergefäße (Casy Cups)	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Biosensoren	Iongate Biosciences GmbH, Frankfurt

2.1.2 Antikörper

anti-GFP (rabbit)	632376	Clontech, Heidelberg
anti-LAMP-1 (rabbit)	ab24170	Abcam, Cambridge, UK
anti-Calnexin (rabbit)	SPA-865D	Biomol, Hamburg
anti-mOstm1 (rabbit)		T. Jentsch, Berlin
anti-rabbit-AP (goat)	170-6518	Bio-Rad, München
anti-rabbit-HRP (goat)	P0448	Dako, Hamburg

2.1.3 Zelllinien & Bakterienstämme

2.1.3.1 Zelllinien

CHO-K1	CCL-61 TM	ATCC-LGG, Wesel
HEK-293	CRL-1573 TM	
Flp-In TM -CHO	R758-07	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T-REx TM -293	R710-07	

2.1.3.2 Bakterienstämme

Folgende *E. coli* Derivate wurden zur Plasmid Replikation bzw. Protein Expression verwendet:

XL1-Blue Supercompetent	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)] [Bullock <i>et al.</i> , 1987].
DH5α	F ⁻ <i>φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 λ⁻ hsdR12(r_K⁻,m_K⁺) supE44 thi-1 gyrA relA1</i> [Hanahan, 1983].
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F' <i>dcm hsdS</i> (r _B m _B ⁻) <i>gal lon ompT λ(DE3)</i>

Alle verwendeten Stämme wurden von Stratagene (La Jolla, CA, USA) bezogen.

2.1.4 Puffer & Medien

D-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ham's F-12	PAA GmbH, Cölbe
Accutase	
D-PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM MgCl ₂ , 0,9 mM CaCl ₂ , 8,0 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5
TB-Medium	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml/l Glycerin, 2,13 g/l KH ₂ PO ₄ , 12,54 g/l K ₂ HPO ₄
SOC-Medium	20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 500 mg/l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose, pH 7,0 mit NaOH
TAE 20x	800 mM TRIS, 200 mM Na-Acetat, 20 mM Na-EDTA, pH 7,8 mit Essigsäure

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Transformationskompetente Bakterien wurden entweder direkt von Stratagene bezogen (*XLI-Blue Supercompetent*) oder nach der Methode von Hanahan *et al.* (1983) hergestellt. Die kompetenten Bakterien wurden zu je 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte nach dem Hitzeschockverfahren.

- 50 µl der Bakteriensuspension (frisch aufgetaut) mit ca. 1-50 ng DNA (Plasmid, Ligationsansatz etc.) versetzen und für 10 Minuten auf Eis inkubieren
- Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad
- Inkubation für 2 Minuten auf Eis
- Zugabe von 500 µl SOC Medium (vorgewärmt auf 42°C)
- Inkubation bei 37°C für 30-60 Minuten im Thermoblock (mit Schütteln)
- Ausstreichen von 100-200 µl der Suspension auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin) und Inkubation über Nacht bei 37°C

2.2.3 Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien

- Antibiotikaresistente Klone mit sterilem Zahnstocher oder Impföse von LB-Platte aufnehmen und damit Flüssigkultur (2 ml, 50 ml LB+Antibiotika) animpfen
- über Nacht bei 37°C im Schüttler vermehren
- Zellen in Tischzentrifuge (3.000 x g) pelletieren und bei -20°C bis zur DNA Präparation aufbewahren
- Zur Langzeitkonservierung transfizierter Bakterien eine Suspension aus 50% Übernacht-Kultur und 50% Glycerol herstellen,
- im flüssigen Stickstoff schock gefrieren und bei -80°C lagern.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte für 2 ml Kulturen (Miniprep) mit dem *QIAprep*[®] *Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen (Hilden), für 50 ml Kulturen (Midiprep) mit dem *Jetstar 2 Midi Prep Kit* der Firma Genomed (Löhne) nach Herstellerangaben.

2.2.5 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von Plasmidvektoren mit Restriktionsendonukleasen wurde nach den Vorgaben von NEB (Schwalbach) durchgeführt:

- 1-5 µg Plasmidvektor
- 10-20 Units Restriktionsendonukleasen
- 5 µl Reaktionspuffer (10x), entsprechend der eingesetzten Enzyme
- 0,5 µl BSA (100x), sofern benötigt
- Mit H₂O auf 50 µl Gesamtvolumen

Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C im Thermoblock (Schutron, Emersacker) für 1-2 Stunden inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen auf 60°C für 20 Minuten gestoppt. Wenn bei einem Doppelverdau zwei Restriktionsenzyme gleichzeitig zum Einsatz kamen, wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität aufwiesen.

Zur Verhinderung der Religation des Vektors konnte im Anschluss an die Restriktion eine Inkubation des Ansatzes mit 1 Unit alkalischer Phosphatase (CIAP⁴, Invitrogen) für 30 Minuten bei 37°C erfolgen.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit der T4-DNA-Ligase (Invitrogen) nach Herstellerangaben ligiert. Einsatz von 20-50 ng Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µL. Das molare Verhältnis von Vektor zu einzufügendem DNA-Fragment wurde auf 1:3 eingestellt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde oder 18°C über Nacht.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese der Nukleinsäuren

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 10 V/cm in Flachbettgelkammern (Biometra, Göttingen) mit TAE als Laufpuffer. Zur Herstellung von 1%igen Agarosegelen wurden 0,5 g Agarose in TAE Puffer gelöst (Mikrowelle) und anschließend 1,0 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Die Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer (Fermentas) versetzt und mit einem Größenstandard (Massruler, Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Die Analyse des Gels erfolgte auf einem UV-Transilluminator (312 nm), zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert (UV-Solo, Biometra).

2.2.8 Reinigung von DNA

Die Reinigung der DNA aus PCR-Ansätzen und die Isolation von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben.

⁴ CIAP: *calf intestine alkaline phosphatase*

2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}), dem Absorptionsmaximum von DNA (Nanodrop, PEQLAB, Erlangen). Eine Absorption von $A_{260} = 1$ entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml (für doppelsträngige DNA). Somit konnte die Konzentration der untersuchten Probe mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden. Zur Beurteilung der Reinheit wurde der Quotient von A_{260}/A_{280} (Absorption von Proteinen) ermittelt, der im Bereich von 1,8-2,0 liegen sollte.

2.2.10 Rekombinante Polymerasekettenreaktion

Die Einfügung von Punktmutationen erfolgte mittels rekombinanter Polymerasekettenreaktion (PCR) in die entsprechenden DNA Abschnitte. Dabei wurde nach Herstelleranleitung des *QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verfahren.

Es wurden komplementäre Primer entworfen, die ca. 25-45 Basen lang waren, in ihrer Mitte die gewünschte Mutation trugen und eine Schmelztemperatur (T_m) von mindestens 78°C aufwiesen.

$$T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{675}{N} - \%Diskrepanz \quad (N = \text{Länge des Primers in Basen})$$

In der folgenden PCR Reaktion (T-Gradient, Biometra) kam die *PfuTurbo DNA polymerase* zum Einsatz:

- 95°C/30 s
 - 95°C/30 s
 - 55°C/1 min
 - 68°C/X min
 - 68°C/10 min
 - 4°C
- } 16 Zyklen
- X = 1 min / 1 kb zu amplifizierender Vektor-DNA

Tab. 2-1: Verwendete Primer zum Einfügen von Punktmutationen in rCIC-7 und (S65T)-GFP.

Mutation	Primer-Sequenz
rCIC-7 G213R sense	5' - CAG ATC AAG TGC TTC CTC AAT <u>A</u> GG GTG AAG ATC CCC CAG GTG GTG - 3'
rCIC-7 G213R anti	5' - CAC CAC GTG GGG GAT CTT CAC <u>C</u> CT ATT GAG GAA GCA CTT GAT CTG - 3'
GFP → EGFP sense	5' - CCA ACA CTT GTC ACT ACT <u>C</u> TC ACT TAT GGT GTT CAA TGC - 3'
GFP → EGFP anti	5' - GCA TTG AAC ACC ATA AGT <u>G</u> AG AGT AGT GAC AAG TGT TGG - 3'

2.2.11 DNA-Sequenzierung & Datenanalyse

Die Sequenzierung der modifizierten Vektoren erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Die Organisation und Analyse der Daten (Alignment etc.) wurde mit der Software Vector NTI (Invitrogen) durchgeführt.

2.2.12 Verwendete Plasmidvektoren

pEGFP-N3	(Clontech) In die MCS ⁵ klonierte Gene werden unter Kontrolle des CMV ⁶ Promotors als C-terminales Fusionsprotein mit EGFP exprimiert.
pFROG	Ein Derivat von pcDNA 3.1 (Invitrogen). Enthält die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des β -Globingens von <i>Xenopus laevis</i> zur Expression in <i>Xenopus</i> Oozyten.
pcDNA5/FRT/TO [©]	(Invitrogen) Expressionsvektor des Flp-In [™] T-REx [™] Systems. Enthält hybriden CMV/TetO ₂ Promotor zur Tetracyclin regulierten Expression.
pOG44	(Invitrogen) Exprimiert die Flp-Rekombinase unter Kontrolle des humanen CMV Promotors [O'Gorman <i>et al.</i> , 1991].
pET-28b	(Novagen) Bakterieller Expressionsvektor (CIC-ec1). Proteinexpression mit N- bzw. C-terminalem His-Tag unter Kontrolle des T7 Promotors. Enthält Kanamycin Resistenz.

⁵ MCS: *Multiple Cloning Site*

⁶ CMV: Zytomegalie-Virus

2.3 Zellkulturtechnik

Um Sterilität zu gewährleisten und den Befall von Zellkulturen mit Mikroorganismen zu verhindern, wurden sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen unter einer sterilen Werkbank mit sterilisierten Arbeitsmaterialien (121°C, 15 min) durchgeführt. Die Oberflächendesinfektion erfolgte mit 80% Ethanol.

2.3.1 Kulturmedien & Kultivierungsbedingungen

Zur optimalen Proliferation wurden die benutzten Zelllinien gemäß der ATCC⁷-Vorgaben in speziellen Wachstumsmedien in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Tab. 2-2: Optimale Kultivierungsbedingungen für eukaryotische Zelllinien.

Zelllinie	Kultivierungsmedium	Zusätze
HEK-293 ⁸	D-MEM	10% FCS ⁹ , 1% Pen/Strep ¹⁰
CHO-K1 ¹¹	Ham's F-12	10% FCS, 1% Pen/Strep

2.3.2 Passagieren von Zellen

Zur Erhaltung einer kontinuierlichen Proliferationsrate wurden die adhärent wachsenden Zellen alle drei bis vier Tage nach folgendem Schema passagiert:

- Zellen kultivieren, bis Konfluenz von 80-90% erreicht ist
- Medium absaugen
- Zellen mit ca. 5 ml PBS waschen
- PBS absaugen
- Zugabe von Accutase: T₂₅: 0,5 ml, T₇₅: 1,0 ml, T₁₇₅/P₁₇₅: 2,0 ml
- Inkubation bei 37°C für ca. 5 Minuten
- Zellen durch mechanische Erschütterung vereinzeln
- Inaktivierung der Accutase durch Zugabe von 4,5 ml (T₂₅) Medium
- Vereinzeln von Zellaggregaten durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren
- Überführung der Zellen in neue Zellkultur-Flasche/Platte (Verdünnung je nach Zelllinie und Wachstumsdauer)

⁷ ATCC: *American Type Culture Collection*

⁸ HEK-293: *human embryo kidney*

⁹ FCS: Fätales Kälber Serum (hitzeinaktiviert), Gibco

¹⁰ Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin, Gibco

¹¹ CHO-K1: *chinese hamster ovarian*

2.3.3 Einfrieren von Zellen

CHO-K1 und HEK-293 Zelllinien wurden zur Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert. Als Frostschutzmittel wurde dem Einfriermedium DMSO zugesetzt und nach folgendem Protokoll verfahren:

Vorbereitung:

- Einfriermedium: 80% FCS, 20% DMSO (auf Eis)
- Kryoröhrchen beschriften und im Gefrierschrank vorkühlen

Durchführung:

- Zellen in T₁₇₅ Flasche kultivieren bis eine Konfluenz von 70-80% erreicht ist
- Medium absaugen, Zellen mit 10 ml PBS waschen
- Zellen mit Hilfe von 2 ml Accutase ablösen und in 8 ml Medium aufnehmen
- Zellen in 15 ml Greiner-Röhrchen überführen
- Zellen bei 300 x g (4°C) pelletieren, Medium absaugen
- Zellen in 3,5 ml Wachstumsmedium ohne Selektionsantibiotika resuspendieren
- 3,5 ml vorgekühltes Einfriermedium zugeben
- Zellsuspension zügig in 7 Kryoröhrchen (je 1,0 ml) überführen
- Kryos über Nacht bei -80°C in Einfrierhilfe langsam einfrieren
- Kryos in flüssigen Stickstoff überführen
- Auftaukontrolle durchführen

2.3.4 Auftauen von Zellen

- 5 ml vorgewärmtes Wachstumsmedium (Wasserbad 37°C) ohne Selektionsantibiotika in T₂₅ Flasche vorlegen
- Kryoröhrchen aus Stickstoff entnehmen und zügig bei 37°C im Wasserbad auftauen
- Sobald nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden ist, Röhrchen mit 80% Ethanol desinfizieren
- Zellsuspension tropfenweise in vorbereitete Wachstumsflasche überführen
- Zellen über Nacht im Brutschrank adhären lassen
- Nach ca. 12 Stunden Medium wechseln, um DMSO Rückstände zu entfernen
- Selektionsantibiotika zugeben

2.3.5 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Zur Vorbereitung der Zählkammer wurde ein Deckglas derart aufgeschoben, dass Newton'sche Farbringe an den Kontaktflächen erkennbar waren und somit der Abstand zwischen Kammer und Deckglas zu vernachlässigen war. Zur Beladung der Kammer wurden ca. 20 µl der zu zählenden homogen resuspendierten Suspension so an die Grenzfläche Zählkammer/Deckglas pipettiert, dass die Suspension durch die Kapillarwirkung unter das Deckglas gesaugt wurde. Unter einem Lichtmikroskop konnten anschließend die Zellen gezählt werden (Vergrößerungsfaktor 5).

Es wurden die vier rot markierten Großquadrate (Abb. 2-1) ausgezählt, wobei zu beachten war, dass die Zellen, die sich auf den Quadratgrenzen befinden, nur auf zwei Begrenzungslinien mitgezählt werden durften. Die Zellzahl pro µl Suspension (Z) berechnet sich aus:

$$Z = \frac{n}{Q} \times V \times K \quad (/µl)$$

mit: Z = Zellzahl
 n = gezählte Zellen
 Q = gezählte Großquadrate
 V = Verdünnung
 K = Kammerfaktor (=10)

Der Kammerfaktor von 10 ergibt sich aus einer Grundfläche von 1 mm² pro Großquadrat und einer Tiefe von 0,1 mm, was ein Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat bedeutet [Lindl & Bauer, 1989].

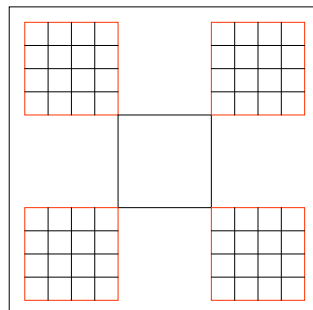


Abb. 2-1: Neubauer Zählkammer. Auszählende Großquadrate (rot) sind wiederum in 16 Kleinquadrate unterteilt. Der Kammerfaktor beträgt 10 [Lindl & Bauer, 1989].

2.3.6 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von Zellen wurde das Effectene[®] Transfection Reagent (Qiagen, Hilden) benutzt. Die Durchführung erfolgte nach entsprechender Anleitung (Effectene[®] Transfection Reagent Handbook, 2002). Eine optimale Transfektionseffizienz für CHO-K1 und HEK-293 Zellen wurde mit folgenden Parametern erreicht:

Vorbereitung:

- Mindestens 24 h vor Transfektion: Aussaat der Zellen in 6-Well Platten
- Transfektion bei einer Konfluenz von ca. 50%
- Medium absaugen
- Zellen mit 2 ml PBS waschen, PBS absaugen
- Zugabe von 1,6 ml Wachstumsmedium ohne Selektionsantibiotika (mit FCS)

Transfektion:

- 0,5 µg DNA + 4 µl Enhancer + 95,5 µl CE Puffer
- Vortexen
- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Zugabe von 12,5 µl Effectene Reagent
- Vortexen
- 8 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Zugabe von 500 µl Medium, durch Auf- und Abpipettieren mischen
- Tropfenweise Zugabe zu Zellen
- Mediumswechsel nach ca. 12 h, um Transfektionsreagenzien zu entfernen

2.3.7 Generierung stabiler Zelllinien

Zur Generierung von stabil exprimierenden Zelllinien mit Hilfe von klassischen Expressionsvektoren (pcDNA 3.1, pFROG, pEGFP) wurden CHO-K1 bzw. HEK-293 Zellen wie in Kap. 2.3.6 beschrieben transfiziert. Wenn die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion eine Konfluenz von 60-70% noch nicht überschritten hatten, wurde dem Wachstumsmedium eine entsprechende Konzentration an Selektionsantibiotika zugesetzt (vgl. Kap. 2.3.7.1). War eine Konfluenz von 70% überschritten, wurden die Zellen vor Antibiotikazugabe nochmals verdünnt passagiert. Es erfolgte ein Wechsel des Mediums unter Zugabe frischer Antibiotika alle drei Tage für mindestens 10-14 Tage. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zelllinien auf Genexpression (Fluoreszenz bei EGFP-Marker, sonst Western Blot) überprüft, expandiert und möglichst bald zur Erhaltung kryo-konserviert (vgl. Kap. 2.3.3).

2.3.7.1 Bestimmung optimaler Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion

Zur Bestimmung der optimalen Selektionskonzentration verschiedener Antibiotika wurden konzentrationsabhängige Tötungskurven erstellt. Dazu wurden die Zellen in identischer Konzentration in 6-Well Platten so ausgesät, dass eine Konfluenz ohne Zugabe von Antibiotika nach ca. 7 Tagen zu erwarten war. 12 Stunden nach Aussaat erfolgte ein Mediumswechsel unter Zugabe ansteigender Antibiotika Konzentrationen. Zur Entfernung abgelöster und toter Zellen aus der Kultur wurde der Mediumswechsel alle drei Tage wiederholt. Nach 14 Tagen wurden die verbliebenen Zellen aus den Wells abgelöst und die Zellzahl bestimmt (vgl. Kap. 2.3.5). Die niedrigste Konzentration, bei der nach 14 tägiger Inkubation keine Zellen mehr überlebten, wurde als optimale Antibiotika-Konzentration zur Selektion bestimmt.

Tab. 2-3: Optimale Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion von stabilen Zelllinien.

Zelllinie	Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
CHO-K1	Neomycin (G418)	1.000
HEK-293	Neomycin (G418)	500
Flp-In™ CHO	Neomycin (G418)	500
	Zeocin	100
	Blasticidin	10
	Hygromycin B	600

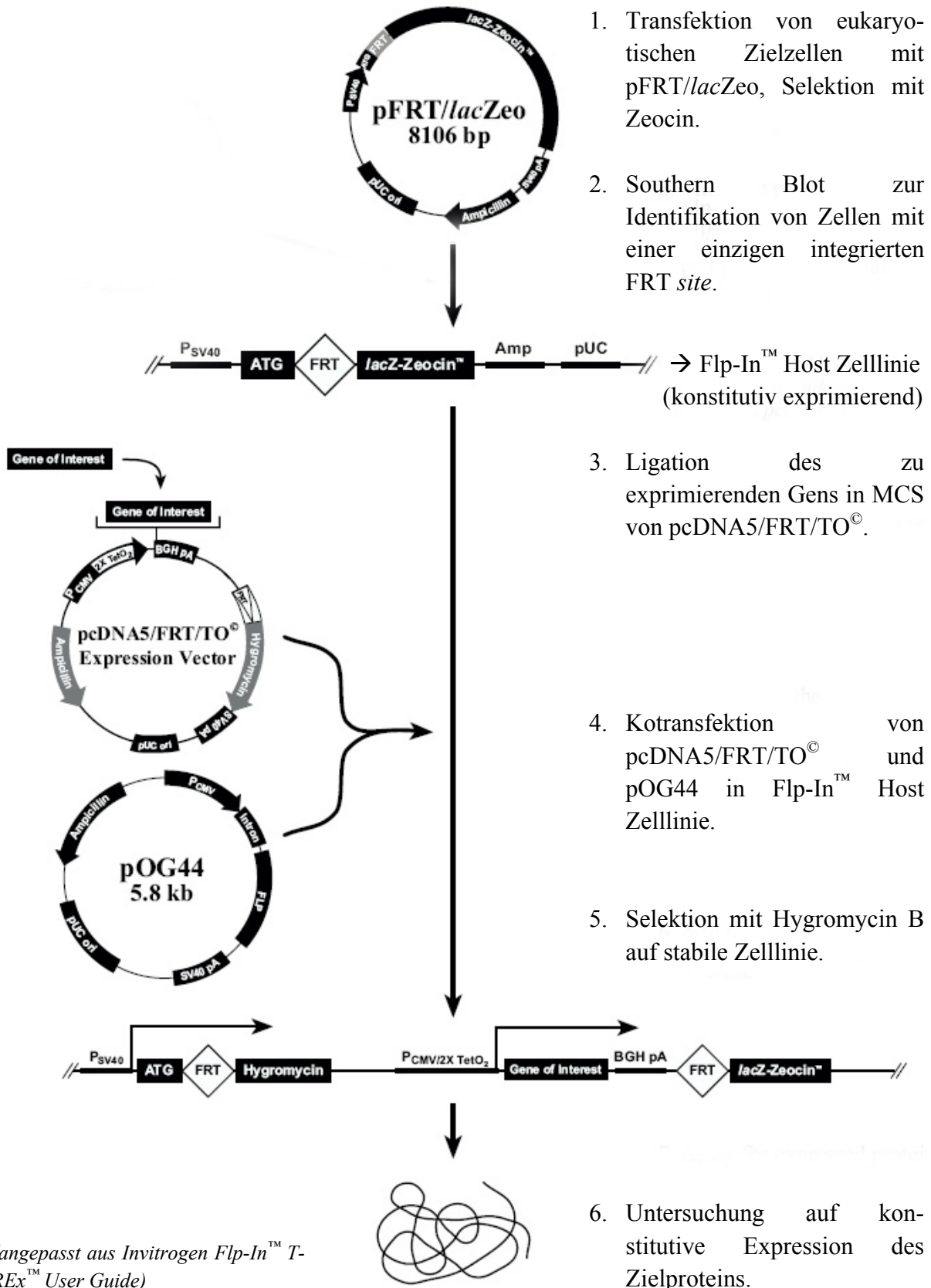
2.3.7.2 Isolation von Einzelklonen

Zur Isolation von Einzelklonen aus einer stabilen Misch-Zelllinie wurde die Vereinzelmethode in 96-Well Platten genutzt:

- Stabile Zelllinie wie in Kap. 2.3.7 beschrieben generieren
- Zellen ablösen und zählen
- Zellzahl in Wachstumsmedium mit Selektionsantibiotika durch mehrfache serielle Verdünnung auf eine Konzentration von einer Zelle / 100 μl Medium einstellen
- 100 μl / Well der Zellsuspension in eine 96-Well Platte zügig aussäen, dabei die Suspension regelmäßig mischen, um Zellsedimentation zu vermeiden
- Platte für 4-7 Tage inkubieren (37°C, 5% CO₂)
- Im Lichtmikroskop bei geringer Vergrößerung (5x) Einzelklone identifizieren
- Einzelklone (Wells, in denen sich mehr als eine Kolonie gebildet hat, wurden verworfen) expandieren und auf Expression des Zielproteins untersuchen

2.4 Das Flp-In™ T-REx™ System

Die Generierung von konstitutiv stabil exprimierenden Zelllinien mit dem Flp-In™ T-REx™ System (Invitrogen) erfolgte nach Herstelleranleitung:



(angepasst aus Invitrogen Flp-In™ T-REx™ User Guide)

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Proteinpräparation aus adhärenen Zellkulturen

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden Zellen in T₁₇₅ Flaschen bis zur Konfluenz kultiviert, mit Accutase abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und wieder pelletiert (5 min, 500 x g). Die Zellen wurden im Anschluss mit ca. 500 µl RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich) für 5 Minuten auf Eis lysiert. Nach sorgfältigem Vortexen erfolgte die Klärung des Lysats durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 8.000 x g (4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Gesamtproteinkonzentration bestimmt (vgl. Kap. 2.6.3) und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Separation von Proteinen erfolgte nach ihrer Molmasse nach der Methode von Laemmli [Laemmli, 1970]. Proteinlösungen (15-30 µg) wurden in LDS-Probenpuffer (Invitrogen) aufgenommen und für ca. 30 Minuten auf 50°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in NuPage[®] Minigelkammern (Invitrogen) mit 4-12%igen BIS-TRIS Gradientengelen bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 15-30 mA. Zur Größenabschätzung wurde ein gefärbter Proteingewichtsstandard (PageRuler, Fermentas) mit aufgetrennt.

2.5.3 Western Blot

Der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf Nitrocellulosemembranen erfolgte mittels iBlot[®]-System (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

Die Membranen wurden im Anschluss für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in Blocklösung (5% Magermilch in PBS + 0,05% Tween[®] 20) inkubiert.

Die Inkubation des Primäantikörpers (1:100 – 1:1.000) erfolgte über Nacht bei 4°C.

Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit AP¹²- oder HRP¹³-gekoppelten Sekundäantikörpern (1:3.000) für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur.

Ungebundene Antikörper wurden im Anschluss durch erneutes Waschen mit PBS-T (3 x 10 min) entfernt. Die Detektion des AP-gekoppelten Sekundäantikörpers erfolgte mittels AP Developer Kit (Bio-Rad) nach Herstellerangaben (5 min bis mehrere Stunden).

HRP-gekoppelte Antikörper (zur Detektion von mOstm1) wurden mittels SuperSignal[®] West Pico (Pierce, Epsom, UK) detektiert, auf Film (BioMax, Kodak, Stuttgart) entwickelt (CURIX 60, AGFA, Köln) und mittels Flachbettscanner (CanoScan LiDE 25, Canon, Krefeld) digitalisiert.

¹² AP: Alkalische Phosphatase

¹³ HRP: *Horseradish peroxidase*

2.6 Präparation von Membranen aus CHO und HEK-293 Zellen

2.6.1 Zellaufschluss

CHO oder HEK-293 Zellen wurden in 175 cm² Schalen kultiviert (20-30 Stk. für ca. 1 g Zellmasse), mit Accutase geerntet, zweimal mit PBS gewaschen, die Zellpellets (5 min, 500 x g, 4°C) in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -80°C bis zum Aufschluss gelagert. Der Aufschluss erfolgte in einer Parr-Bombe (Parr Instrument GmbH, Frankfurt):

- Alle Materialien vorkühlen (Parr-Bombe, Zentrifugen, Rotoren, Röhrchen) und die ganze Zeit auf Eis arbeiten
- Gefrorene Zellpellets in 20 ml Aufschlusspuffer (250 mM Sucrose, 10 mM TRIS, pH 7,5, 2 mM DTT¹⁴, mit frisch zugegebenen Proteaseinhibitoren (PMSF*, Complete**)) auftauen und Mischung in die vorgekühlte Parr-Bombe (auf Eis) geben
 - * 50 µl PMSF als gesättigte Lösung in Ethanol auf 100 ml Puffer
 - ** *Complete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), eine Tablette pro 50 ml Puffer
- Den Druck in der Parr-Bombe mit N₂ auf 70 bar einstellen, nach ca. 30 Sekunden Druck nochmal kontrollieren
- 15 Minuten auf Eis inkubieren
- Suspension über Ablauf in ein mit Parafilm verschlossenes 50 ml Greiner Röhrchen vorsichtig ablassen

2.6.2 Membranseparation mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation

- Suspension aus Kap. 2.6.1 in Greiner Röhrchen für 10 min bei 800 x g (4°C) zentrifugieren (Sigma 3-18K)
- Überstand vorsichtig abnehmen und Membranen für 30 min bei 100.000 x g (4°C) pelletieren (OptimaTM L-60, Rotor: SW 41, Beckmann Coulter, Fichtenhain)
- Pellets in 500 µl 10 mM TRIS pH 7,5 resuspendieren
- Durch Zugabe von 1,5 ml 70% Sucrose ((w/v) in 10 mM TRIS pH 7,5) auf ca. 51% Sucrose einstellen und die Probe gut durchmischen (Schaumbildung vermeiden)
- In einem Zentrifugenröhrchen die Probe mit 3 ml 45%, 3 ml 31% und 3 ml 9% Sucrose ((w/v) in 10 mM TRIS pH 7,5) vorsichtig überschichten, die Gradienten für 3 h bei 100.000 x g (4°C) zentrifugieren (SW 41)

¹⁴ DTT: Dithiothreitol

- Die Banden 9/31, 31/45 und 45/51 (% Surose) mit einer Pipette abnehmen und in ein neues Zentrifugenröhrchen (SW 41) überführen, die Suspension mit 10 ml Ruhepuffer (300 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat, 60 mM HEPES, pH 7,2) gut mischen
- Die Membranen für 30 min bei 100.000 x g (4°C, SW 41) pelletieren
- Die Pellets in 20 -200 µl Ruhepuffer (+ 10% Glycerol, 2 mM DTT, Complete) sehr gut resuspendieren (Schaumbildung vermeiden, Konzentration im Bradford ca. 2-3 mg/ml)
- Aliquots zu je 5 µl in flüssigem Stickstoff schock gefrieren und bei -80°C lagern

2.6.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford mit dem Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad) nach Herstellervorgaben.

In einer 96-Well Platte wurden 245 µl des Bradford-Reagenzes mit 5 µl Probe vermischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 562 nm im Plattenspektrometer (Lambda Fluoro, BIO-TEK Instruments, Winooski, USA) vermessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Korrelation anhand einer BSA¹⁵-Eichreihe (0,125 – 1,0 mg/ml).

2.7 Fluorometrische Methoden

2.7.1 Fluoreszenzspektroskopie

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Expression von EGFP-Fusionsproteinen und Charakterisierung der Membranfraktionen kamen fluoreszenzspektroskopische Methoden mittels Küvetten- und Plattenspektrometer zum Einsatz.

2.7.1.1 Spektralphotometer

Die qualitative Analyse der Membranfraktionen erfolgte mittels Küvetten-Fluoreszenzspektrometer (F4500, Hitachi, Fichtenhain). 50 µg Protein wurden in 50 µl Ruhepuffer (vgl. Kap. 2.6.2) homogen suspendiert und in Micro-Küvetten (Hellma, Müllheim) analysiert. Dazu wurde die Probe bei einer Wellenlänge von 460 nm angeregt und ein Fluoreszenzspektrum im Bereich von 400-700 nm aufgenommen. Um die Überlagerung des Anregungspeaks (optimale Anregung von EGFP = 488 nm) mit dem Emissionspeak (509 nm) zu vermeiden, wurde die Anregungswellenlänge um 28 nm auf 460 nm verschoben.

¹⁵ BSA: Rinderserumalbumin

2.7.1.2 Plattenfluorometer

Zur quantitativen Analyse der Membranfraktionen wurde ein Plattenfluorometer (Lambda Fluoro, BIO-TEK Instruments, Winooski, USA) genutzt. 50 µg Protein wurden in 50 µl Ruhepuffer (vgl. Kap. 2.6.2) homogen resuspendiert und in 96-Well Platten (Greiner) analysiert. Anregung der Probe mit einem 480/20 nm Bandpassfilter, Detektion der EGFP-Fluoreszenz durch einen 530/25 nm Bandpassfilter. Die Detektion erfolgte für jedes Well von unten in einem 3x3 Raster, um Inhomogenitäten der Proben zu kompensieren.

2.7.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Expression und Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen wurde mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (LSM 510, Zeiss, Jena) untersucht.

2.7.2.1 Präparation von CHO Zellen

Ca. 10.000 CHO Zellen/Well wurden in 1 ml Wachstumsmedium in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät, welche zuvor mit Zellkultur geeigneten Deckgläsern bestückt wurden. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 50-70% erreicht hatten, wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, bevor die Färbung erfolgte. Die Zellen wurden nicht fixiert oder permeabilisiert.

2.7.2.2 Färben von Zellen mit LysoTracker[®] / ER-Tracker[™]

Die Färbung der Zellkompartimente erfolgte durch Inkubation mit 50 nM LysoTracker[®] Red in PBS bzw. 1 µM ER-Tracker[™] Red (beide Invitrogen) in HBSS¹⁶ (Gibco) für 15-30 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS bzw. HBSS gewaschen und die Deckgläser mit adhärierenden Zellen auf einen Objektträger zur Mikroskopie aufgebracht.

Tab. 2-4: Übersicht der untersuchten Fluorophore. Optimale Arbeitskonzentration, Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Fluorophor	Konzentration	Excitation (nm)	Emission (nm)
LysoTracker [®] Red	50 nM	577	590
ER-Tracker [™] Red	1 µM	587	615
EGFP	-	488	509

¹⁶ HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

2.7.2.3 Mikroskopie & Bildaufnahme

Die Analyse der präparierten Zellen wurde direkt im Anschluss mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 510) durchgeführt.

Die Anregung von EGFP erfolgte bei 488 nm mit einem Argon Laser (25%), die der Tracker-Farbstoffe bei 543 nm mit einem HeNe-Laser (100%). Die Fluoreszenzemission wurde durch einen 525/25 nm Bandpass- (BP) bzw. 560 nm Longpassfilter (LP) auf unterschiedlichen Kanälen detektiert. Bei gleichzeitiger Untersuchung mehrerer Fluorophore (z.B. EGFP + LysoTracker[®] Red) erfolgte die Anregung der einzelnen Fluorophore und Detektion sequentiell im „Multi Track Mode“, um Überlagerungen der Emissionen zu vermeiden (vgl. Abb. 2-2). Der optische Spalt wurde für beide Farbstoffe einheitlich eingestellt. Die Aufnahme von 1024x1024 Pixel großen Bildern erfolgte durch ein Achroplan 63x/0.95 W Wasser-Immersion-Objektiv.

Zur Vermeidung von Photokonversionseffekten [Freundt *et al.*, 2007] wurden mit LysoTracker[®] Red gefärbte Präparate vor der Analyse keinem breitbandigem Anregungslicht ausgesetzt (z.B. Rhodamin Filtersatz, Ex: 540/25).

Die Prozessierung und Analyse der aufgenommenen Bilder erfolgte mit der Software LSM Image Browser (Zeiss).

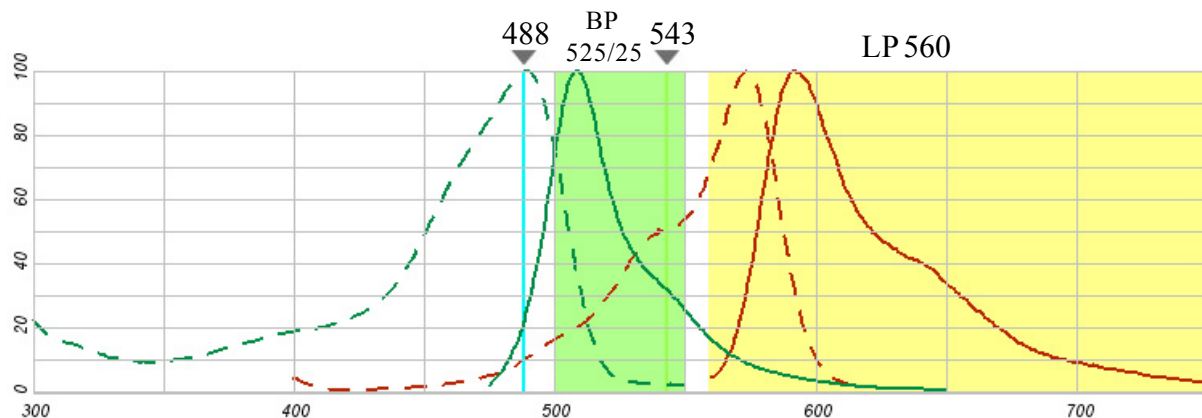


Abb. 2-2: Anregungs- und Emissionsspektrum von EGFP (grün) und LysoTracker[®] Red (rot). Excitation von EGFP erfolgt mittels Argon Laser bei 488 nm, Anregung von LysoTracker[®] Red mittels HeNe Laser bei 543 nm. Anregung erfolgte sequenziell, um spektrale Überlappungen bei der Detektion zu vermeiden (LP 560 nm, 560-650 nm = ca. 10% der EGFP Fluoreszenz). Die EGFP Fluoreszenz wurde über einen 525/25 nm Bandpass-, die LysoTracker[®] Red Fluoreszenz über einen 560 nm Longpass Filter detektiert. (angepasst von Invitrogen Fluorescence SpectraViewer)

2.8 Elektrophysiologie

Zur funktionellen Charakterisierung der zu untersuchenden Membranproteine kam in dieser Arbeit die Methode der SSM-basierten Elektrophysiologie zum Einsatz. Die Messungen wurden hauptsächlich auf dem kommerziellen System SURFE²R One der Firma Iongate Biosciences GmbH (Frankfurt) durchgeführt.

2.8.1 Solid supported membrane (SSM)

Die Methode basiert auf der Technologie der festkörperunterstützten Membran, SSM (*solid supported membrane*). Alkanthiole bilden mit Edelmetallen kovalente Bindungen aus, was zur spontanen Bildung von SAMs (*self assembled monolayers*) führt. Aus der von der Oberfläche abweisenden Anordnung der Alkanreste resultiert eine hydrophobe Schicht, auf die in einem nachfolgenden Schritt eine Schicht aus Phospholipiden aufgebracht werden kann. In Abb. 2-3 C ist der dabei entstehende Hybrid-*bilayer* aus einer Alkanthiolschicht und einer Lipidschicht dargestellt. Die Immobilisierung der SSM auf einem Glassubstrat ermöglicht die Messung in Kombination mit einem schnellen Lösungswechsel [Pintschovius & Fendler, 1999]. Auf der SSM können nun proteinhaltige Membranfragmente, Vesikel oder Proteoliposomen durch Adsorption angelagert werden, wobei es zur kapazitiven Kopplung über die Verbundmembranen kommt [Florin & Gaub, 1993; Seifert *et al.*, 1993]. Angelagerte Proteoliposomen bzw. Membranfragmente können im Ersatzschaltbild als in Reihe geschaltete RC-Glieder dargestellt werden (Abb. 2-3 A+B).

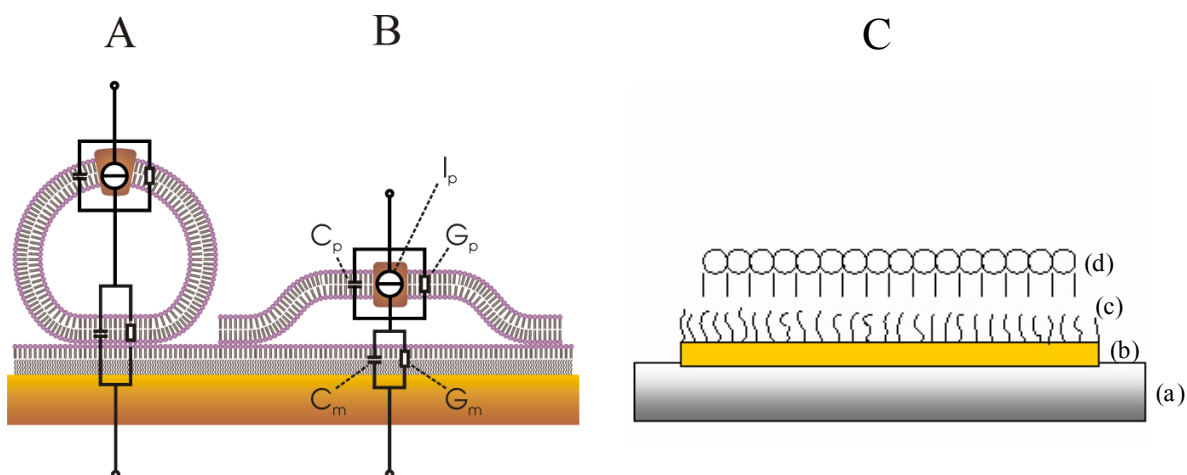


Abb. 2-3: Schematische Adsorptionsgeometrie von Proteoliposomen (A) und Membranfragmenten (B) auf der SSM. Das eingefügte Ersatzschaltbild der Verbundmembran zeigt die Reihenschaltung der beiden RC-Glieder, mit G_p und G_m als die Leitfähigkeiten der Vesikel und der SSM/Vesikel-Kontaktregion und C_p und C_m als deren Kapazitäten. I_p = Stromquelle/Transportprotein. (C) Schichtaufbau der SSM. Eine auf einem Glassubstrat (a) immobilisierte Goldschicht (b) wird durch Reaktion mit Alkanthiolen (c) hydrophobisiert (SAM). Durch die Bindung von Phospholipiden (d) entsteht ein Hybrid-bilayer.

Aufgrund der isolierenden Eigenschaft von Lipidschichten besitzt die reine SSM eine zu vernachlässigende Leitfähigkeit. Von Transportproteinen generierte Ladungsverschiebungen über die Vesikelmembran werden daher als kapazitive Ströme an der SSM detektiert.

Durch die kapazitive Kopplung werden stationäre Transportprozesse nicht auch als stationäre Ströme wiedergegeben, sondern von der SSM in transiente Ströme konvertiert, die mit der sogenannten System-Zeitkonstante abfallen, welche die Aufladung der Vesikel beschreibt [Pintschovius & Fendler, 1999].

2.8.2 SURFE²R One

Der SURFE²R One (*Surface Electrogenic Event Reader*) basiert auf der SSM-Technik und bietet einen gewissen Grad an Automatisierung, so dass auf dieser Plattform auch begrenzte pharmakologische Untersuchungen möglich sind. Der SURFE²R One besteht aus einer zentralen Mess-Einheit, die eine Messküvette mit Biosensor, ein Fluidiksystem sowie einen Messverstärker beinhaltet. Zur Automatisierung und Erhöhung des Durchsatzes kommt ein *Autosampler* zum Einsatz, der die Durchführung von Mess-Serien ermöglicht. Die Steuerung erfolgt über einen PC durch die Software SURFE²R One Control.

Im Unterschied zum klassischen SSM-Setup bietet der SURFE²R One neben der automatisierten Puffer-Verwaltung die Möglichkeit, mehrere Sensoren dezidiert vorzubereiten, die bei Bedarf schnell gewechselt werden können.

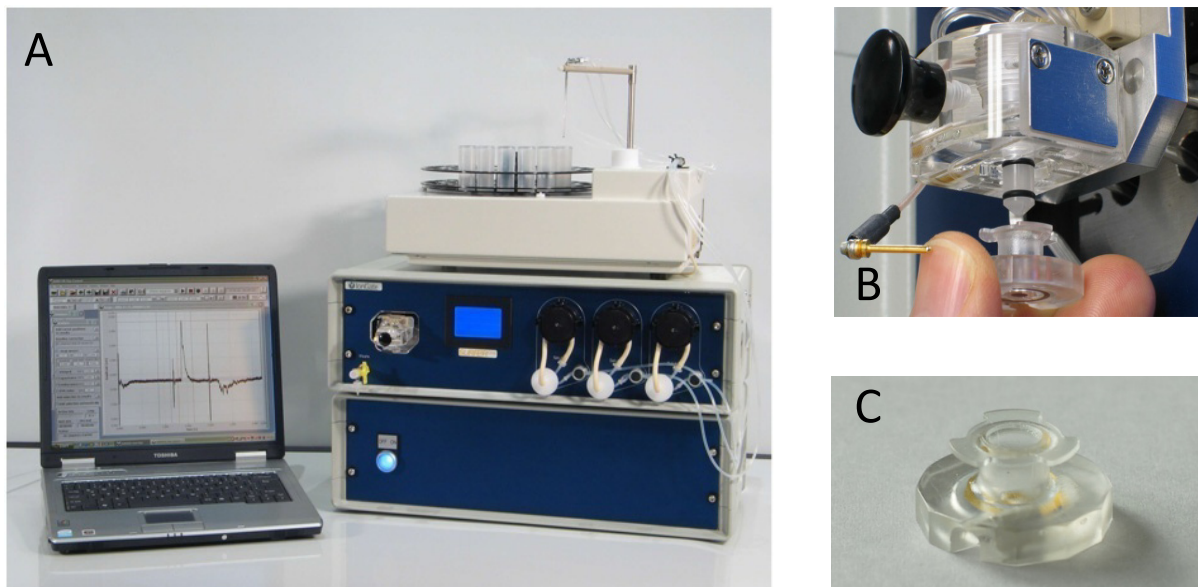


Abb. 2-4: SURFE²R One Messeinrichtung. (A) Mess-Einheit (oben), Stromversorgung mit Drucküberwachung (unten) und Autosampler. (B) Messküvette mit Kontaktstift. (C) Sensor mit Bajonettverschluss. (Iongate SURFE²R One Operator's Manual)

2.8.3 Messküvette & Fluidik

Das Kernelement des SURFE²R One ist die Messküvette, die den schnellen Wechsel von Sensoren ermöglicht. Die Küvette besteht aus Plexiglas und beherbergt Zu- und Ablaufbohrungen für den Lösungswechsel, sowie die elektrische Kontaktierung des Sensors. Dieser wird über einen Bajonettverschluss mit der Küvette verbunden. Das in Abb. 2-5 schematisch dargestellte Fluidiksystem besteht im Wesentlichen aus Puffergefäßen, Ventilen, Schlauchleitungen und der Messküvette. Die Puffergefäße werden mit einem Überdruck beaufschlagt. Ventile, die in kurzer Reihenfolge (Sekunden) nacheinander geschaltet werden können, steuern den Fluss der jeweiligen Lösung durch die Küvette. Über einen Druckregler können konstante Flussraten definiert werden. Somit wird ein schneller Lösungswechsel bei konstanten Druck- und Flussverhältnissen in der Küvette ermöglicht. Je nach Anwendung kann ein einfacher Lösungswechsel (Abb. 2-5 A) mit alternierenden nicht-aktivierenden (NA) und aktivierenden (A) Puffern oder ein doppelter Lösungswechsel (Abb. 2-5 B) mit zusätzlichem Ruhepuffer (R) realisiert werden. Bei lichtaktivierten Messungen ist weiterhin eine optische Lichtfaser zentral über dem Sensor in die Küvette integriert.

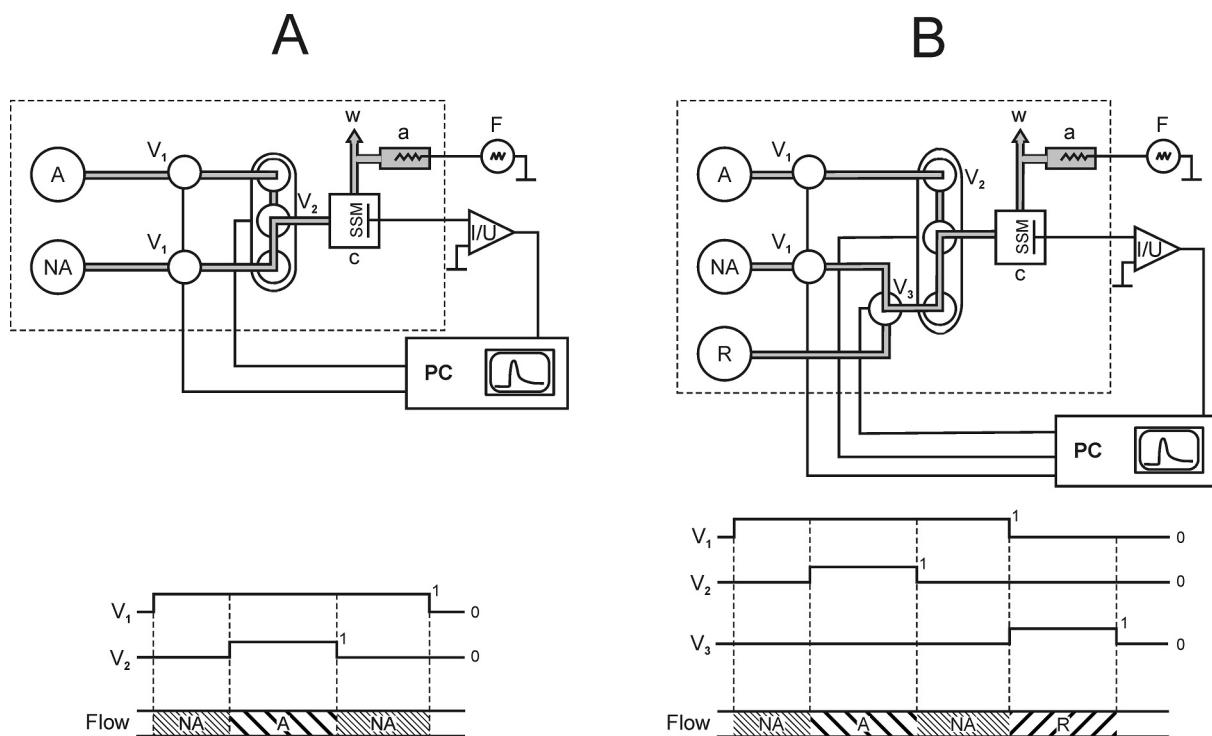


Abb. 2-5: Vereinfachtes Fluidiksystem und Fluss-Protokoll für einen einfachen (A) und einen doppelten Lösungswechsel (B). Ein doppelter Lösungswechsel ermöglicht die Etablierung eines Ionengradienten vor der Aktivierung des Transporters. Der gemessene Strom wird über einen Strom/Spannungswandler (I/U) verstärkt und von einem PC aufgezeichnet. Dieser steuert auch die Schaltung der Ventile (V_{1-3}). V_2 regelt den Fluss von nicht aktivierender (NA) und aktivierender Lösung (A) über den Sensor (SSM). Nach der Passage der Küvette (c) fließen die Lösungen in ein Abfallgefäß (w). Beim doppelten Lösungswechsel kann eine Ruhelösung (R) über ein weiteres Ventil (V_3) zugeleitet werden. Ein Funktionsgenerator (F) wird genutzt, um die elektrischen Eigenschaften des Sensors zu bestimmen.

2.8.4 Sensorpräparation

Die Sensoren (Iongate Biosciences) bestehen beim SURFE²R One aus einem runden Glassubstrat, das mit einer Goldschicht bedampft wurde. Diese Glasplatte ist in ein Kunststoffgehäuse eingeklebt, welches über der aktiven Sensorfläche eine Kavität bildet und das Gegenstück zum Bajonettverschluss an der Küvette besitzt. Außerdem ist über eine Buchse die elektrische Kontaktierung des Sensors möglich. Vor der Messung mussten die Sensoren in mehreren Schritten vorbereitet werden.

1. Mercaptanisieren

Auf den trockenen Goldsensor wurden 100 µl 1 mM Octadecylmercaptanlösung (in Ethanol) pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt, der Sensor dreimal mit destilliertem Wasser oder 2-Propanol (reinst) gespült und im Anschluss im Stickstoffstrom getrocknet.

2. Aufbau der Lipidmembran

Mit der Pipette wurde vorsichtig (ohne direkte Berührung der Sensoroberfläche) 1 µl der Lipidlösung* auf den Sensor pipettiert. Danach wurde der Sensor mit 50 µl Ruhepuffer (R) überschichtet und für 5-10 Minuten bei RT inkubiert.

*Die Lipidlösung wurde aus 15 mg/ml Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (PC) in Chloroform und 0,25 mg/ml Octadecylamin (OD) in Chloroform (Verhältnis 60:1) hergestellt. Die Mischung wurde zuerst mit Stickstoff eingedampft und dann in n-Decan wieder aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3. Protein Vorbereitung

Die Membransuspension (2 mg/ml Protein) wurde mit Ruhepuffer bzw. nicht-aktivierendem Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Membranfragmente bzw. Vesikel wurden mit einem Ultraschallstab (UP 50H, Dr. Hielscher GmbH) 2x mit je 10 Pulsen (25 % Leistung, Intervall: 0,5 s) beschallt. Zwischen den Beschallungsschritten musste die Probe 30 Sekunden auf Eis gekühlt werden. Proteoliposomen wurden für 2x 10 Sekunden in einem Ultraschallbad behandelt.

4. Probenauftrag und Zentrifugation

10 µl der Membransuspension wurden unter die 50 µl Ruhepuffer unterschichtet, im Anschluss wurden die Sensoren für 45 Minuten bei 800 x g (4°C) zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Eppendorf, Hamburg). Nach der Zentrifugation mussten die Sensoren ca. 30 Minuten ruhen. Die Sensoren konnten bei 4°C bis zur Messung gelagert werden.

2.8.5 Elektrische Charakterisierung der Sensoren

Die Qualität der generierten Sensoren wurde durch die Bestimmung der Kapazität und der Leitfähigkeit überprüft. Durch die Messung der Stromantwort auf eine periodische Dreiecksspannung (Periodendauer $T=2$ s) mit einer Amplitude von 50 mV und der Stromantwort nach 1 s auf einen Spannungssprung von 100 mV ließen sich Kapazität (C) und Leitfähigkeit (G) der Verbundmembran bestimmen [Seifert *et al.*, 1993; Pintschovius & Fendler, 1999].

Lag die Kapazität bei den 3 mm Sensoren im Bereich von 5-15 nF und die Leitfähigkeit bei 1-3 nS, konnten die Sensoren zur Messung verwendet werden.

2.8.6 Messprotokolle und Puffer

Es kamen, je nach zu untersuchendem Protein, unterschiedliche Messprotokolle und Puffer zum Einsatz.

CIC-X

Sämtliche Proteine der CIC-Familie wurden mit einem einfachen Lösungswechsel aktiviert.

Tab. 2-5: Fluidikprotokoll für einfachen Lösungswechsel.

Flussrate [μl/s]	250	250	250	250	250
Puffer	no flow	NA	A	NA	no flow
Dauer [s]	1,0	2,0	2,0	2,0	1,0

Puffer:	<u>NA</u>	<u>A</u>
	330 mM Na-Aspartat	300 mM Na-Aspartat
		30 mM NaCl
	3 mM Ca-Gluconat	3 mM Ca-Gluconat
	60 mM HEPES	60 mM HEPES
	pH 7,2 (NaOH)	pH 7,2 (NaOH)

P2X₂

Die Untersuchungen am P2X₂ erfolgten mit einem doppelten Lösungswechsel, wobei im ersten Schritt ein Na-Gradient aufgebaut wurde, bevor der Kanal im zweiten Schritt durch die Zugabe von ATP aktiviert werden konnte.

Tab. 2-6: Fluidikprotokoll für doppelten Lösungswechsel.

Flussrate [µl/s]	250	250	250	250	250	250	250
Puffer	no flow	R	NA	A	NA	R	no flow
Dauer [s]	1,0	1,0	5,0	2,0	2,0	5,0	1,0

Zur Entfernung sämtlicher Na⁺ Rückstände zwischen den Einzelmessungen musste der Sensor 15 Sekunden nach jeder Messung nochmals für 1 Sekunde mit Ruhepuffer gespült werden. Zwischen den Einzelmessungen wurde eine Wartezeit von 30 Sekunden eingehalten, um eine Regeneration des Sensors zu gewährleisten.

Puffer:	<u>R</u>	<u>NA</u>	<u>A</u>
	100 mM TMA ¹⁷ -Cl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
	2 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂
			100 µM Na-ATP
	50 mM HEPES	50 mM HEPES	50 mM HEPES
	pH 7,5 (TRIS)	pH 7,5 (TRIS)	pH 7,5 (TRIS)

2.8.7 Datenanalyse

Die primäre Datenanalyse und die Ermittlung der Peakamplituden erfolgte automatisiert mit der Software SURFE²R One Control (Iongate).

Die weitere Datenanalyse wurde mit der Software Origin[®], Version 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) bzw. MS Excel 2007 durchgeführt.

Die Abhängigkeit der Peakströme I([S]) von der Substratkonzentration wurde mit einer Michaelis-Menten Funktion gefittet [Hille, 1992]:

$$I([S]) = I_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

mit: I_{max} = maximaler Peakstrom
 K_m = halbmaximale Sättigungskonzentration
 [S] = Substratkonzentration

¹⁷ TMA: Tetramethylammonium

Dosis-Wirkungskurven von Inhibitoren und Liganden wurden mittels nichtlinearer Regression über ein 4 Parameter sigmoidales Dosis-Wirkungs-Modell (Hill-Funktion) analysiert:

$$I = I_{min} + \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{C_I}\right)^{Hill}}$$

mit: I_{min} = Minimaler Strom
 I_{max} = Maximaler Strom
 EC_{50} = Halbmaximale Wirkungskonzentration
Hill = Hill-Koeffizient (Steigung)
 C_I = Inhibitorkonzentration

Die Qualität der etablierten *Assays* wurde über den Z' -Faktor, für den ein Wert von $>0,5$ als hinreichend robust definiert ist, beurteilt [Zhang *et al.*, 1999]:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

mit: σ_{c+} = Standardabweichung der Positivkontrolle
 σ_{c-} = Standardabweichung der Negativkontrolle
 μ_{c+} = Mittelwert der Positivkontrolle
 μ_{c-} = Mittelwert der Negativkontrolle

Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt ($n=3$) und die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Signifikanz-Bestimmungen wurden mit Hilfe eines Einstichproben t-Tests durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau auf $P=0,05$ definiert war.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Charakterisierung von CIC-7

Die Literaturdaten weisen darauf hin, dass CIC-7 bei heterologer Expression nicht auf der Plasmamembran exprimiert vorgefunden werden kann [Brandt & Jentsch, 1995; Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005] und somit die funktionelle Charakterisierung mittels Patch-Clamp oder TEVC-Techniken nicht möglich ist. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die SSM-Technik zur elektrophysiologischen Charakterisierung dieses potentiellen Cl⁻/H⁺-Antiporters (resp. Cl⁻-Kanals) gewählt. Zur Gewinnung SSM-tauglichen Membran-Materials musste zuerst eine stabil exprimierende Säugerzelllinie etabliert werden, in der CIC-7 in ausreichender Menge exprimiert wurde und die dazu geeignet war, im größeren Maßstab kultiviert zu werden, um daraus Membran-Material zu gewinnen.

3.1.1 Expression und Lokalisation von CIC-7 Wildtyp & G213R

Als Expressionssystem wurde das Flp-In[™] T-REx[™]-System von Invitrogen verwendet, wobei zur Expression die Flp-In[™]-CHO Zelllinie ohne Tetracyclin-Repressor (T-REx[™]) zum Einsatz kam. Der Ratten-Klon von CIC-7 (rCIC-7) wurde als Fusionsprotein mit GFP (C-terminal) unter der Verwendung der HindIII und EcoRV Restriktionsschnittstellen in den Flp-In[™] Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO[®] kloniert.

Im Anschluss erfolgte die Einfügung von Punktmutationen im rCIC-7 Gen zur Erzeugung der G213R Mutante (entspricht humanem G215R) und im S65T-GFP Gen zur Umwandlung in EGFP (F64L) mittels rekombinanter PCR und der in Kapitel 2.2.10 genannten Primer. Die EGFP-Konstrukte (WT & G213R-CIC-7) wurden schließlich jeweils mit pOG44 in die Flp-In[™]-CHO Zelllinie kotransfiziert und stabile Klone auf Hygromycin Resistenz (600 µg/ml) selektiert. Nach 10-14 Tagen Selektion, wobei das Selektionsmedium alle 3-4 Tage gewechselt wurde, konnte in die resultierende konstitutiv und homogen rCIC-7-EGFP exprimierende Zelllinien die β -Untereinheit Ostm1 (Mausklon in pFROG) transfiziert werden. Die Selektion von stabil mOstm1 exprimierenden Klonen erfolgte auf 500 µg/ml G418. Um Inhomogenitäten im Expressionsverhalten der stabilen Mischkultur auszuschließen, wurden CIC-7 und Ostm1 koexprimierende Einzelklone gemäß Kap. 2.3.7.2 isoliert und expandiert. Die jeweilige Proteinexpression konnte mittels Western Blot (Abb. 3-3 B & Abb. 3-4 A) nachgewiesen und die Lokalisation von CIC-7 mittels konfokaler Laser Mikroskopie (LSM 510, Zeiss) untersucht werden (Abb. 3-1).

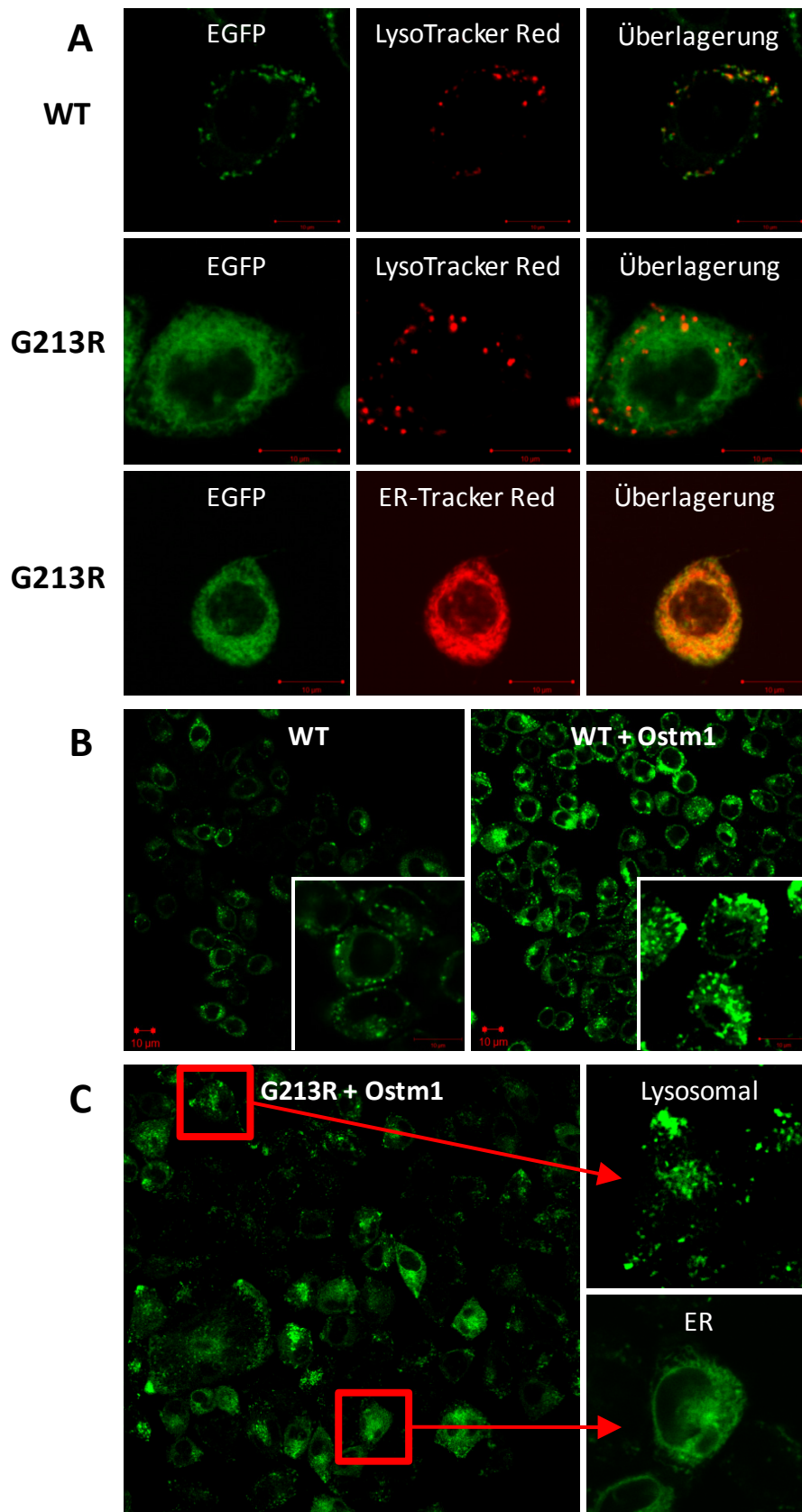


Abb. 3-1: Lokalisation von CIC-7 in CHO Zellen. (A) Konfokale Bilder von Wildtyp rCIC-7 (WT) exprimierenden Zellen, die mit LysoTracker® Red gefärbt wurden (obere Reihe). Mitte: G213R + LysoTracker® Red. Unten: G213R + ER-Tracker® Red. Jeweils EGFP-, Tracker-Fluoreszenz und Überlagerung. (B) Koexpression von WT-rCIC-7 mit der β -Untereinheit mOstm1. Aquisition der vergleichenden Bilder mit identischen Aufnahme-Parametern. (C) Koexpression von G213R-rCIC-7 mit mOstm1.

Zur Bestimmung der Lokalisation von WT- und G213R-CIC-7 wurden die Zellen zusätzlich jeweils mit LysoTracker[®] Red zur Identifikation von Lysosomen und ER-Tracker[®] Red zur Identifikation des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gefärbt (vgl. Kap. 2.7.2.2) und konfokale Bilder der jeweiligen Fluoreszenz im *Multi-Track*-Modus aufgenommen (Filter und Parameter vgl. Kap. 2.7.2.3).

Die Fluoreszenz des Wildtyp CIC-7-EGFP Fusionsproteins konnte dabei ausschließlich in vesikulären Strukturen innerhalb der CHO Zellen detektiert werden, welche auch durch LysoTracker[®] Red angefärbt wurden (Abb. 3-1 A, obere Reihe). Es war keine signifikante Fluoreszenz in der Plasmamembran der Zellen detektierbar. Die G213R exprimierende Zelllinie hingegen zeigte eine relativ diffus in der Zelle verbreitete EGFP-Fluoreszenz, ohne Konzentration auf vesikuläre Strukturen. Die Fluoreszenz konnte nicht mit LysoTracker[®] Red kolokalisiert werden (Abb. 3-1 A, mittlere Reihe). Stattdessen kolokalisierte die G213R-Fluoreszenz in diesen Zellen sehr gut mit dem ER-Tracker[®] Red Farbstoff (Abb. 3-1 A, untere Reihe). Wurde die β -Unterheit Ostm1 koexprimiert, konnte bei der WT-CIC-7 exprimierenden Zelllinie ein signifikanter Anstieg der EGFP Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3-1 B, Vergleichsaufnahmen mit identischen Geräte-Einstellungen), während keinerlei Einfluss auf die Lokalisation festzustellen war. Dieses Verhalten konnte in 12 individuellen Einzelklonen vergleichbar beobachtet werden. Im Gegensatz dazu hatte die Koexpression von Ostm1 mit der G213R Mutante einen signifikanten Effekt auf die Lokalisation von CIC-7. Während die Mutante alleine eine relativ homogene ER-ständige Expression zeigte, war das Expressionsmuster nach Koexpression von Ostm1 in fast allen 23 analysierten Einzelklonen inhomogen. In ca. 30% der Zellen einer Einzelzellkolonie konnte G213R-CIC-7 wieder in vesikulären Strukturen innerhalb der Zellen, vergleichbar mit WT-CIC-7, detektiert werden (Abb. 3-1 C), während die Lokalisierung in den übrigen Zellen nicht verändert war. In einigen Zellen war G213R-CIC-7 außerdem sowohl im ER, als auch in den Lysosomen zu finden, jedoch konnte in keinem der analysierten Einzelklone eine komplette „Relokalisierung“ nachgewiesen werden.

3.1.2 Kontrollmessungen

Zur Kontrolle wurde die generierte WT-CIC-7/Ostm1 exprimierende CHO Zelllinie in der Ganz-Zell-Konfiguration mit der Patch-Clamp Technik untersucht. Dazu kamen zwei unterschiedliche Protokolle zum Einsatz. Zum Einen erfolgte die Aquisition von I/V-Kennlinien bei neutralem pH, wobei abwechselnd in chloridfreier und chloridhaltiger Badlösung gemessen wurde (Abb. 3-2 A). Zum Anderen kam ein „Säure-aktiviertes“ Messprotokoll nach Kajiya *et al.* (2009) zum Einsatz, mit dem die Autoren vermeintlich CIC-7 spezifische Ströme detektieren konnten. Bei diesen Untersuchungen wurde in chloridhaltiger, neutraler (pH 7,5) und saurer Badlösung (pH 5,5) gemessen (Abb. 3-2 B, jeweilige Pufferzusammensetzung siehe Abbildungsbeschriftung).

Mit beiden Protokollen konnten keine signifikanten Chloridleitfähigkeiten für die generierte Zelllinie nachgewiesen werden.

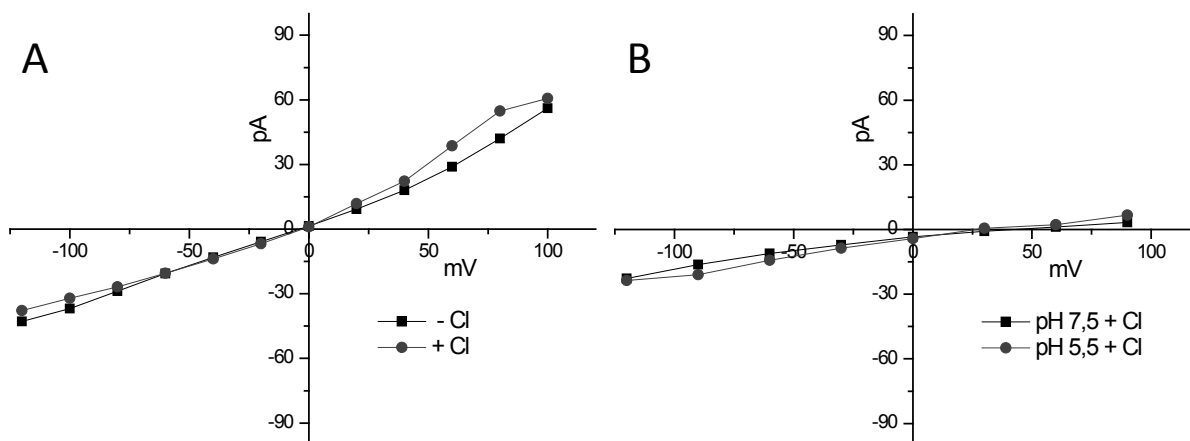


Abb. 3-2: Ganz-Zell Patch-Clamp Untersuchungen der WT-CIC-7/Ostm1 CHO Zelllinie. Spannungssprungprotokoll -120 bis +100 mV, je 1 s, Zellkapazität jeweils ~10 pF. **(A)** Pipette: 10 mM NaCl, 130 mM CsOH, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,4. Bad -Cl (■): 140 mM NaAspartat, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4. Bad +Cl (●): wie -Cl, jedoch 140 mM NaCl, anstatt NaAspartat. **(B)** Pipette: 140 mM NMDGCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂, 0,3 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,5. Bad pH 7,5 (■): 140 mM NaCl, 6 mM CsCl, 10 mM Glukose, 0,5 mM MgCl₂, 1,25 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,5. Bad pH 5,5 (●): 140 mM NaCl, 6 mM CsCl, 10 mM Glukose, 0,5 mM MgCl₂, 1,25 mM CaCl₂, 10 mM MES, pH 5,5.

3.1.3 Fraktionale & subzelluläre Verteilung von CIC-7

Zur Charakterisierung von CIC-7 in seiner nativen Membrenumgebung mussten die Lysosomen der CHO Zellen von den übrigen Membranen isoliert werden. Nach dem schonenden Aufschluss der Zellen mittels Parr-Bombe [Hunter & Commerford, 1961; Autuori *et al.*, 1982] erfolgte die Isolation der Lysosomen durch Dichtegradientenzentrifugation. Dabei kamen ein kontinuierlicher Percoll-Gradient [Graham, 2001] und ein diskontinuierlicher Sucrose-Gradient (vgl. Kap. 2.6.2) zum Einsatz, wobei sich die Isolation mit Hilfe des Sucrose-Gradienten als geeigneter für die SSM-Messungen erwiesen hat, da mit CIC-7 angereicherte Membranfraktionen des Percoll-Gradienten keine signifikanten Chloridsignale gemessen werden konnten. Unter Verwendung der Percoll-Präparationen waren keine Sensoren mit akzeptablen elektrischen Parametern zu erzeugen. Für alle weiteren Untersuchungen kam daher ein vierstufiger Sucrose-Gradient zum Einsatz (9%, 31%, 45%, 51%), mit dem drei Membranfraktionen an den Interphasen der einzelnen Sucrose-Konzentrationen gewonnen wurden.

Diese konnten mit Hilfe der EGFP-Fluoreszenz auf die konzentrierte Verteilung von CIC-7 untersucht werden (Abb. 3-3 A, Fluoreszenzemission bei ~510 nm). Dabei stellte sich heraus, dass in der Präparation der WT-CIC-7 Zelllinie die EGFP Fluoreszenz des CIC-7/EGFP-Fusionsproteins signifikant in der 31/45 Fraktion erhöht war, während in der 9/31 fast keine und in der 45/51 Fraktion wesentlich weniger Fluoreszenz detektiert werden konnte. Für diese Messung wurden identische Proteinkonzentrationen, die über die Methode von Bradford (Kap. 2.6.3) bestimmt worden waren, im Fluoreszenzspektrometer (F4500, Hitachi) in Microküvetten untersucht.

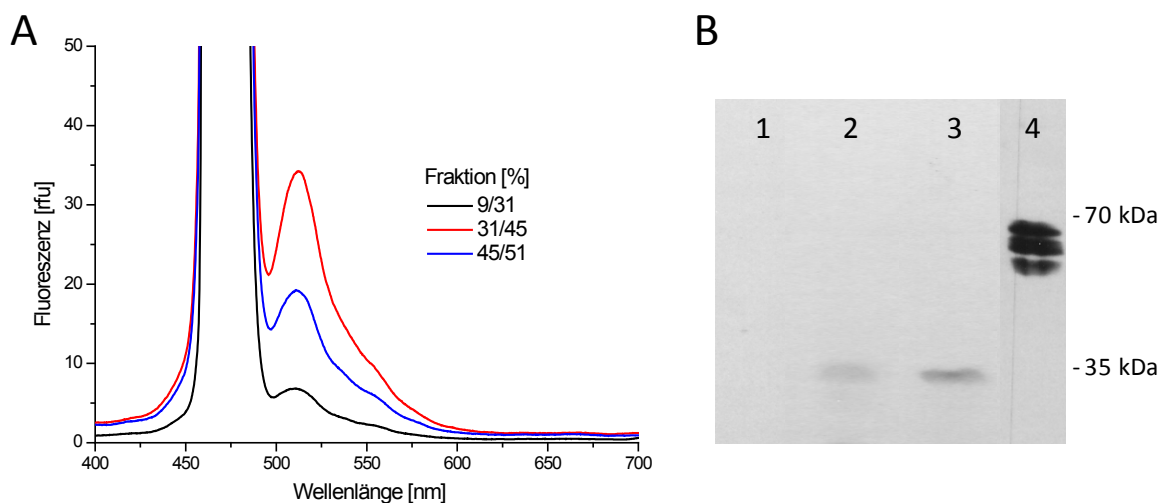


Abb. 3-3: (A) *Fluoreszenzspektrum der WT-CIC-7 Sucrose-Membran-Präparation.* 1 mg/ml in 50 µl Puffer (60 mM HEPES, pH 7,2, 3 mM CaCl₂, 300 mM NaAspartat) je Fraktion in Microküvetten. Ex: 465 nm, Em: 400-700 nm. (B) *mOstm1 Western Blot.* Ganzzelllysat von 1: Flp-InTM CHO Kontrollzellen, 2: WT-CIC-7+Ostm1, 3: G213R-CIC-7+Ostm1, 4: Transiente Ostm1 Transfektion in Flp-InTM CHO Zellen.

Zur weiteren Charakterisierung der gewonnenen Membranpräparationen wurde die Verteilung von wichtigen Zell-Organellen innerhalb der Fraktionen mittels Western Blot bestimmt. Dazu wurden 15 µg Gesamtprotein je Fraktion elektrophoretisch getrennt und die vorhandenen Organelle mit Antikörpern gegen spezifische Markerproteine nachgewiesen. Zur Detektion der Lysosomen kam ein Antikörper gegen das lysosomale Protein Lamp-1 zum Einsatz, die Analyse der ER-Verteilung erfolgte über den Nachweis von Calnexin (Abb. 3-4 A, 1. & 2. Reihe). Lamp-1 (~120 kDa) konnte stark angereichert in Fraktion 31/45 detektiert werden, wobei es auch in wesentlich geringeren Mengen in den beiden anderen Fraktionen nachzuweisen war. Calnexin (~90 kDa) hingegen war hauptsächlich in der Fraktion 45/51 zu finden, nur wenig in 31/45 und überhaupt nicht in 9/31.

Ostm1-spezifische Banden waren sowohl in WT als auch in G213R CIC-7 koexprimierenden Zellen bei ca. 35 kDa detektierbar, während in transient Ostm1 transfizierten Flp-In™-CHO Zellen (ohne CIC-7) eine spezifische Bande bei ca. 70 kDa nachweisbar war (Abb. 3-3 B).

Das CIC-7/EGFP Fusionsprotein konnte mit Hilfe eines GFP-Antikörpers (Clontech) nachgewiesen werden, die spezifische Bande war bei einem Molekulargewicht von ~115 kDa detektierbar. Die Analyse der Membranpräparationen von Wildtyp und G213R Mutante zeigte eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Proteine in den Fraktionen. Während WT-CIC-7 (+Ostm1) signifikant in Fraktion 31/45 angereichert war, konnte für die G213R Mutante eine ausgeglichene Verteilung in den Fraktionen 31/45 und 45/51 nachgewiesen werden (Abb. 3-4 A, 3. & 4. Reihe).

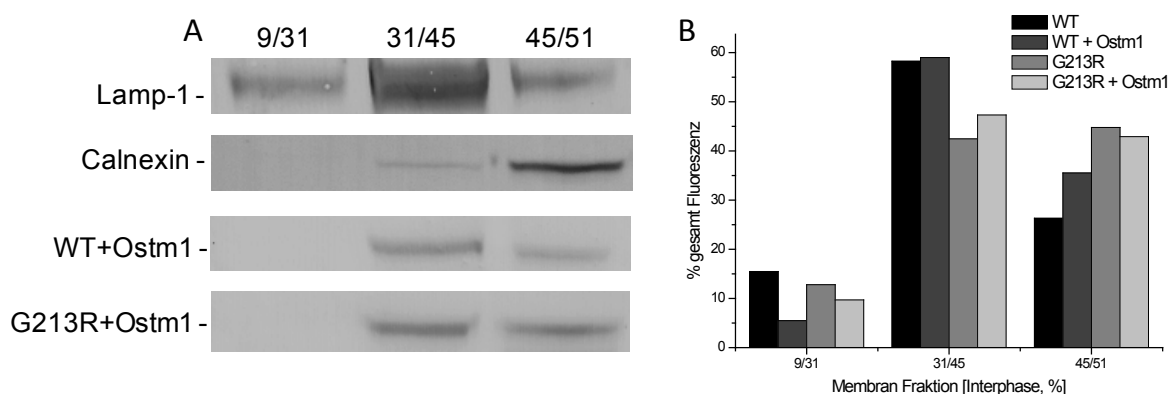


Abb. 3-4: Charakterisierung der Sucrose-Membran-Präparation. (A) Identifikation von Zellorganellen und CIC-7/EGFP in den Membranfraktionen. 15 µg Gesamtprotein/Spur. Antikörper-Nachweis: Lysosomen = Lamp-1 (~120 kDa), ER = Calnexin (~90 kDa), CIC-7/EGFP = Clontech GFP AK (89 + 27 = ~115 kDa). Unterschiedliche Verteilung von WT und G213R CIC-7 in den Fraktionen 31/45 und 45/51. **(B) Fluorometrische Quantifizierung der CIC-7 Verteilung von verschiedenen Präparationen (WT & G213R, mit und ohne Ostm1).** 1 mg/ml in 50 µl Puffer (60 mM HEPES, pH 7,2, 3 mM CaCl₂, 300 mM NaAspartat) je Fraktion in 96-Well Platte. Analyse im Plattenfluorometer, Detektion von unten, Ex: 480/20 nm, Em: 530/25 nm. Relativer Fluoreszenz-Anteil pro Fraktion bezogen auf Gesamtfluoreszenz in allen Fraktionen der jew. Präparation.

Zur Quantifizierung der CIC-7 Verteilung aller untersuchten Membranpräparationen (WT & G213R CIC-7, mit und ohne Koexpression von Ostml) wurden die einzelnen Fraktionen schließlich vergleichend im Plattenfluorometer (Lambda Fluoro, BIO-TEK Instruments) auf EGFP-Fluoreszenz untersucht. Dazu mussten die Proben wieder auf identische Proteinkonzentrationen von 1 mg/ml in 50 µl Puffer eingestellt und die Fluoreszenz unter konstanten Messbedingungen (Ex: 480/20 nm, Em: 530/25 nm, Verstärkung: 200) bestimmt werden.

Die relative Verteilung der EGFP-Fluoreszenz in den einzelnen Fraktionen, bezogen auf die Gesamtfluoreszenz der jeweiligen Membranpräparation, ist in Abb. 3-4 B dargestellt. Während WT-CIC7 mit ~60% der Fluoreszenz stark in Fraktion 31/45 angereichert war (nur ~25% in 45/51) und auch die Koexpression keinen signifikanten Einfluss auf diese Verteilung hatte, zeigte sich die Verteilung der G213R Mutante relativ ausgeglichen in den Fraktionen 31/45 und 45/51, mit einem minimal größeren Anteil (~3%) in 45/51. Bei Koexpression von Ostml verschob sich die Verteilung um ~5% zu 31/45, blieb jedoch weiterhin relativ ausgeglichen in den beiden Fraktionen. Alle Präparationen zeigten nur einen geringen Fluoreszenzanteil von max. 10% in Fraktion 9/31. Für alle folgenden elektrophysiologischen Untersuchungen an der SSM wurde die Fraktion 31/45 der jeweiligen Präparationen verwendet.

3.1.4 CIC-7 vermittelte Ströme an der SSM

Für die funktionelle Charakterisierung von CIC-7 mit Hilfe der SSM-Technik wurden die präparierten Membranfraktionen (31/45) mit einer jeweiligen Proteinkonzentration von ~2 mg/ml wie in Kap. 2.8.4 beschrieben an die SURFE²R-Sensoren angelagert und alle folgenden Messungen am SURFE²R One Gerät durchgeführt. CIC-7 spezifische Ströme konnten dann durch ein einfaches Lösungswechselprotokoll induziert werden, wobei die einzelnen Lösungen (NA-A-NA) für jeweils 2 Sekunden mit einer Flussrate von 250 µl/s über den Sensor gespült wurden. Die aktivierende Lösung (A) enthielt dabei für die meisten Experimente 30 mM NaCl, welches in der nicht-aktivierenden Lösung (NA) durch die äquimolare Menge Na-Aspartat ersetzt war (Abb. 3-5 A). Zur Minimierung von Lösungswechselartefakten waren allen Messpuffern immer 300 mM Na-Aspartat zugesetzt (Pufferzusammensetzung: Kap. 2.8.6). Die resultierenden Ströme hatten durch den Chloridtransport in die Vesikel eine negative Amplitude.

Bei Variation der treibenden Chloridkonzentration in der aktivierenden Lösung im Bereich von 0,5-300 mM erreichten die Ströme große Amplituden (>1 nA), ohne dass im untersuchten Konzentrationsbereich ein Sättigungsverhalten festzustellen war (Abb. 3-5 B). Um während

des gesamten Experiments möglichst konstante Messbedingungen zu gewährleisten, waren den Messlösungen immer zusätzlich 300 mM Salz (Na-Aspartat) zugesetzt, während in der aktivierenden Lösung die entsprechende Menge Na-Aspartat äquimolar durch NaCl ersetzt wurde. Zur Untersuchung der zeitlichen und aktivierungsabhängigen Stabilität der generierten Ströme wurden Sensoren ($n=3$) in zehn Zyklen á zehn Einzelmessungen mit jeweils fünfminütiger Inkubation (in NA) zwischen den Zyklen vermessen und die Peakamplituden ausgewertet. Dabei konnte über das gesamte Experiment kein signifikanter Signalverlust festgestellt werden und auch die Standardabweichung zwischen den Messungen der einzelnen Zyklen waren mit $<10\%$ relativ gering (Abb. 3-5 C).

Die Beurteilung der Qualität und Robustheit des etablierten Assays erfolgte über die Bestimmung des Z' -Faktors (vgl. Kap. 3.2.5, 20 Einzelmessungen), wobei als Negativkontrolle ein identisches einfaches Lösungswechselprotokoll ohne Chloridgradient (NA-NA-NA) diente. Mit einem Z' -Faktor von 0,78 war der Assay ausreichend robust (Z' -Faktor $>0,5$) zur Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen.

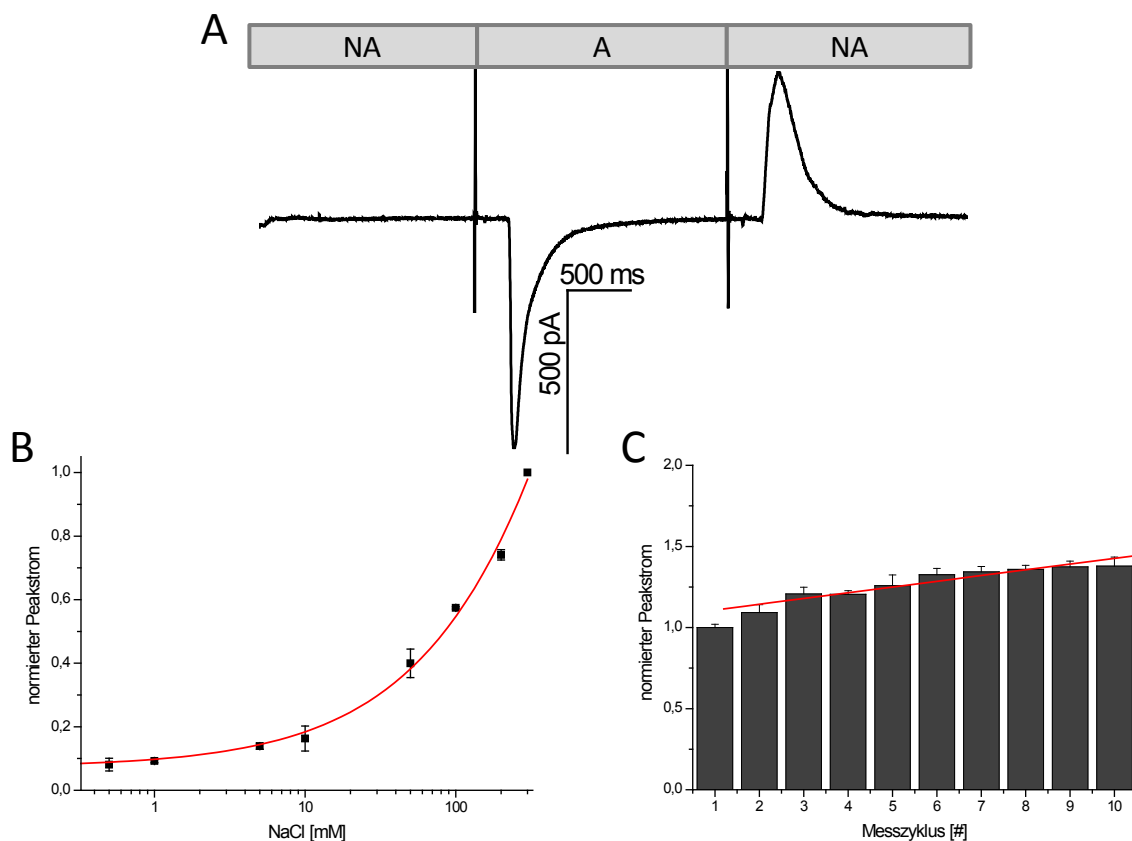


Abb. 3-5: CIC-7 Ströme an der SSM. (A) Einfaches Lösungswechselprotokoll (NA-A-NA) zur Detektion von CIC-7 Strömen. 2 s Fluss je Lösung (250 μ l/s). 30 mM Cl^- in A, Kompensation durch 30 mM Asp^- in NA. Pufferzusammensetzung vgl. Kap. 2.8.6. **(B)** Substratabhängigkeit. Variation der Cl^- Konzentration in A (0,5-300 mM), Kompensation durch Na-Aspartat in NA. Mittelwerte und Standardabweichung der auf maximale Cl^- Konzentration normierten Peakströme ($n=3$). Hill-Fit (—). **(C)** Stabilität der CIC-7 Ströme. 10 Zyklen, je 10 Einzelmessungen mit 5-minütiger Inkubation zwischen den Zyklen. Mittelwerte und Standardabweichung eines repräsentativen Sensors, normiert auf MW von Zyklus 1 ($n=3$). Rot: Lineare Regression von Zyklus 2-10.

3.1.5 Aktivitätsvergleich von Wildtyp und G213R CIC-7

Zur Überprüfung der Funktionalität der G213R Mutante und zum Aktivitätsvergleich der einzelnen Präparationen wurden identische Mengen (2 mg/ml Gesamtprotein) der Fraktion 31/45 der jeweiligen Membranpräparationen auf die SURFE²R-Sensoren angelagert und Ströme durch einen 30 mM Cl⁻ Sprung induziert. Von jeder Präparation wurden mindestens 4 Sensoren untersucht, auf den einzelnen Sensoren fanden jeweils mindestens 20 Einzelmessungen statt. Während mit Kontrollmembranen von nicht exprimierenden Flp-InTM CHO-Zellen nur sehr geringe endogene Chloridströme messbar waren (<150 pA, Abb. 3-6 A, blau), konnten mit WT-CIC-7 Membranen Ströme mit einer Peakamplitude von 455 ±78 pA (6 Sensoren) detektiert werden (Abb. 3-6 A, schwarz). Wurde die β-Untereinheit Ostm1 koexprimiert, stiegen die Ströme auf 787 ±74 pA (6 Sensoren) (Abb. 3-6 A, rot).

Auch mit Membranen der G213R Mutante waren signifikante Ströme messbar (292 ±88 pA, 4 Sensoren), die bei Koexpression von Ostm1 auf 518 ±72 pA (5 Sensoren) stiegen (Abb. 3-6 B). Durch Normierung auf die jeweilige CIC-7 Konzentration (über die EGFP Fluoreszenz, vgl. Abb. 3-4 B) in den einzelnen Fraktionen wurden Expressionsunterschiede eliminiert, um den Einfluss der Koexpression von Ostm1 auf die detektierbaren Ströme von WT und G213R CIC-7 zu untersuchen. Auch bei der Mutante waren signifikante Ströme messbar, die jedoch maximal die halbe Amplitude im Vergleich zum Wildtyp erreichten (Abb. 3-6 C). Die Koexpression von Ostm1 führt zu einer ungefähren Verdopplung der Stromamplituden in beiden Präparationen.

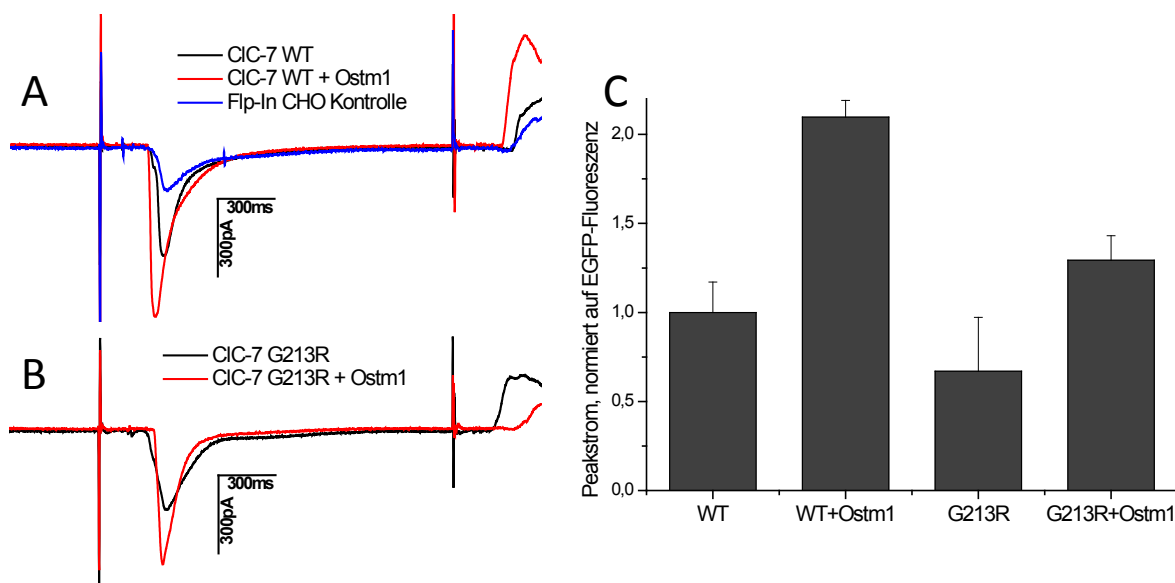


Abb. 3-6: Aktivität von WT und G213R CIC-7. (A) Anlagerung von 2 mg/ml Gesamtprotein je WT-Präparation (Fraktion 31/45). Transportaktivierung durch 30 mM Cl⁻ Sprung. 20 Aktivierungen pro Sensor, 4-6 Sensoren, ein repräsentatives Signal ist gezeigt. (B) Protokoll wie A mit G213R-Membranpräparationen. (C) Vergleich der einzelnen Präparationen. Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils 4-6 Sensoren, normiert auf EGFP-Fluoreszenz in der jeweiligen Präparation und WT-Strom. Pufferzusammensetzung: vgl. Kap. 2.8.6.

3.1.6 pH-Abhängigkeit von CIC-7

Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der CIC-7 Ströme wurden Sensoren mit Fraktion 31/45 WT-CIC-7+Ostm1 angelagert und die resultierenden Ströme eines 30 mM Cl⁻ Sprungs bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Nach der Änderung der pH-Verhältnisse in allen Lösungen wurden die Sensoren für 15 Minuten in der jeweiligen nicht-aktivierenden Lösung inkubiert, um eine Adaptation an die Messbedingungen zu gewährleisten. Während neutrale pH-Lösungen mit 60 mM HEPES gepuffert waren, enthielten saure Lösungen MES und basische TRIS als Puffer. Die einzelnen Sensoren (n=3) wurden dabei jeweils 10 Mal je pH-Wert aktiviert, die resultierenden Peakamplituden gemittelt und auf die Ströme bei pH 7,2 normiert.

Abb. 3-7 zeigt, dass die Ströme signifikant bei sauren pH-Werten zunahm. Die Ströme bei pH 5,0 erreichten die 2,5 fache Amplitude im Vergleich zu Messungen bei neutralem pH (7,2), während die Ströme bei pH 9,0 lediglich maximal die halbe Amplitude aufwiesen. Im untersuchten pH Bereich von 5-9 war dabei kein Sättigungsverhalten des pH-Effekts im Sauren feststellbar.

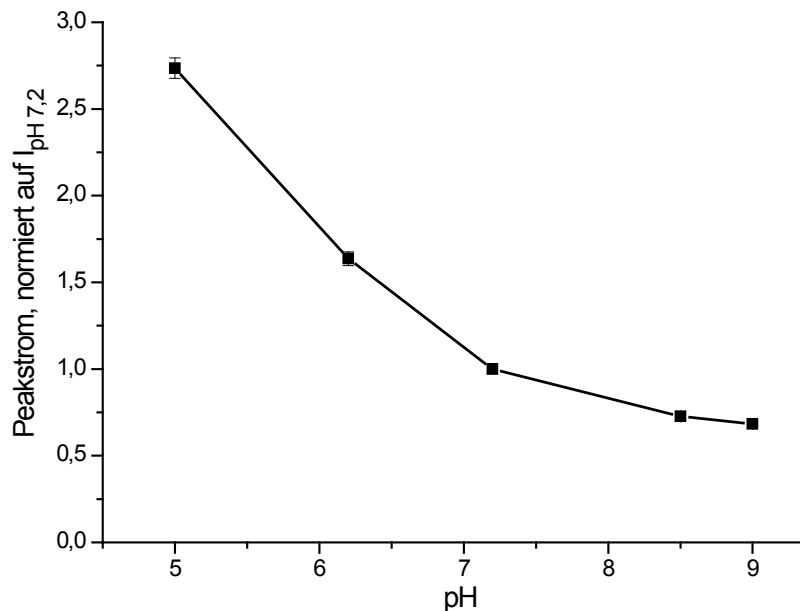


Abb. 3-7: pH Abhängigkeit der CIC-7 Ströme. Transportaktivierung durch 30 mM Cl⁻ Sprung. 10 Einzelmessungen je pH-Wert, Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Sensoren sind gezeigt (normiert auf die Peakamplituden bei pH 7,2). 15 Minuten Vorinkubation in NA nach Wechsel auf veränderten pH Wert. NA: 330 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat, 60 mM HEPES (MES/TRIS), pH 5,0-9,0. A: 30 mM NaCl, 300 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat, 60 mM HEPES (MES/TRIS), pH 5,0-9,0.

3.1.7 Anionen-Selektivität von CIC-7

Eine weitere charakteristische biophysikalische Eigenschaft der CLC-Proteine ist ihre Anionenselektivität. Um diese zu bestimmen, konnten die zu untersuchenden Anionen allerdings nicht direkt in der aktivierenden Lösung für Chlorid substituiert werden, da sie aufgrund starker Wechselwirkungen mit der SSM zur Artefaktbildung neigten. Statt dessen wurden die Anionen in gleicher Konzentration sowohl der nicht-aktivierenden als auch der aktivierenden Lösung zugesetzt und der Transport des Cl^-/H^+ -Antiporters CIC-7 durch einen Sprung der Protonenkonzentrationen (2 pH) in Anwesenheit verschiedener Anionen (30 mM Cl^- , Br^- oder I^-) initiiert. Das Innere der Vesikel (nicht-aktivierende Lösung) war dabei auf pH 7,0 mit 30 mM MOPS gepuffert, während im aktivierenden Puffer (außerhalb d. Vesikels) mit 30 mM MES ein pH von 5,0 eingestellt war. Das auftretende pH Artefakt auf der SSM wurde durch ein identisches Lösungswechselprotokoll in Abwesenheit eines permeablen Anions (30 mM Na-Aspartat) bestimmt und von den Strömen in Anwesenheit eines permeablen Anions subtrahiert (vgl. Abb. 3-10, schwarz = pH Artefakt). Schließlich konnten die detektierten Ströme gemittelt (je Bedingung 10 Einzelmessungen auf 3 unabhängigen Sensoren) und auf die Ströme in Anwesenheit von Chlorid normiert werden (Abb. 3-8). CIC-7 zeigte unter diesen Versuchsbedingungen eine Spezifität von $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ und eine Protonengradienten-getriebene Transportaktivität.

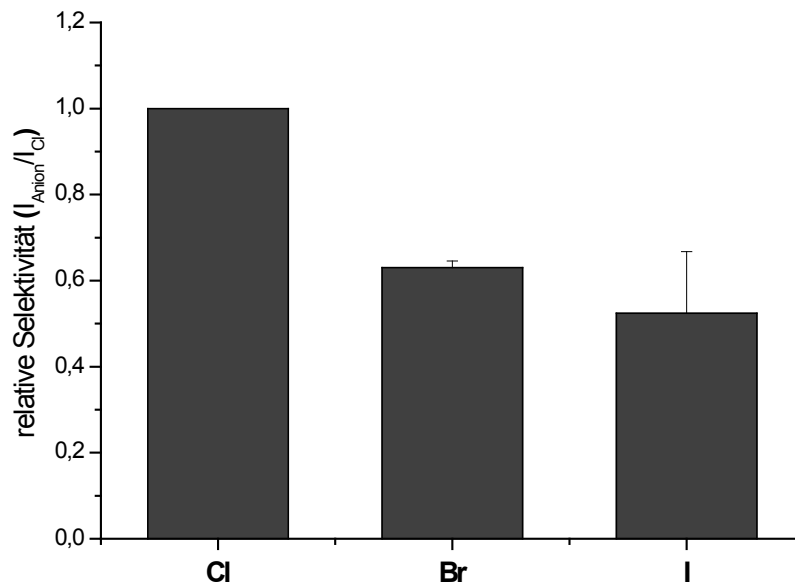


Abb. 3-8: Anionen-Selektivität von CIC-7. Transportaktivierung durch Protonensprung in Anwesenheit verschiedener Anionen. NA = Innere der Vesikel: pH 7,0, 30 mM MOPS, 30 mM NaCl (NaBr, NaI), 300 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat; A = Außerhalb der Vesikel: pH 5,0 30 mM MES, 30 mM NaCl (NaBr, NaI), 300 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat. Jeweils 10 Einzelmessungen auf 3 Sensoren. pH-Artefakte (identisches Messprotokoll, jedoch Anionensubstitution durch unpermeable 30 mM Na-Aspartat) mit einer Amplitude von $\sim 1-2$ nA wurden subtrahiert und die resultierenden Amplituden auf die Chlorid-Ströme normiert.

3.1.8 Protonen-gekoppelte Transportaktivität von CIC-7

Zur weiteren Charakterisierung der Protonen-gekoppelten Transportaktivität wurden WT-CIC-7 (+Ostm1) Ströme durch einen 30 mM Cl⁻ Sprung in Anwesenheit eines zusätzlichen Protonengradienten initiiert. Dieser Gradient von 2 pH Stufen konnte dabei durch Auswahl der geeigneten Puffer vektoriell in beide Richtungen über die Vesikelmembran etabliert werden. Dazu wurden die Sensoren in nicht aktivierenden chloridfreien Lösungen (330 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat) bei pH 5,0 (30 mM MES) bzw. 9,0 (30 mM TRIS) inkubiert, um den entsprechenden pH im Innern der Vesikel einzustellen. Die Aktivierung erfolgte durch einen kombinierten Chlorid- und pH-Sprung mit einer aktivierenden chloridhaltigen (30 mM) Lösung bei pH 7,0 (MOPS). Auftretende pH-Artefakte wurden wiederum durch ein identisches Messprotokoll, bei dem Chlorid durch impermeables Aspartat substituiert war, detektiert und von den Strömen subtrahiert (Abb. 3-10, schwarz = pH-Artefakt). Die gemessenen Gradienten-Ströme konnten schließlich auf Gradienten-freie Ströme normiert und somit vergleichend gegenüber gestellt werden (Abb. 3-9). Zum Vergleich wurde dieses Messprotokoll auf weitere Proteine der CLC-Familie angewendet. Dafür kamen der Cl⁻-Kanal CIC-Ka (Expression und Präparation vgl. Kap. 3.3.1) und der bakterielle Cl⁻/H⁺-Antiporter CIC-ec1 zum Einsatz, der von L. Hatahet (AG Fendler) wie von

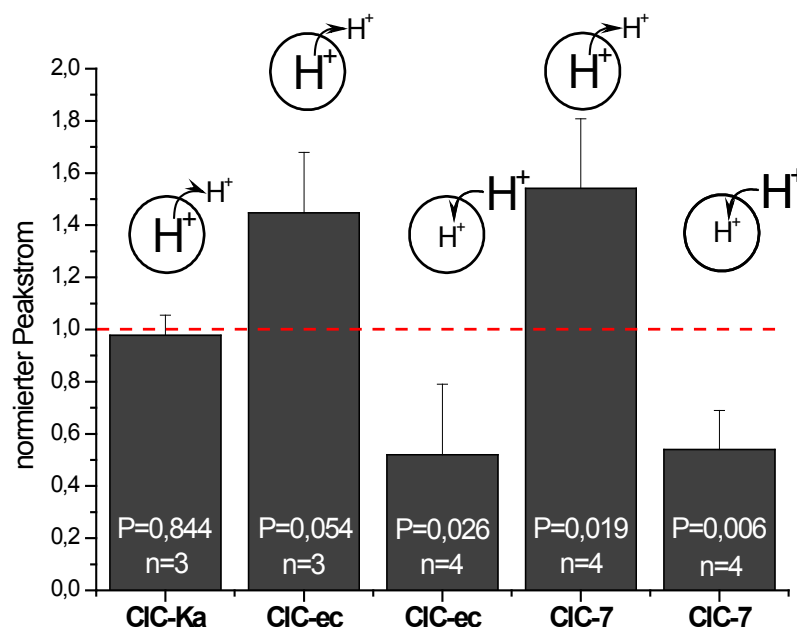


Abb. 3-9: Kanal oder Transporter? Protonen-gekoppelte Transportaktivität von CIC-7 im Vergleich zu CIC-Ka und CIC-ec1. Transportaktivierung durch 30 mM Cl⁻ Sprung in Anwesenheit ein- und auswärtsgerichteter pH-Gradienten. NA (innen): 330 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat, 30 mM MES, pH 5,0, bzw. TRIS, pH 9,0. A (außen): 30 mM NaCl, 300 mM Na-Aspartat, 3 mM Ca-Gluconat, 30 mM MOPS, pH 7,0. Subtraktion des pH-Artefakts (identisches Protokoll mit impermeablen Anionen: 30 mM Na-Aspartat) und Normierung auf Ströme ausgeglichener pH-Verhältnisse bei pH 7,0 (- - -). 10 Einzelmessungen pro Bedingung auf 3-4 Sensoren. Mittelwerte und Standardabweichungen. (P: Einstichproben t-Test, Hypothese: Mittelwert=1. Signifikanzniveau=0,05)

Accardi *et al.* 2004 beschrieben in *E. coli* (BL21 DE3) exprimiert, aufgereinigt und schließlich in Liposomen (*E. coli* polare Lipide, LPR¹⁸=10) rekonstituiert wurde [Venturi & Padan, 2003].

Für CIC-Ka und CIC-ec1 resultierten bei Standard-Aktivierung mit 30 mM Cl⁻ große Peakamplituden im Bereich von 1-2 nA. Während pH Gradienten keinen Effekt auf die Ströme des Cl⁻-Kanals CIC-Ka hatten,

wurden CIC-ec1 (Cl⁻/H⁺-Antiporter) und CIC-7 signifikant und abhängig von der Richtung des etablierten Gradienten moduliert. Bei einem auswärts gerichteten Gradienten (pH_{innen}: 5,0; pH_{außen}: 7,0) konnten Amplitudenvergrößerungen um ca. 50% im Vergleich zu Gradientenfreien Messungen beobachtet werden. Einwärts gerichtete Protonengradienten (pH_{innen}: 9,0; pH_{außen}: 7,0) verringerten die Signalamplituden um ca. 45% bei CIC-ec1 und CIC-7.

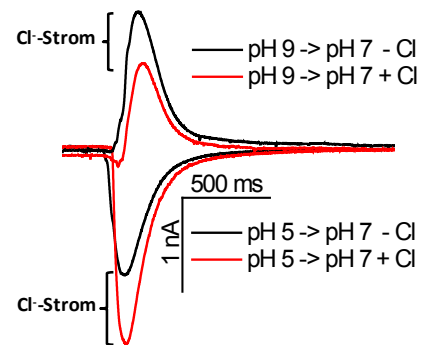


Abb. 3-10: Subtraktion des pH Artefakts (→) vom Cl⁻-Signal (←).

3.1.9 Untersuchung potentieller CIC-7 Inhibitoren

Mit Hilfe des etablierten *Assays* auf Basis des SURFE²R One konnte abschließend ein halbautomatisches Inhibitoren-Screening zur Erstellung eines CIC-7 Inhibitionsprofils und zur Überprüfung der Spezifität der detektierten Ströme durchgeführt werden. Dazu wurden 16 bekannte potentielle Chloridkanal-Inhibitoren (Tab. 3-1) in einem Konzentrationsbereich von 1-1.000 μM untersucht und soweit möglich IC₅₀ Werte bestimmt (Abb. 3-11). CIC-7 wurde zu diesem Zweck mit einem Konzentrationssprung von 30 mM Cl⁻ in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen aktiviert und die resultierenden Ströme auf Inhibitor-freie Signale zu Beginn des Experiments normiert. Dabei waren die Inhibitoren allen Messpuffern (NA & A) zugesetzt. Beim Wechsel der Inhibitorkonzentrationen wurden die Sensoren vor erneuter Aktivierung für fünf Minuten in den veränderten Puffern inkubiert. Für jede Inhibitor-Konzentration erfolgten fünf Einzelmessungen auf mindestens drei individuellen Sensoren pro Inhibitor. Die Bestimmung von IC₅₀ Werten erfolgte schließlich über einen Hill-Fit der gemittelten und normierten Daten.

Wegen starker artifizieller Wechselwirkungen mit dem SSM-*Assay* konnten die Inhibitoren IAA-94 und NS3736 nicht zuverlässig untersucht werden (Erläuterung in Kap. 4.1). Weiterhin präzipitierten die Substanzen Quercetin, Genistein, Luteolin und Phloretin bei Konzentrationen >100 μM, so dass auch für diese keine IC₅₀-Werte bestimmbar waren.

Für Quercetin und Genistein waren geringe inhibitorische Aktivitäten bei 100 μM detektierbar, während CCP, CPA, 9-AC, Tamoxifen und Kaempferol keinerlei Inhibition im

¹⁸ LPR: Lipid zu Protein Verhältnis

untersuchten Konzentrationsbereich ($< 300 \mu\text{M}$) zeigten (vgl. Tab. 3-1). Gleichzeitig hatten Tamoxifen und NFA wie auch NS3736 einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Leitfähigkeit der Sensoren.

Zuverlässige IC_{50} -Werte konnten für DIDS, NS5818 und NPPB bestimmt werden. DIDS inhibierte die Ströme mit einem IC_{50} von $39 \pm 3,8 \mu\text{M}$, NPPB mit einem IC_{50} von $156 \pm 7,8 \mu\text{M}$, jeweils mit relativ geringen Standardabweichungen (Abb. 3-11 A&B).

Für NS5818 konnte ein IC_{50} von $52 \pm 8,0 \mu\text{M}$ und für Furosemide ein Wert von $\sim 650 \mu\text{M}$ bestimmt werden, wobei bei der Untersuchung dieser beiden Inhibitoren allerdings große Standardabweichungen auftraten und Furosemide im untersuchten Konzentrationsbereich lediglich eine maximale Inhibition von knapp 60% erreichte (Abb. 3-11 C&D).

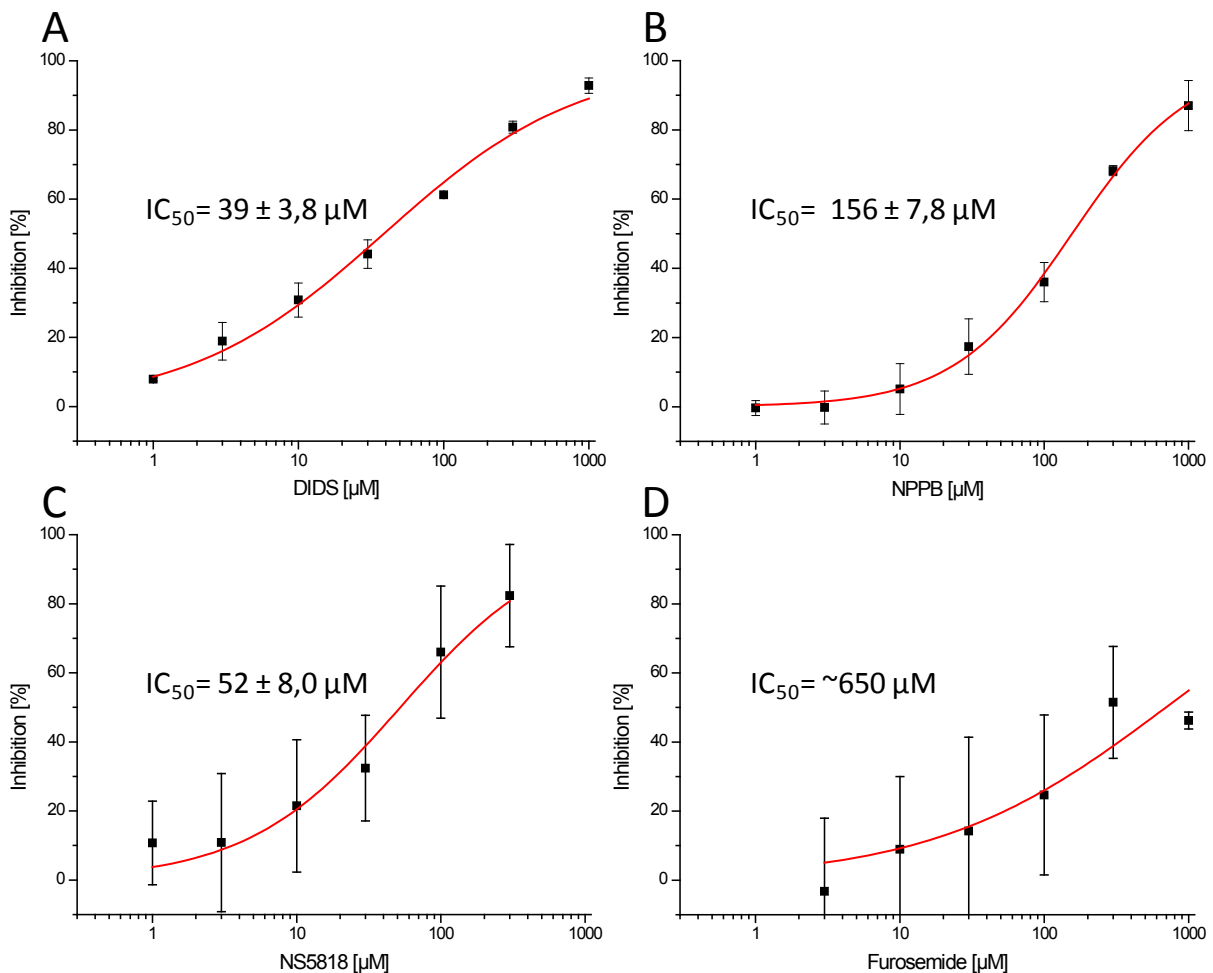


Abb. 3-11: Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener CIC-7 Inhibitoren. Transportaktivierung durch 30 mM Cl Sprung. Zugabe von ansteigenden Konzentrationen versch. Inhibitoren (1-1.000 μM) in allen Messpuffern. Vorinkubation der Sensoren bei geänderter Inhibitorkonzentration von 5 Minuten, 5 Einzelmessungen pro Konzentration auf mindestens 3 individuellen Sensoren. Ströme normiert auf Kontrollmessungen vor Inhibitorzugabe, Mittelwerte und Standardabweichung. Fit der Daten mit einer Hill-Funktion (—). (A) DIDS: $\text{IC}_{50} = 39 \pm 3,8 \mu\text{M}$ (Hill: $0,65 \pm 0,04$). (B) NPPB: $\text{IC}_{50} = 156 \pm 7,8 \mu\text{M}$ (Hill: $1,05 \pm 0,05$). (C) NS5818: $\text{IC}_{50} = 52 \pm 8,0 \mu\text{M}$ (Hill: $0,82 \pm 0,10$). (D) Furosemide: $\text{IC}_{50} = \sim 650 \mu\text{M}$ (Hill: $0,53 \pm 0,14$).

Tab. 3-1: Untersuchte potentielle CIC-7 Inhibitoren. Konzentrationsbereich (μM), maximale Inhibition (%) und IC_{50} (μM), soweit bestimmbar. *Wegen starker artifizierlicher Interaktionen nicht untersuchbar. #Präzipitiert bei Konzentrationen $>100 \mu\text{M}$. †Einfluss auf Sensor-Leitfähigkeit. DIDS: 4'-diisothiocyantostilbene-2,2'-disulfonic acid, NPPB: 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid, NFA: 2-[3-(trifluoromethyl)anilino]nicotinic acid, CPP: p-chlorophenoxy-propionic acid, CPA: 4p-chlorophenoxy-acetic acid, IAA-94: indanyloxyacetic acid 94, 9-AC: 9-anthracene-carboxylic acid. NS3736 & NS5818 zur Verfügung gestellt von K. Henriksen (Nordic Biosciences), alle weiteren Inhibitoren wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Stocklösungen 100 mM in DMSO.

	Inhibitor	Struktur	Konz. (μM)	Max Inh. (%)	IC_{50} (μM)
1	DIDS		1-1.000	92	$39 \pm 3,8$
2	NS5818		1-300	70	$52 \pm 8,0$
3	NPPB		1-1.000	90	$156 \pm 7,8$
4	Furosemide		3-1.000	60	~ 650
5	NFA		1-1.000	30 [†]	-
6	Quercetin		1-300 [#]	25	-
7	Genistein		1-300 [#]	20	-
8	CPP		1-300	0	-
9	CPA		1-300	0	-
10	9-AC		1-300	0	-
11	Tamoxifen		1-300	0 [†]	-
12	Kaempferol		1-300	0	-
13	Luteolin		1-300 [#]	0	-
14	Phloretin		1-300 [#]	0	-
15	IAA-94		1-300	*	*
16	NS3736		1-300	*	*

3.2 Charakterisierung des ligandengesteuerten Kationenkanals P2X₂

Da bisher ausschließlich primär und sekundär aktive Transporter mit Hilfe der SSM-Technik charakterisiert wurden [Schulz *et al.*, 2008; Ganea & Fendler, 2009], sollte weiterhin die Eignung der Methode zur Untersuchung von Ionenkanälen am Beispiel des gut charakterisierten P2X₂ Rezeptors überprüft werden.

Der P2X₂ Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Kationenkanal aus der Familie der purinergen Rezeptoren. Bei der Bindung von extrazellulärem ATP öffnet sich der Kanal und ist dann relativ unselektiv einwärts gleichrichtend permeabel für monovalente Kationen ($K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$) und Calcium [Brake *et al.*, 1994; Ding & Sachs, 1999a; North, 2002; Egan *et al.*, 2006]. Aufgrund der ATP-gesteuerten Kanalöffnung eignet sich der Rezeptor gut für die Lösungswechsel-basierte Charakterisierung mit der SSM-Technik.

3.2.1 Messung P2X₂ vermittelter Rezeptorströme

rP2X₂ wurde in einer Tetrazyclin induzierbaren stabilen HEK-293 T-RExTM Zelllinie (hergestellt von Iongate Biosciences GmbH) exprimiert. Für die Membranpräparationen wurden die Zellen in 175 cm² Kulturschalen in D-MEM Medium (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 5 µg/ml Blastocidin und 100 µg/ml Hygromycin) bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und die Expression mit 1 µg/ml Tetracyclin induziert. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Membranen gemäß Kapitel 2.6 in einem zweistufigen 9/45 Sucrose-Gradienten isoliert.

Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot überprüft, dabei konnte bei Tetrazyclin-induzierten Zellen eine Doppelbande zwischen 50 und 60 kDa detektiert werden, die bei nicht induzierten Zellen nicht vorhanden war (vgl. Abb. 3-12 C). Die Membranpräparation wurde schließlich auf SURFE²R-Sensoren angelagert (vgl. Kap. 2.8.4). Rezeptor-induzierte Ströme wurden mit Hilfe eines doppelten Lösungswechselprotokolls gemessen (Abb. 3-12 A). Vor und zwischen den Einzelmessungen erfolgte eine Inkubation der Sensoren in einer Na⁺-freien Ruhelösung (R), welche anstelle von Na⁺ 100 mM TMA⁺ enthielt. Direkt vor der Messung wurde diese gegen die nicht aktivierende 100 mM Na⁺-haltige Lösung (NA) ausgetauscht, um einen Kationengradienten zu etablieren. Bis zum Abklingen der Lösungswechselartefakte musste 5 Sekunden abgewartet werden.

Die Aktivierung des Rezeptors erfolgte schließlich durch die schnelle Applikation von 100 µM Na-ATP in Anwesenheit von Na⁺ in der aktivierenden Lösung (A). Der rezeptorvermittelte Strom wurde detektiert (Abb. 3-12 A) und der Peakstrom zur Auswertung verwendet. Im Anschluss erfolgte die Regeneration des Sensors durch die Spülung mit nicht-

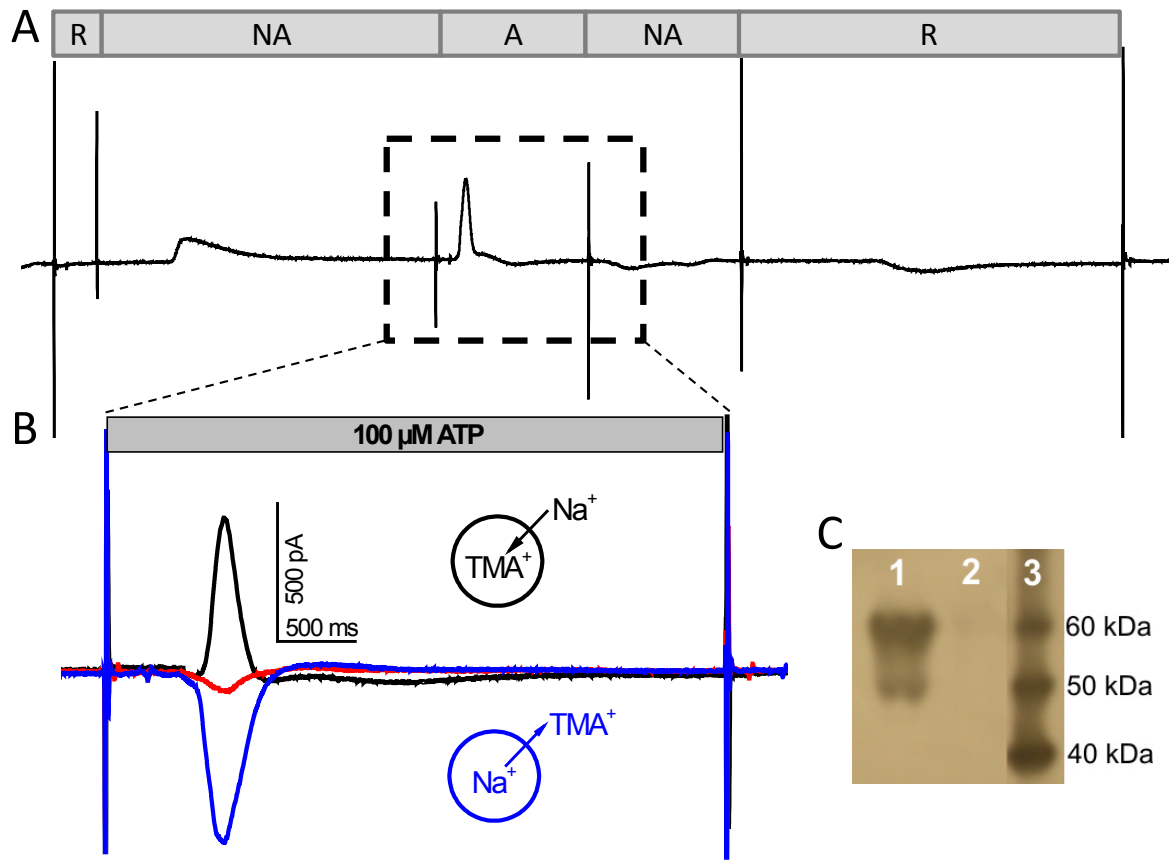


Abb. 3-12: ATP induzierter P2X₂ Rezeptorstrom. (A) Aktivierung über Doppellösungswechselprotokoll, bei dem zuerst ein Ionengradient aufgebaut (R → NA) und im zweiten Schritt der Rezeptorstrom durch Zugabe von ATP aktiviert wurde. Vor und zwischen den Einzelmessungen Inkubation der Sensoren in Na⁺-freier Ruhelösung (R), in der Na⁺ durch TMA⁺ substituiert war. Die Aktivierung erfolgte mit 100 μM Na-ATP (R: 100 mM TMACl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; NA: 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; A: 100 μM Na-ATP, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5). (B) Inversion des etablierten Gradienten (Na⁺ in R, TMA⁺ in NA & A) führte zur Inversion der Ströme (blau). (C) Western Blot mit P2X₂ Antikörper (APR-003, Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Ganzzelllysate von 1: Tetracyclin induzierte Zellen und 2: nicht induzierten Zellen. 3: Molekulargewichtsmarker MagicMark XP (Invitrogen).

aktivierender und Ruhelösung. In letzterer wurde der Sensor für mindestens eine Minute inkubiert, bis eine weitere Messung erfolgte. Zur vollständigen Regeneration wurde der Sensor innerhalb dieser Zeit nochmals für eine Sekunde mit Ruhelösung gespült.

Je nach Richtung des an den Membranen etablierten Ionengradienten (Na⁺ außen/TMA⁺ innen bzw. Na⁺ innen/TMA⁺ außen) konnten positive bzw. negative Ströme mit einer Amplitude von durchschnittlich ca. 500 pA detektiert werden (Abb. 3-12 B, schwarz bzw. blau). Erfolgte die Aktivierung des Rezeptors ohne vorherige Etablierung eines Ionengradienten (innen und außen TMA⁺), war nur ein sehr geringer negativer Strom detektierbar (Abb. 3-12 B, rot).

Nach dem Wechsel von aktivierender zu nicht aktivierender Lösung (B → A) konnte kein typischer, dem Signal entgegengesetzter Entladestrom beobachtet werden.

Das bei der Etablierung und Regenerierung des Gradienten auftretende unspezifische „Artefakt“ beim Wechsel von TMA⁺ zu Na⁺ (und umgekehrt) hatte eine Amplitude von ca. 200-300 pA und dauerte rund drei Sekunden an.

3.2.2 Spezifität der detektierten Ströme

Zur Überprüfung der Spezifität der detektierten Ströme wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt. Anstelle von Na^+ wurde ein K^+ Gradient etabliert und der Rezeptor mit demselben Protokoll wie für Na^+ aktiviert. Außerdem erfolgte die Detektion des Rezeptorstroms in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Digitoxigenin, einem potenten Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase. Dazu war Digitoxigenin allen Puffern zugesetzt und der Sensor für 10 Minuten vor der Messung in Ruhelösung + Digitoxigenin inkubiert worden.

Zwischen den einzelnen Messreihen wurde zur Kontrolle immer wieder unter Na^+ -Bedingungen gemessen.

Unter allen Bedingungen konnten im Rahmen des Messfehlers ähnliche Stromamplituden detektiert werden (vgl. Abb. 3-13).

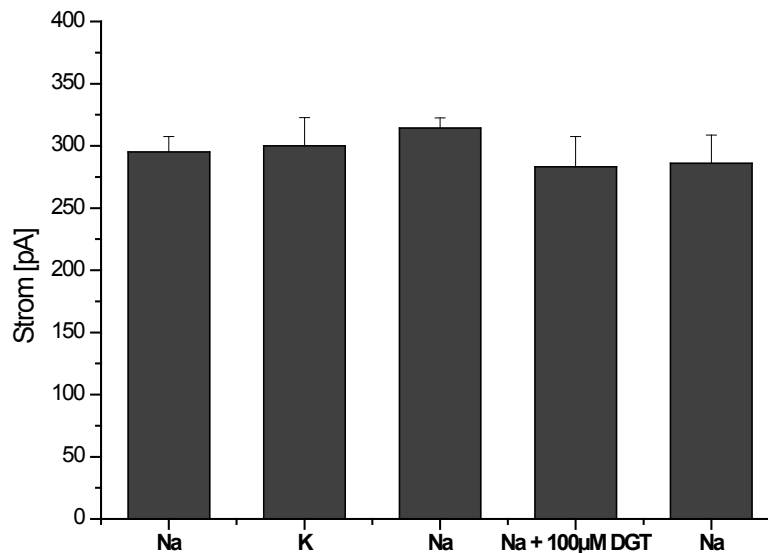


Abb. 3-13: Spezifitätskontrolle der P2X_2 vermittelten Ströme. Detektion von Rezeptor-induzierten Strömen nach Etablierung sowohl eines Na^+ als auch eines K^+ Gradienten (R: 100 mM TMACl, 2 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES, pH 7,5; NA: 100 mM KCl/NaCl, 2 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES, pH 7,5; A: $100 \mu\text{M}$ Na-ATP, 100 mM KCl/NaCl, 2 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES, pH 7,5; für K^+ -Gradient: Substitution von 100 mM NaCl durch 100 mM KCl in NA und A). Außerdem Messung von P2X_2 Strömen in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Digitoxigenin (Inkubation des Sensors vor der Messung für 10 Minuten mit $100 \mu\text{M}$ Digitoxigenin). Aufgetragen sind die gemittelten Stromamplituden und Standardabweichung ($n=5$). Unter allen Bedingungen konnten vergleichbare Ströme detektiert werden.

3.2.3 Zeitabhängige Stabilität der Ströme

Da die Aufzeichnung von Dosis-Wirkungsbeziehungen (Agonisten, Inhibitoren) für einen Konzentrationsbereich vieler wiederholter Messungen in einem großen Zeitbereich bedarf, wurde im Vorfeld die zeitliche Stabilität der Rezeptorströme nach repetitiven Aktivierungszyklen bestimmt. Dazu wurde das identische Protokoll gewählt, mit dem im Anschluss die Dosis-Wirkungsbeziehungen zu bestimmen waren.

Der P2X₂ Rezeptor wurde im Abstand von 10 Minuten jeweils 10 Mal mit 100 μ M ATP in Anwesenheit eines 100 mM Na⁺-Gradienten aktiviert, die resultierenden Ströme gemittelt und die jeweilige Standardabweichung bestimmt (Abb. 3-14).

Nach einem anfänglichen Amplitudenverlust stabilisierten sich die Rezeptor-vermittelten Ströme auf einem konstanten Niveau. Im gesamten Zeitbereich über rund 100 Einzelmessungen war ein Aktivitätsverlust von maximal rund 10% zu beobachten. Für alle folgenden Messungen wurden die ersten Messungen mit erhöhter Amplitude nicht zur Auswertung genutzt.

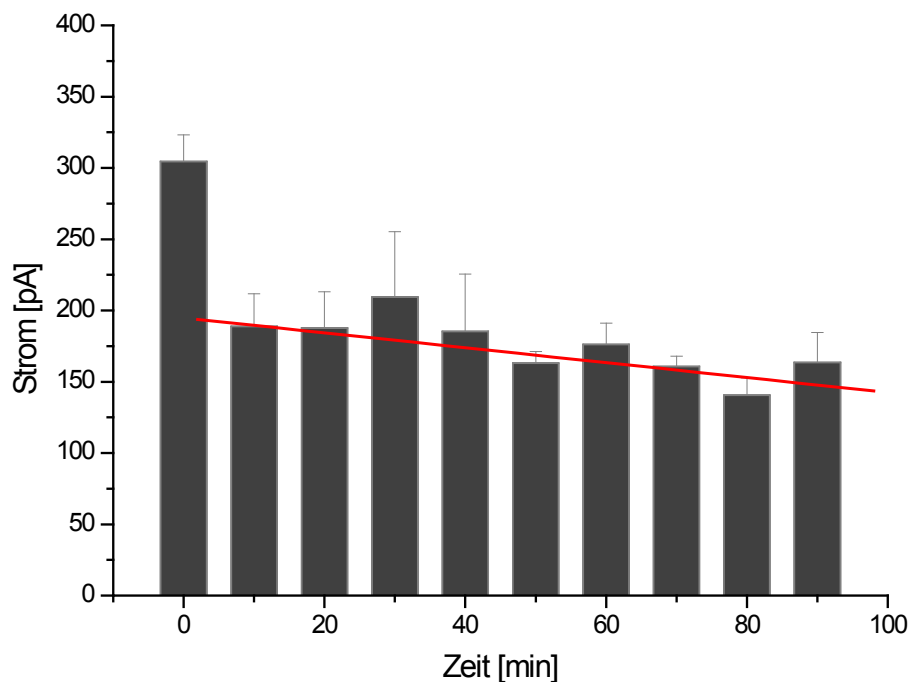


Abb. 3-14: Zeitabhängige Stabilitätsbestimmung der P2X₂ Ströme. Der Rezeptor wurde im Abstand von 10 Minuten jeweils 10 Mal mit 100 μ M ATP in Anwesenheit eines Na⁺-Gradienten (100 mM) aktiviert, ein exemplarisches Experiment ist gezeigt (n=3). R: 100 mM TMACl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; NA: 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; A: 100 μ M Na-ATP, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung der Peakströme. Rot: lineare Regression über die Messungen 10-90.

3.2.4 Na⁺-Konzentrationsabhängige Sättigung des Rezeptorstroms

Im folgenden Experiment wurde zur Bestimmung des optimalen Kationengradienten der Rezeptorstrom in Abhängigkeit steigender extravasikulärer Na⁺-Konzentrationen detektiert. Um gleichmäßige osmolare Verhältnisse während des gesamten Versuchs zu gewährleisten, wurde Na⁺ äquimolar durch TMA⁺ ersetzt und somit die Gesamt-Salzkonzentration in allen Lösungen konstant auf 300 mM eingestellt. Die Detektion der Konzentrationsabhängigkeit erfolgte durch die Etablierung unterschiedlich großer Na⁺-Gradienten mit direkt anschließender Rezeptoraktivierung durch 100 μM ATP. Für jede Gradientenkonzentration wurden 10 unabhängige Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und die entsprechenden Standardabweichungen bestimmt.

Zur Bestimmung des K_m von Na⁺ konnten die gewonnenen Daten im Anschluss mit einer Michaelis-Menten Funktion [Hille, 1992] gefittet werden, es resultierte ein K_m von $25,0 \pm 7,2$ mM, wobei die Rezeptor-vermittelten Ströme bei einem Gradienten von 100 mM Na⁺ einen Sättigungswert erreichten (Abb. 3-15). Diese Konzentration wurde für alle folgenden Messungen weiter verwendet.

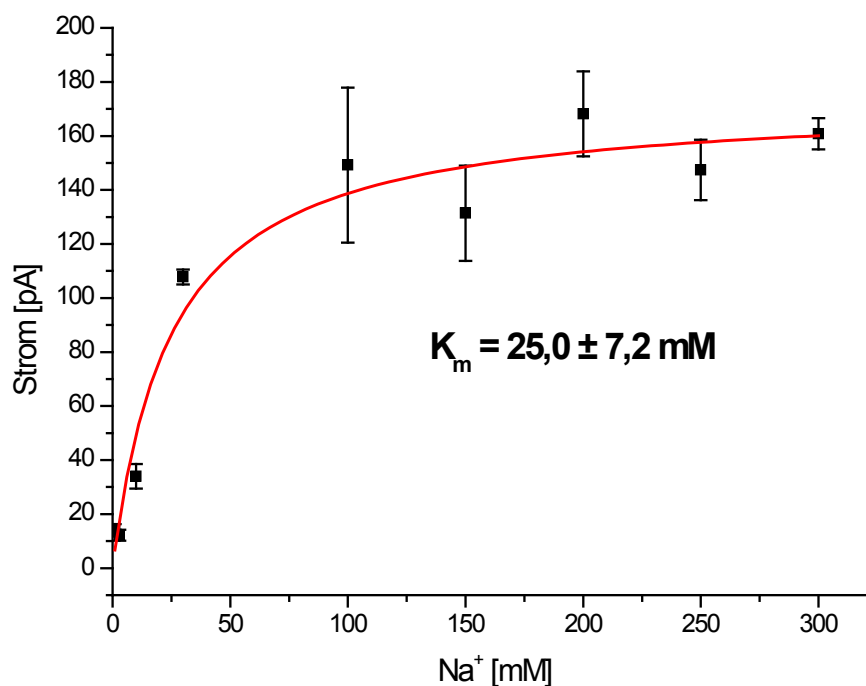


Abb. 3-15: Na⁺-Konzentrationsabhängige Sättigung des Rezeptorstroms. Bestimmung des ATP-induzierten Rezeptorstroms in Anwesenheit verschieden großer Kationengradienten. Dazu Rezeptoraktivierung nach Etablierung steigender Na⁺-Konzentrationen. R: 300 mM TMACl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; NA: 1-300 mM NaCl (mit TMACl auf 300 mM), 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; A: 100 μM Na-ATP, 1-300 mM NaCl (mit TMACl auf 300 mM), 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5. Für jede Konzentration Mittelung von 10 Einzelmessungen Bestimmung der Standardabweichung. Rot: Michaelis-Menten Fit, K_m : $25,0 \pm 7,2$ mM. Sättigung des Rezeptorstroms bei rund 100 mM Na⁺-Gradient.

3.2.5 Z'-Faktor des etablierten Assays

Als Maß für die Robustheit und Qualität eines Versuchssystems dient vor allem der Z'-Faktor, der Vorteile gegenüber der Verhältnisse wie Signal/Hintergrund oder Signal/Rauschen hat [Zhang *et al.*, 1999]. Ein Z'-Faktor >0,5 definiert dabei die Qualität eines Assays als ausreichend robust.

Zur Bestimmung wurden auf einzelnen Sensoren je 20 Aktivierung in An- und Abwesenheit eines Na⁺-Gradienten (100 mM) durchgeführt. Die gewonnenen Peakströme wurden gemittelt und die jeweilige relative Standardabweichung (STABW) bestimmt.

Aufgrund der großen Signal/Hintergrund Verhältnisse (S/B) von 10 – 15 und der relativ geringen Standardabweichungen der einzelnen Messungen (< 10%) konnten für die Sensoren Z'-Faktoren von durchschnittlich 0,67 berechnet werden, wie Abb. 3-16 zeigt.

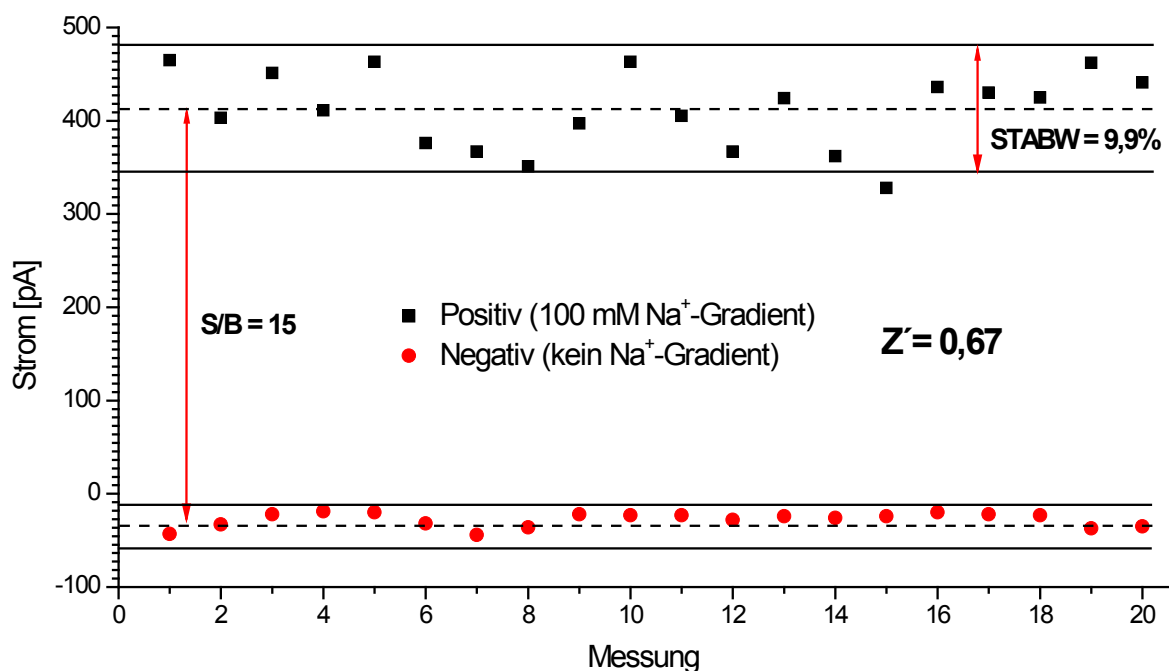


Abb. 3-16: Bestimmung des Z'-Faktors für P2X₂. Je 20 Einzelmessungen wurden in An- (■) und Abwesenheit (●) eines Na⁺-Gradienten (100 mM) durchgeführt (Puffer vgl. Kap. 2.8.6, kein Gradient = TMA⁺ in R, NA & A). Aus den gewonnenen Mittelwerten und Standardabweichungen der Peakströme wurde der Z'-Faktor auf 0,67 bestimmt. Die Messungen hatten ein Signal/Hintergrund Verhältnis von 10-15, bei relativ geringer Standardabweichung (< 10%) (n=3).

3.2.6 Einfluss der ATP-Konzentration auf den Rezeptorstrom

Zur weiteren Charakterisierung der ATP-induzierten Ströme wurde die Aktivität bei verschiedenen ATP-Konzentrationen bestimmt.

Zu diesem Zweck erfolgte die Rezeptoraktivierung mit aufsteigenden ATP-Konzentrationen im Bereich von 1-1.000 μM unter ansonsten konstanten Versuchsbedingungen (Puffer vgl. Kap. 2.8.6). Für jede ATP-Konzentration wurden 10 Einzelmessungen detektiert und die Amplitude der Peak-Ströme gemittelt. Um Messreihen verschiedener Sensoren miteinander vergleichbar zu machen, wurden die jeweiligen Konzentrationsabhängigkeiten mit einer Hill-Funktion (vgl. Kap. 2.8.7) gefittet und die Einzelwerte auf den resultierenden Sättigungsstrom (I_{max}) normiert.

Die Werte der normierten Messreihen individueller Sensoren ($n=4$) konnten im Anschluss gemittelt und die jeweilige Standardabweichung bestimmt werden. Die gemittelten Werte wurden wiederum gegen die eingesetzte ATP-Konzentration aufgetragen und mit einer Hill-Funktion gefittet, um die halb-maximale Aktivierungskonzentration (EC_{50}) zu bestimmen (Abb. 3-17). Diese konnte schließlich auf $17,4 \pm 5,5 \mu\text{M}$ bei einem Hill-Koeffizienten von $1,15 \pm 0,44$ berechnet werden.

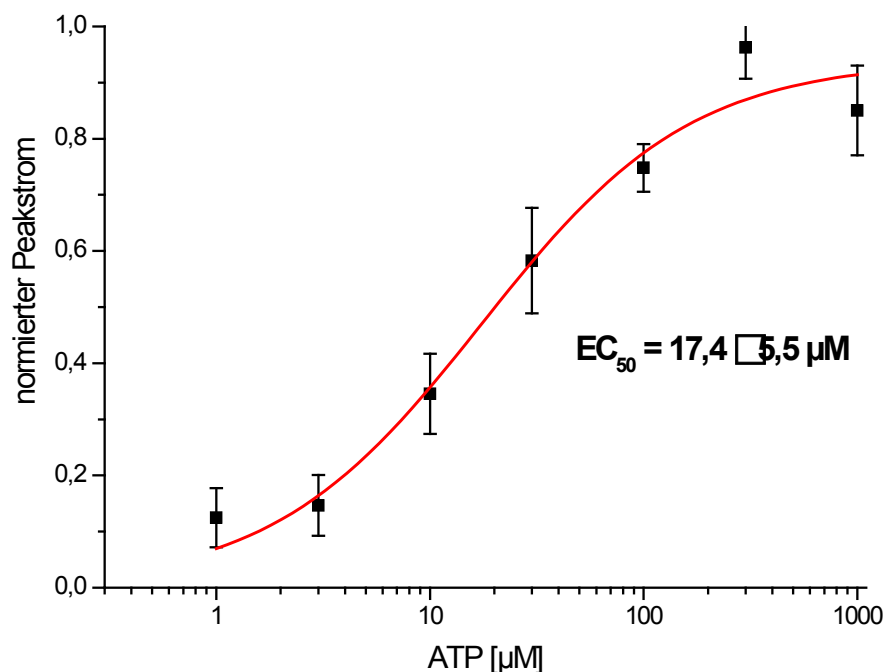


Abb. 3-17: ATP-Abhängigkeit der Rezeptorströme. Detektion von $P2X_2$ -Strömen mit aufsteigenden ATP-Konzentrationen (1-1.000 μM) unter sonst konstanten Bedingungen (R: 100 mM TMACl, 2 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES, pH 7,5; NA: 100 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES, pH 7,5; A: 1-100 μM Na-ATP, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES, pH 7,5). Normierung der einzelnen Messreihen auf den jeweiligen Sättigungsstrom, der über einen Hill-Fit bestimmt wurde. Bestimmung des EC_{50} über einen Hill-Fit (—) der normierten Konzentrationsabhängigkeit. $EC_{50} = 17,4 \pm 5,5 \mu\text{M}$ bei einem Hill-Koeffizienten von $1,15 \pm 0,44$. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichung ($n=4$).

3.2.7 Inhibition von P2X₂ durch Suramin

Zur Spezifitätsbestimmung der detektierten Signale wurden die ATP-induzierten Ströme mit einem P2X spezifischen Inhibitor (Suramin) konzentrationsabhängig moduliert.

Dazu erfolgte die Rezeptoraktivierung unter konstanten Bedingungen mit 100 μM ATP, bei einem Na⁺-Gradienten von 100 mM (Puffer vgl. Kap. 2.8.6). Zusätzlich wurde in allen Puffern (R, NA, A) aufsteigende Suramin-Konzentrationen in einem Bereich von 0,3 – 1.000 μM zugesetzt. Nach Änderung der Suramin-Konzentration folgte eine Spülung des gesamten Puffersystems mit den veränderten Bedingungen mit einer anschließenden Inkubation des Sensors für 5 Minuten in Anwesenheit der neuen Inhibitor-Konzentration. Von jeder Konzentration wurden zehn Einzelmessungen durchgeführt, deren Mittelwerte im Anschluss zur Bestimmung der relativen Inhibition auf Inhibitor-freie Kontrollmessungen zu Beginn des Experiments normiert wurden.

Die Werte der normierten Messreihen individueller Sensoren (n=6) konnten im Anschluss gemittelt und die jeweilige Standardabweichung bestimmt werden. Die Bestimmung der halbmaximalen Inhibitorkonzentration (IC₅₀) erfolgte über einen Hill-Fit und lieferte einen Wert von $6,7 \pm 0,48 \mu\text{M}$ (Hill-Koeffizient: $1,55 \pm 0,13$) (vgl. Abb. 3-18).

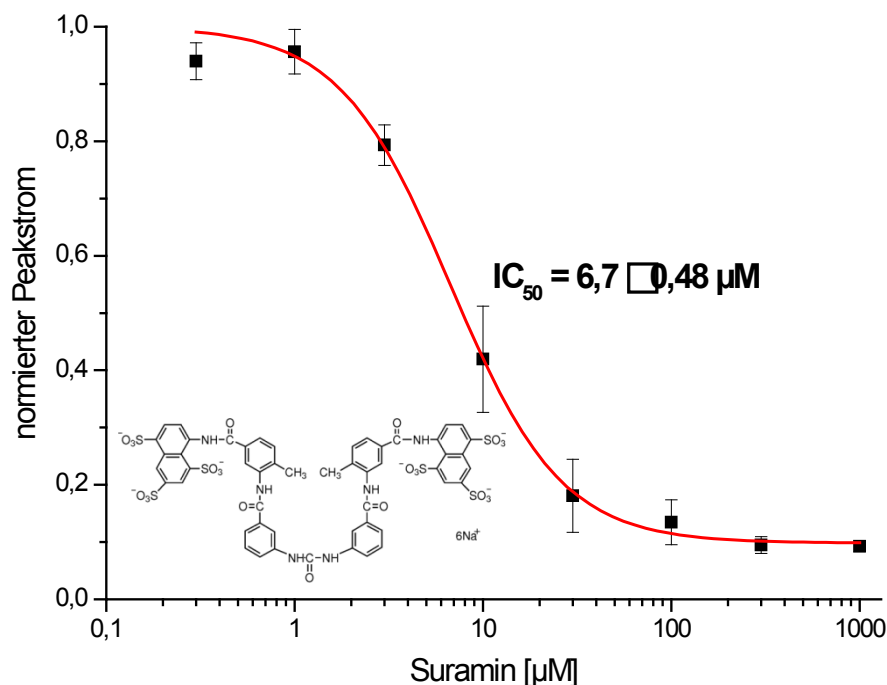


Abb. 3-18: Inhibition von P2X₂ durch Suramin. Detektion des Rezeptorstroms (R: 100 mM TMACl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; NA: 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5; A: 100 μM Na-ATP, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5), bei aufsteigenden Suramin-Konzentrationen (0,3-1.000 μM). Normierung der resultierenden Peakströme (n=10 je Konzentration) auf Suramin-freie Kontrollmessungen zu Anfang der Versuchsreihe. Bestimmung eines IC₅₀ von $6,7 \pm 0,48 \mu\text{M}$ für die gemittelten Einzelmessungen auf individuellen Sensoren über einen Hill-Fit (—) (Hill-Koeffizient: $1,55 \pm 0,13$). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=6).

3.2.8 Zeitliche Stabilität des etablierten Ionengradienten

Bei der Optimierung des geeigneten Lösungswechselprotokolls (Kap. 3.2.1) zeigte sich, dass die Stabilität der P2X₂-vermittelten Ströme stark von der vollständigen Regenerierung des etablierten Kationengradienten abhängt.

Zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität eines etablierten Gradienten wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte direkt nach einer initialen Vergleichsmessung (=0) keine Regeneration

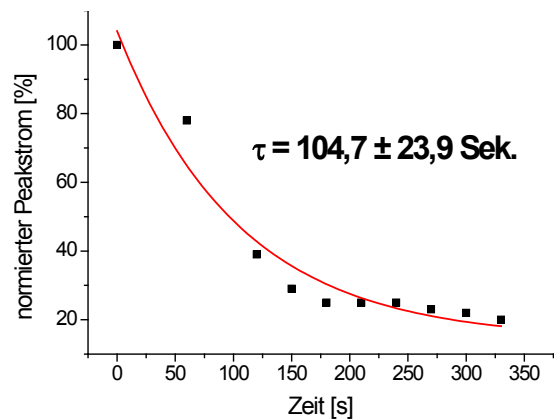


Abb. 3-19: Zeitlicher Abfall des Kationengradienten. Regelmäßige Aktivierung ohne Gradienten-Regeneration. Exponentieller Fit erster Ordnung (—) ergibt eine Zeitkonstante von $104,7 \pm 23,9$ s.

des Na⁺-Gradienten mehr, indem auf die Spülung des Sensors mit Na⁺-freier Ruhelösung (R) verzichtet wurde (Puffer: Kap. 2.8.6). Stattdessen erfolgten alle weiteren Messungen mit einem einfachen Lösungswechsel (NA-A-NA) wobei die resultierenden Peakströme mit jeder Aktivierung signifikant an Amplitude verloren (Abb. 3-19). Ein exponentieller Fit erster Ordnung lieferte für den Signal-Abfall eine Zeitkonstante (τ) von rund 100 Sekunden.

Abb. 3-20 zeigt, dass der Abfall weniger zeit- als aktivierungsabhängig war. Erfolgt im selben Zeitbereich nur wenige Aktivierungen (hellgrau), war der Signal-Abfall deutlich geringer. Die resultierenden Amplituden der beiden Aktivierungsprotokolle sinken in Abhängigkeit der Aktivierungshäufigkeit vergleichbar schnell (Abb. 3-20 Einfügung).

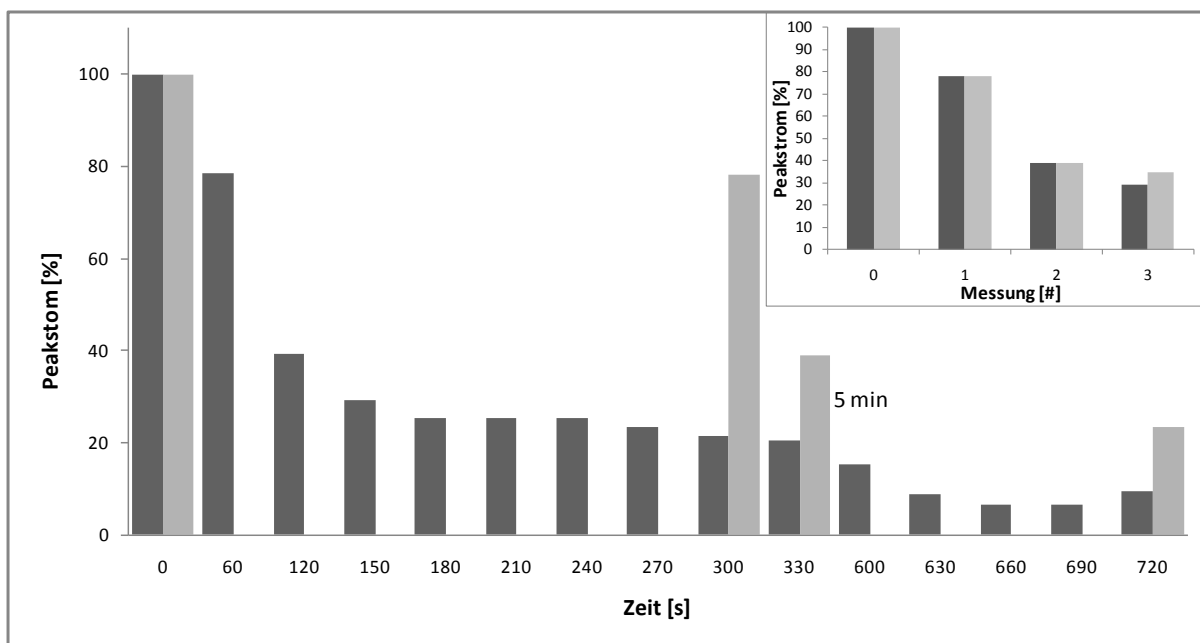


Abb. 3-20: Aktivierungsabhängiger Abfall des Kationengradienten. Während die Signalamplitude bei regelmäßiger Aktivierung ohne Gradienten-Regeneration schnell sinkt (dunkelgrau), bleiben die Peakströme ohne repetitive Aktivierung im gleichen Zeitbereich relativ stabil (hellgrau). Die Amplituden sinken bei beiden Versuchen in Abhängigkeit der Aktivierungshäufigkeit vergleichbar schnell (Einfügung).

3.3 Lichtgesteuerte Spannungskontrolle an der SSM

Anhand der Untersuchungen am P2X₂ konnte gezeigt werden, dass es mit der SSM-Technik prinzipiell möglich ist, Ionenkanäle zu charakterisieren. Da im konventionellen elektrophysiologischen Experiment (Patch-Clamp, TEVC) der Transport über Kanäle üblicherweise jedoch über eine extern applizierte Spannung getrieben wird und viele spannungsgesteuerte Kanäle überhaupt erst bei definierten Spannungen öffnen, wäre es wünschenswert, Untersuchungen an der SSM unter vergleichbaren Voraussetzungen durchzuführen. Weil das direkte Anlegen einer externen Spannung aufgrund der elektrischen Konfiguration des kapazitiv gekoppelten Membranverbunds nicht möglich ist (vgl. Kap. 4.3), wurde in diesem Projekt versucht, die Licht getriebene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (bR) [Oesterhelt & Stoeckenius, 1973] als „Stromquelle“ zur Generation einer Membranspannung einzusetzen. Dazu sollte bR zusammen mit dem Chloridkanal ClC-Ka in CHO-Zellen koexprimiert werden, so dass in den resultierenden zu präparierenden Membranvesikeln bzw. -fragmenten beide Proteine in derselben Membran vorlagen.

3.3.1 Koexpression von ClC-Ka (+Barttin) & Bakteriorhodopsin in CHO

Eine CHO-Zelllinie, die ClC-Ka zusammen mit seiner funktionellen Untereinheit Barttin (vgl. Kap. 1.2.2) stabil exprimierte (im bipromotorischen Vektor pBudCE4.1, Invitrogen) war bereits im Labor (AG Fendler) vorhanden. In diese Zelllinie, die schon eine Zeocin-Resistenz aufwies (150 µg/ml), wurde zusätzlich bR als Fusionsprotein mit einem 105 Aminosäuren-Fragment der β -Untereinheit der H⁺/K⁺-ATPase (N-terminal) [Geibel *et al.*, 2001] und EGFP (C-terminal) im Vektor pEGFP-N3 transfiziert. Nach der Generierung einer stabil exprimierenden Zelllinie über G418 (300 µg/ml), folgte eine Einzelzellklonierung zur Selektion der potentesten Klone (vgl. Kap. 2.3.7). Die Expression wurde dabei über die EGFP Fluoreszenz kontrolliert. Die Selektion des besten Klons erfolgte in Hinblick auf stärkste Proteinexpression (=EGFP-Fluoreszenz) und Plasmamembran-Lokalisation.

Eine detaillierte Einsicht in die Lokalisation verschafften konfokale Aufnahmen (LSM 510) der EGFP Fluoreszenz. Es stellte sich heraus, dass in allen analysierten Klonen eine hohe Expression des bR-EGFP Fusionsproteins vorlag, ein Großteil dessen jedoch in intrazellulären Kompartimenten verblieb und nur wenig Protein in der Plasmamembran zu detektieren war (Abb. 3-21 A). Dennoch konnten im Patch-Clamp Experiment in der Ganz-Zell-Konfiguration nach Aktivierung mit einem grünen (532 nm) Dauerstrichlaser (DPSS, 100 mW, Pusch Optotech GmbH, Baden-Baden) bR vermittelte, auswärts gerichtete, stationäre Pumpströme (bei 0 mV, symmetrische Ionenverhältnisse, vgl. Abb.-Beschriftung)

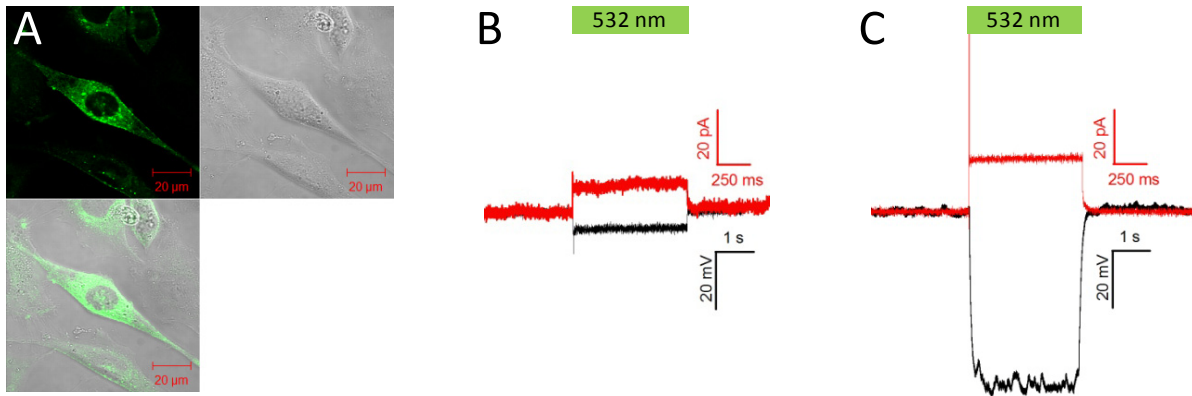


Abb. 3-21: Generierung der CIC-Ka/bR Zelllinie. (A) Konfokale Fluoreszenzaufnahme (Ex: 488 nm, Em: 525/25 nm) des selektierten Einzelklons. Hohe Expression des bR-EGFP Fusionsproteins, jedoch nur geringe Lokalisation in der Plasmamembran. (B) Patch-Clamp Messung der Zelllinie in der Ganz-Zell-Konfiguration. Aktivierung des bR-Pumpstroms bei 532 nm (DPSS, 100 mW). Pipettenlösung: 140 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,5. Badlösung: 140 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,5. (Typische Pipettenwiderstände: 2–4 MΩ). Rot: Der Pumpstrom bei 0 mV beträgt max. 10 pA (~1 pA/pF), während durch bR Potentialänderungen von 5-10 mV generiert werden. (C) Mit bR-EGFP transient transfizierte HEK-293 Zellen. Identisches Messprotokoll wie in B. Pumpstrom: 20 pA (~2 pA/pF), Potentialänderung: durchschnittlich 20 mV bis max. 60 mV.

mit einer Amplitude von max. 10 pA (~1 pA/pF) detektiert werden (Abb. 3-21 B, rot).

Zur Bestimmung der durch die bR-Pumpströme bedingten Potentialänderungen wurden dieselben Zellen unter konstanten Bedingungen im *current-clamp*-Modus ($I=0$) gemessen (Abb. 3-21 B, schwarz). Nach Aktivierung mittels grünen Lasers waren (negative) Spannungsänderungen im Bereich von durchschnittlich 5-10 mV detektierbar, die über den gesamten Zeitbereich der Belichtung konstant blieben.

An transient mit β -HK-bR-EGFP transfizierten HEK-293 Zellen konnten vergleichsweise größere bR-Pumpströme von ~20 pA (2 pA/pF) gemessen werden, die eine durchschnittliche Potentialänderung von ca. 20 mV, bei einzelnen Zellen bis zu 60 mV, bedingten (Abb. 3-21 C).

Die generierte Zelllinie wurde schließlich in Rollerflaschen mit je 1.700 cm² Kulturfläche (Cellroll, Integra Biosciences, Fernwald) kultiviert, um Zellmassen von 1-2 g Feuchtgewicht zu gewinnen. Die Membranpräparation erfolgte wie in Kap. 2.6 beschrieben, abweichend jedoch über einen nur zweistufigen 9/45%-Sucrosegradienten.

3.3.2 Entwicklung der kombinierten Licht-/Lösungswechselaktivierung

Um die gewonnenen Membranpräparationen elektrophysiologisch charakterisieren zu können, war zuerst die Entwicklung der geeigneten technischen Voraussetzungen nötig, die es ermöglichte, sowohl Licht- als auch Lösungswechsel-getriebene Proteine gleichzeitig an der SSM zu untersuchen. Dazu wurden drei verschiedene Küvetten-Systeme getestet. Die Aktivierung von bR erfolgte bei allen Systemen über eine 100 W HBO-Lampe (in Verbindung mit einem LP495 nm *cut-off* Filter), die auf einer optischen Bank in eine geschirmte Lichtfaser ($A=1 \text{ mm}^2$) eingekoppelt wurde. Die Lichtleistung am Ende der Faser betrug mit diesem Aufbau max. 15 mW/mm^2 . Die Belichtungssteuerung konnte dabei über einen TTL-gesteuerten Shutter realisiert werden, der im Strahlengang platziert war und über die Ventilsteuerung der SSM angesprochen wurde. Somit war es möglich, die Lichtaktivierung in der SSM-Kontroll-Software wie ein klassisches Ventil zu koordinieren.

1. Klassische horizontale SSM-Küvette

Zu Beginn kam eine klassische horizontale SSM-Küvette zum Einsatz (Abb. 3-22 A), bei der an Stelle des Pufferzulaufs der Lichtleiter zentral über dem 1 mm SSM-Sensor platziert war. Der Lösungswechsel wurde über die Pfade realisiert, die normalerweise zum Abfluss der Lösung bzw. zur Kontaktierung der Referenzelektrode genutzt werden (Abb. 3-22 A zu= Zufluss; ab=Abfluss). Als Referenzelektrode wurde eine Silber/Silberchlorid-Elektrode genutzt, die über eine Salzbrücke in den Abflusspfad integriert war. Bei dieser Küvette konnte der Messeinsatz, bestehend aus der gesamten Lichtleiter/Lösungswechsel-Einheit, nach oben hin entnommen werden, so dass eine Kavität ähnlich der SURFE²R One Sensoren entstand und die Proteinanlagerung wie zuvor beschrieben, jedoch ohne die Möglichkeit der Zentrifugation erfolgte. Nach dem Aufbau der SSM auf der Gold-Elektrode und der Anlagerung der Membranen für eine Stunde wurde der Messeinsatz, der über zwei O-Ringe die Küvette abdichtete, wieder eingesetzt und die Küvette in das SSM-Setup integriert.

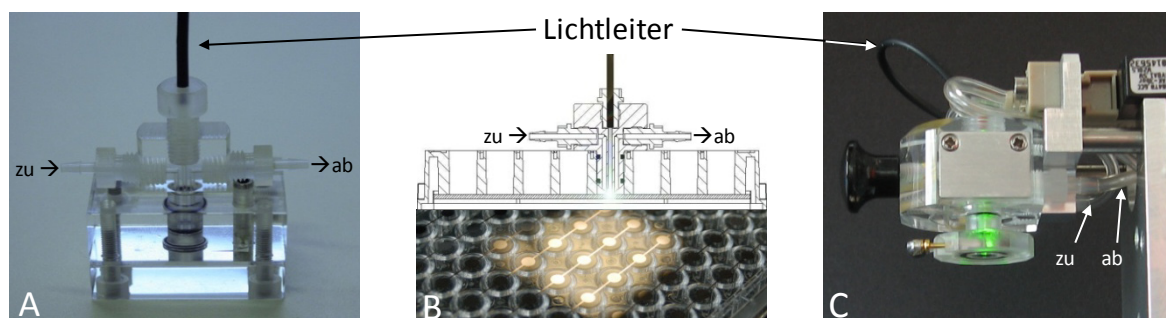


Abb. 3-22: Eingesetzte Küvetten zur kombinierten Licht-/Lösungswechselaktivierung. (A) Klassische horizontale SSM-Küvette mit Messeinsatz. Sensorgröße: 1 mm. (B) Vergleichbarer Messeinsatz zu A, jedoch zum Einsatz in 96-Well Sensorplatten. Sensorgröße: 3 mm. (C) Modifizierte SURFE²R One Küvette. Sensorgröße: 3 mm. Jeweils zentraler Pufferzulauf durch Lichtleiter ($A=1 \text{ mm}^2$) ersetzt und Lösungswechsel über seitliche Pfade.

Im Gegensatz zu den SURFE²R One Sensoren, bei denen die aktive Goldfläche einen Durchmesser von 3 mm hat, wiesen die SSM-Sensoren einen Durchmesser von 1 mm auf. Die Messungen mit dieser Konfiguration lieferten nur sehr kleine positive bR Ströme im Bereich von wenigen pA nach Lichtaktivierung (Abb. 3-23 A, rot). Chlorid-abhängige Signale nach einem Lösungswechselprotokoll (NA-A-NA, 30 mM Cl⁻) konnten nicht detektiert werden. Außerdem war die Präparation der SSM und Anlagerung der Membranen mit dieser Küvette nur schwer reproduzierbar, die Sensoren wiesen oft sehr hohe Leitfähigkeiten auf und waren somit nicht zur Messung zu verwenden.

2. 96-Well Sensorplatte 3 mm

Zur Vergrößerung der aktiven Sensorfläche wurde daher ein vergleichbarer Messeinsatz, der auf die Dimensionen der Kavitäten einer 96-Well Platte abgestimmt war, verwendet.

Dieser Messeinsatz konnte mit Sensorplatten, die für die Verwendung in SURFE²R Workstation Systemen konzipiert wurden, genutzt werden. Die Platten wiesen eine aktive Sensorfläche von 3 mm auf. Außerdem konnten die Platten wie SURFE²R One Sensoren zur Proteinanlagerung mit einem entsprechenden Rotoren-Einsatz zentrifugiert werden (vgl. Kap. 2.8.4). Die gesamte Messung und Steuerung erfolgte jedoch wie zuvor in einem klassischen SSM-Setup. Direkt nach Anlagerung der Membranen konnten mit dieser Konfiguration wesentlich größere bR-Pumpströme von rund 80-100 pA detektiert werden (Abb. 3-23 A, schwarz). Die Ströme hatten eine positive Amplitude und fielen innerhalb von ca. einer Sekunde auf einen relativ konstanten geringen stationären Strom ab. Nach Abschalten der Lichtquelle war ein negativer transients Strom geringer Amplitude detektierbar.

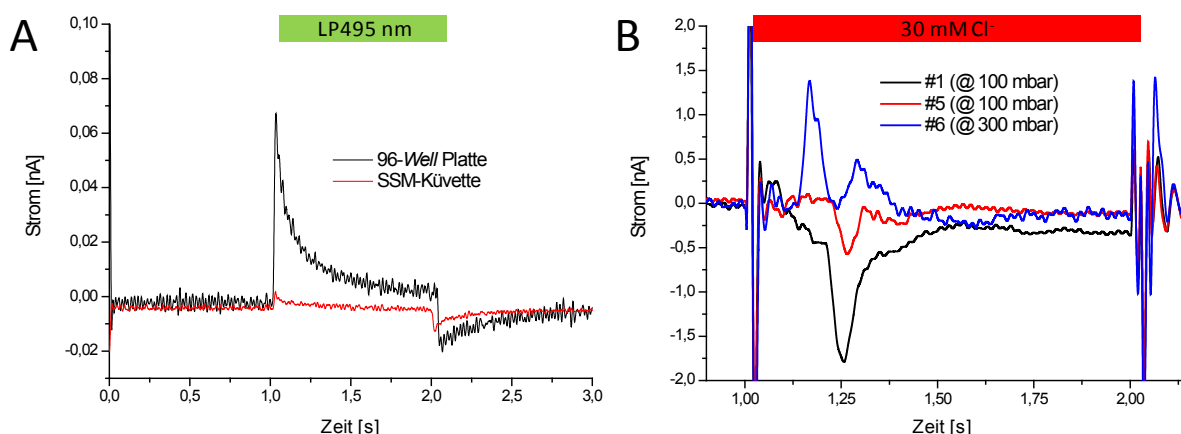


Abb. 3-23: Licht- & Lösungswechsel-aktivierte Ströme mit SSM-Messeinsatz. (A) Lichtaktivierte (100 W HBO, LP495 nm) bR-Pumpströme an 1 mm (rot) und 3 mm (schwarz) Sensoren. Auf 3 mm Sensoren wesentlich größere Ströme (80-100 pA) als auf 1 mm Sensoren (3-8 pA). (B) CIC-Ka Ströme nach Lösungswechsel (NA-A-NA, je 1 s, 30 mM Cl⁻) auf 3 mm Plattensensor. Ströme verlieren nach Lösungswechsel mit geringem Druck (100 mbar) stetig an Amplitude. Bei Aktivierung mit einem Druck von 300 mbar kein CIC-Ka Strom messbar, nur sehr großes Lösungswechsel-Artefakt. Außerdem starke fluidische Störungen auf Signalen.

Wurden die Sensoren jedoch beim Lösungswechsel mehrfach mit Puffern überspült, verloren die bR-Ströme stark an Amplitude, bis schließlich keine Signale mehr zu detektieren waren. Dieses Verhalten war selbst bei geringen Drücken von 100 mbar (entspricht einer Flussrate von ca. 1,5 ml/s) zu beobachten.

Auch CIC-Ka bedingte Ströme konnten auf diesen Sensoren (Lösungswechselprotokoll: NA-A-NA, je 1 s, 100 mbar, 30 mM Cl⁻) mit anfangs großen Amplituden von bis zu 2 nA detektiert werden. Jedoch fielen auch diese stetig bei mehrfacher Aktivierung ab (Abb. 3-23 B: schwarz = 1. Messung, 2 nA; rot = 5. Messung, 500 pA). Außerdem wiesen die Ströme bei einem geringen Druck von 100 mbar starke fluidische Störungen und einen sehr langsamen Anstieg der Transienten von über 200 ms auf.

Bei moderaten Drücken von 300 mbar waren keine negativen CIC-Ka Ströme mehr detektierbar. An Stelle dessen trat ein positives Lösungswechsel-Artefakt auf (Abb. 3-23 B, blau) und die Kapazität der Sensoren vergrößerte sich stark.

3. Modifizierte SURFE²R One Küvette

Zur Optimierung des Lösungswechsels kam schließlich eine modifizierte SURFE²R One Küvette zum Einsatz. Bei dieser war der zentrale Pufferzufuhrpfad durch den Lichtleiter ersetzt, der somit wieder mittig über dem Sensor platziert war. Zur Messung konnten die üblichen SURFE²R One 3 mm Sensoren verwendet werden. Der Lösungswechsel erfolgte über die seitlichen Ablaufpfade, wobei die Lösungszufuhr über den standardmäßigen Referenz-Elektroden-Pfad realisiert wurde. Die ITO¹⁹-Referenzelektrode musste dazu in einen Parallelpfad des Ablaufs integriert werden, dabei stand die Elektrode über die elektrolythaltigen Puffer im Leitungssystem ständig in Kontakt mit der Sensor-überspülenden Lösung. Um Potentialstörungen der Referenzelektrode zu vermeiden, durften beim Lösungswechsel die alterierenden Puffer aber nicht direkt an dieser vorbei fließen.

Während die lichtinduzierten bR-Pumpströme mit ca. 100-150 pA vergleichbar zur denen der Plattensensoren waren (Abb. 3-24, rot), konnte mit dieser Konstruktion die Qualität des Lösungswechsels deutlich verbessert werden. Die generierten CIC-Ka Stromamplituden wurden nicht durch repetitive Lösungswechsel beeinflusst und blieben stabil bei absoluten Werten um 1 nA. Auch die Zeitauflösung war mit ca. 100 ms nur um einen Faktor von zwei im Vergleich zur klassischen SURFE²R One Küvette (50 ms) verändert (Abb. 3-24, schwarz). Alle folgenden Messungen wurden daher mit der modifizierten SURFE²R One Küvette durchgeführt.

¹⁹ ITO: Indiumzinnoxid

3.3.3 Modulation von CIC-Ka mittels bR-induziertem Potential

Mit Hilfe der modifizierten SURFE²R One Kuvette konnte nun der Einfluss eines bR-induzierten Membran-Potentials auf die CIC-Ka Ströme untersucht werden. Dazu wurde CIC-Ka durch einen einfachen Lösungswechsel (NA-A-NA, je 2 s, 250 μ l/s) mit 30 mM Cl⁻ aktiviert. Gleichzeitig konnten die bR vermittelten Pumpströme durch Belichtung über die zentrale Lichtfaser gesteuert werden. Die Belichtung erfolgte für zwei Sekunden bevor die aktivierende Lösung den Sensor erreichte und wurde bis zum Ende der Aktivierung (A \rightarrow NA) aufrecht erhalten. Da die bR Ströme bei repetitiver Aktivierung eine gewisse Regenerationszeit benötigten, bis sich die Ausgangsamplituden wieder eingestellt hatten, wurde zwischen den Einzelmessungen eine Ruhe-Zeit von mindestens einer Minute eingehalten. Der Vergleich der Ströme (Abb. 3-24 A) mit (rot) und ohne (schwarz) bR-induziertes Potential zeigt, dass das durch bR generierte Membranpotential keinen signifikanten Einfluss auf die CIC-Ka Ströme hatte. Die bR Ströme waren außerdem mit einer Amplitude von \sim 100 pA einen Faktor von 10 kleiner als die CIC-Ka Ströme mit \sim 1 nA.

Zur Anpassung der absoluten Ströme auf vergleichbare Amplituden wurde die aktivierende Chloridkonzentration von 30 mM auf 1 mM gesenkt. Dies reduzierte die CIC-Ka Ströme auf ca. 150-200 pA und somit in den Größenbereich der bR Pumpströme. Jedoch war auch unter diesen Bedingungen keine Modulation des CIC-Ka Stroms festzustellen (Abb. 3-24 B).

Selbst der Einsatz eines leistungsstarken grünen DPSS-Lasers (432 nm, 100 mW), mit dem im Vergleich zur 100 W HBO-Lampe deutlich höhere Lichtleistungen am Lichtleiterausgang zu erreichen waren (HBO = \sim 15 mW, Laser = $>$ 50 mW), konnte die Peakamplitude der bR-Pumpströme nur auf maximal 200 pA steigern (Abb. 3-25, blau). Auch unter diesen Bedingungen war keine signifikante Modulation der CIC-Ka Ströme feststellbar.

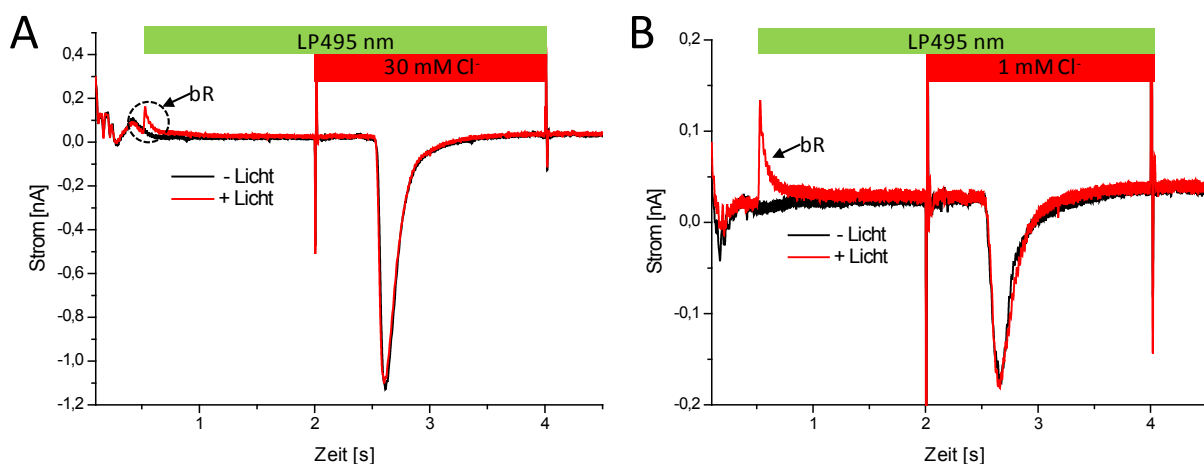


Abb. 3-24: Modulation von CIC-Ka durch bR-induziertes Potential. (A) CIC-Ka Ströme, aktiviert durch 30 mM Cl⁻-Sprung (NA-A-NA) mit (rot) und ohne (schwarz) gleichzeitig bR-induziertem Membranpotential. Aktivierung von bR von zwei Sekunden vor dem Lösungswechsel bis zum Ende der CIC-Ka Aktivierung. (B) Reduktion der aktivierenden Chloridkonzentration von 30 mM auf 1 mM. Identisches Messprotokoll. Jeweils keine signifikante Modulation der CIC-Ka Ströme durch bR induziertes Membranpotential detektierbar.

3.3.4 Fusion von bR-Purpurchmembranen in CIC-ec1 Liposomen

Zur quantitativen Abschätzung der messbaren bR-Ströme in der CIC-Ka/bR Membranpräparation wurde zum Vergleich 1 μ l (bR-Konzentration: 4 mg/ml) einer bR-Purpurchmembranpräparation (PM) aus *Halo-bacterium Halobium* [Oesterhelt & Stoeckenius, 1974] nach identischem Protokoll angelagert und mittels HBO-Lampe aktiviert.

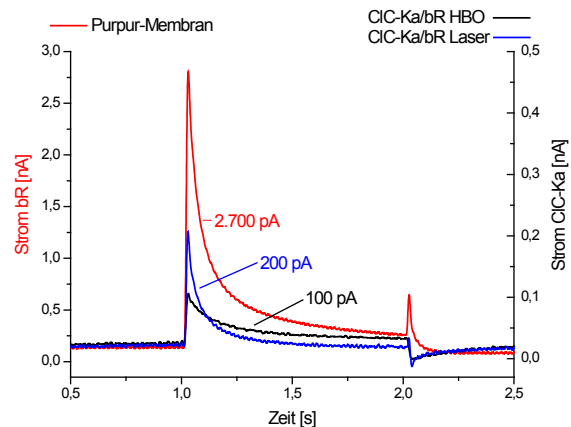


Abb. 3-25: Vergleich CIC-Ka/bR & Purpurchmembran.

Während die CIC-Ka/bR-Präparation bei HBO-Aktivierung nur maximale Pumpströme von \sim 100 pA lieferte und auch der Einsatz des wesentlich leistungsstärkeren DPSS-Lasers nur eine Steigerung auf \sim 200 pA brachte, konnten mit der angelagerten Purpurchmembranpräparationen Peakamplituden von bis zu 3.000 pA (HBO) detektiert werden (Abb. 3-25). Mit beiden Lichtquellen war keine intensitätsabhängige Sättigung der Peakströme zu erreichen (nicht gezeigt).

Um die wesentlich größeren Pumpströme der Purpurchmembranpräparation für die Fragestellung zu nutzen, wurde im Folgenden ein Protokoll zur Fusion von Purpurchmembranfragmenten mit Proteoliposomen angewandt [Perozo & Hubbell, 1993; Lorch *et al.*, 2005]. Dazu wurden CIC-ec1 enthaltende Liposomen (LPR=10) mit Purpurchmembranen (4 mg/ml) gemischt (10 μ l Liposomen + 1 μ l PM), in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei Raumtemperatur für 15 Minuten aufgetaut.

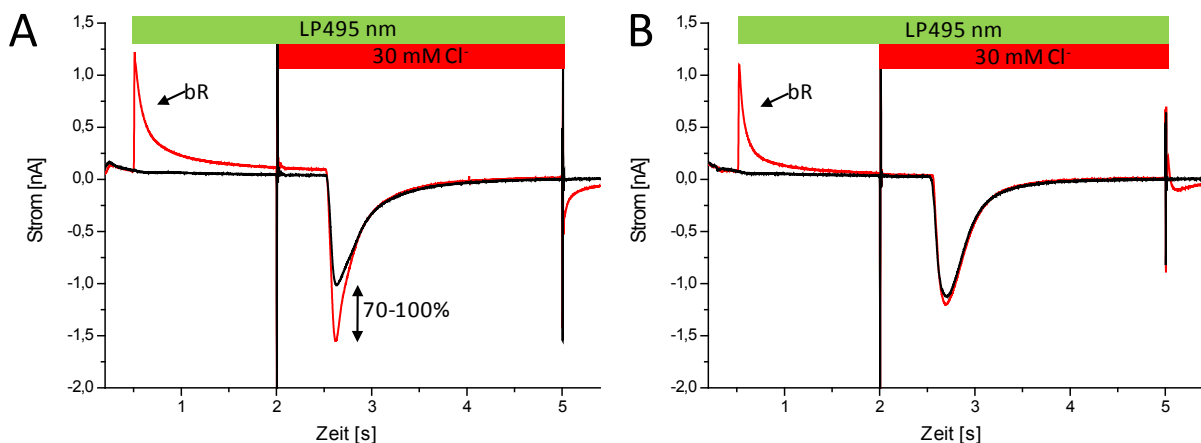


Abb. 3-26: Modulation von CIC-ec1 durch bR in fusionierten Purpurchmembran-Proteoliposomen. (A) Durch freeze-thaw [Perozo & Hubbell, 1993] mit bR-Purpurchmembranen fusionierte CIC-ec1 Proteoliposomen. Identisches Aktivierungsprotokoll wie bei CIC-Ka/bR. Das bR induzierte Membranpotential verstärkt die CIC-ec Ströme um 70-100%. (B) Kontrolle: Identische Sensorpräparation und Aktivierung, jedoch ohne freeze-thaw Fusion. Kein Einfluss des bR induzierten Membranpotentials auf CIC-ec1 Ströme nachweisbar.

Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt (*freeze-thaw*), bevor die Suspension 30 Sekunden lang im Ultraschallbad beschallt und anschließend auf den Sensoren angelagert wurde.

Die Aktivierung von bR und CIC-ec1 erfolgte nach demselben Protokoll wie bei den CIC-Ka/bR Messungen, die einzige Änderung war die Verlängerung der aktivierenden Phase des Lösungswechsels auf 3 Sekunden, um die CIC-ec1 Ströme vollständig abklingen zu lassen.

Unter diesen Bedingungen waren CIC-ec1 Ströme mit einer durchschnittlichen Amplitude von 1 nA detektierbar, die bR Ströme erreichten vergleichbare Amplituden (3 nA) wie die Präparation der reinen Purpurmembranen.

Sobald bR während des Lösungswechsels aktiviert wurde, konnte eine Vergrößerung der CIC-ec1 Ströme um einen Faktor von 1,7 bis 2 beobachtet werden (Abb. 3-26 A). Zur Kontrolle wurden die Liposomen und Purpurmembranfragmente unabhängig nach derselben *freeze-thaw* Methode behandelt, die beiden Präparationen jedoch erst direkt vor der Anlagerung vereint. Unter diesen Umständen waren ähnliche Amplituden der beiden Proteine detektierbar. Die bR-Aktivierung während des Lösungswechsels hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das CIC-ec1 Signal (Abb. 3-26 B).

Die Variation der Lichtintensität (durch Graufilter) im Bereich von 1-100% zeigte, dass die bR Ströme mit steigender Intensität ohne erkennbare Sättigung zunahmen, während sich bei den CIC-ec1 Peakströmen ein Sättigungsverhalten ab ca. 25% Transmission einstellte.

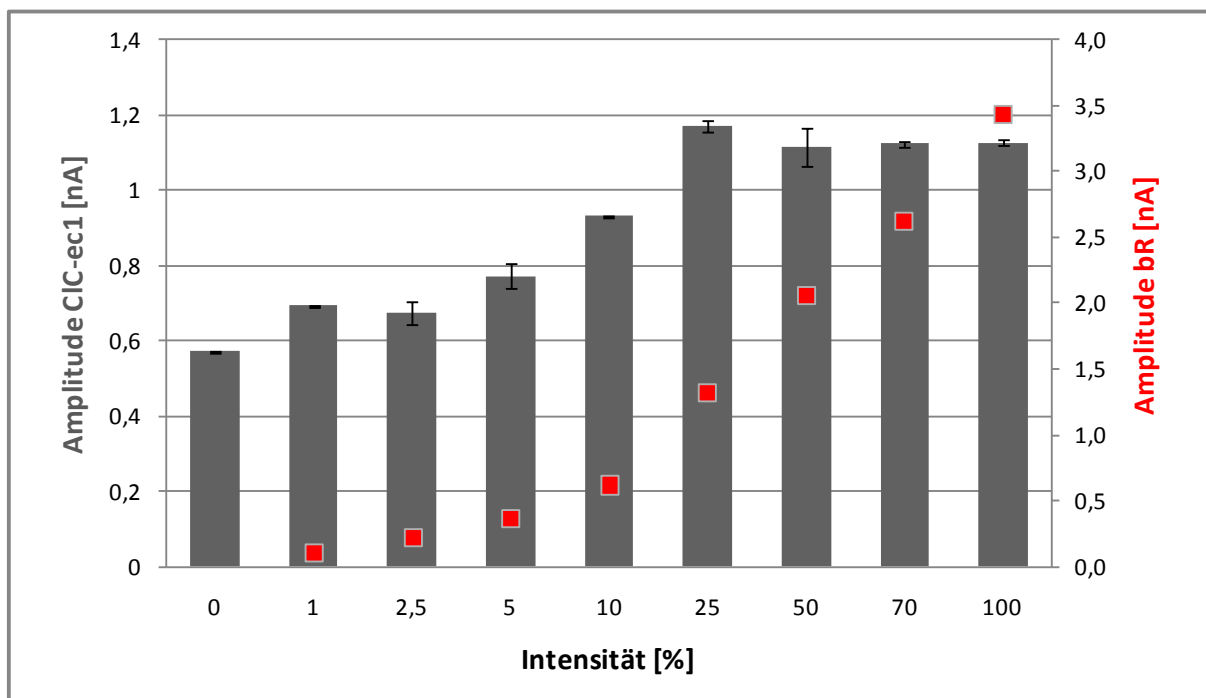


Abb. 3-27: Lichtabhängigkeit der CIC-ec1 Modulation. Einstellen der Lichtintensität mit Graufiltern (1-100%). Stetige Vergrößerung der bR Peakströme (■) mit steigender Lichtintensität, während die CIC-ec1 Peakströme ab ca. 25% Transmission eine Sättigung erreichen. Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils drei CIC-ec1 Strömen pro Graufilter.

Außerdem zeigt dieses Experiment (Abb. 3-27), dass ein signifikanter modulierender Einfluss durch bR auf CIC-ec1 erst ab einer Transmission von rund 25% detektierbar ist, was einer bR Peakstromamplitude von ~500 pA entspricht. Das Sättigungsverhalten von CIC-ec1 tritt bei einer bR Amplitude von ~1 nA auf.

Analysiert man durch Integration des Stromverlaufs die translokierte Ladung (Q) in Abhängigkeit der Lichtintensität wird deutlich, dass, obwohl die Peakamplituden der bR-Ströme bei steigender Transmission weiter zunehmen (maximal ~3,5 nA), die translokierte Ladung ein Sättigungsverhalten mit einem Maximum von $0,49 \pm 0,02$ nC aufweist (Abb. 3-28 B).

Um die zeitliche Stabilität des induzierten Membranpotentials nach „Deaktivierung“ von bR zu untersuchen, wurde die Lichtquelle zu verschiedenen Zeitpunkten vor Aktivierung des CIC-ec1 Transporters abgeschaltet. Da es nach Abschaltung bzw. nach dem Schließen des Shutters zu einem Entladestrom des bR-Signals kommt, musste eine Wartezeit von mindestens 500 ms eingehalten werden, um Überschneidungen mit den CIC-ec1 Signalen zu vermeiden. Abb. 3-28 C zeigt, dass bereits ca. 3 Sekunden nach Abschaltung kein modulierender Effekt auf die CIC-ec1 Ströme mehr messbar war. Für den Potentialabfall konnte eine Zeitkonstante (τ) von $1,45 \pm 0,27$ Sekunden über einen monoexponentiellen Fit ermittelt werden.

Während mit Wildtyp bR ausschließlich Pumpströme mit positiver Amplitude und somit auch positive Potentiale zu realisieren waren, konnte die Vektorialität der Pumpströme beim Einsatz der bR-Mutante D85T über die Wellenlänge des aktivierenden Lichts gesteuert werden. Wenn diese bR-Mutante mit „blauem“ Licht (Breitband-Interferenz-Filter K40: $360 < \lambda > 420$ nm) bestrahlt wurde, waren wie beim Wildtyp positive Ströme detektierbar, die jedoch eine wesentlich geringere Peakamplitude von maximal 100 pA aufwiesen (Abb. 3-28 D, rot). Bestrahlte man die Mutante mit „weißem“ Licht (*cut-off* Filter: LP360 nm) konnten negative Ströme mit einer Peakamplitude von 250-300 pA gemessen werden (Abb. 3-28 D, schwarz). Diese Amplituden wurden nur bei einer fünffach erhöht eingesetzten bR-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp erreicht.

Weder bei Aktivierung mit weißem noch mit blauem Licht konnte ein Einfluss bR-induzierter Potentiale auf CIC-ec1 Ströme detektiert werden, wenn die Mutanten-Purpurchmembranen nach identischem Protokoll mit den CIC-ec1 Liposomen fusioniert und gemessen wurden.

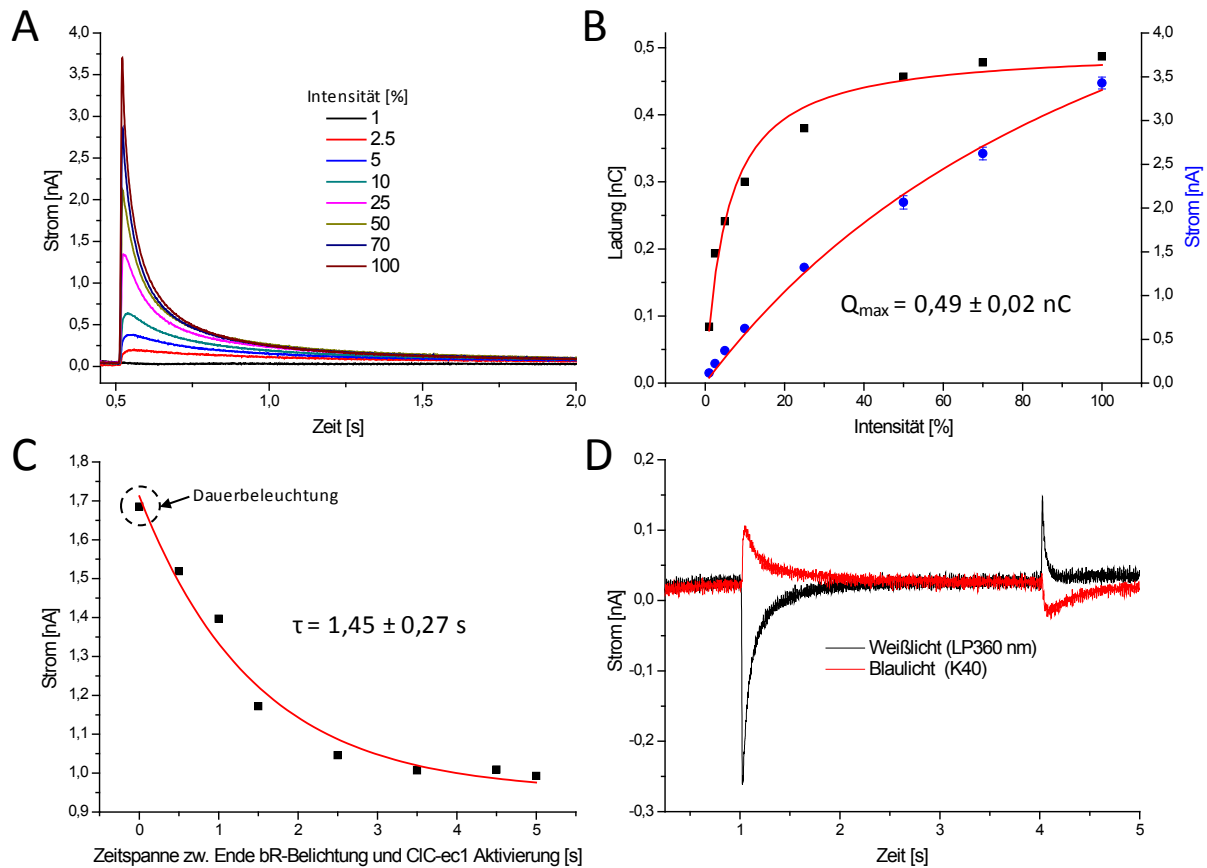


Abb. 3-28: Charakterisierung des bR-induzierten Membranpotentials. (A) Lichtabhängigkeit der bR-Ströme, eingestellt mit Graufiltern unterschiedlicher Transmission (1-100%). (B) Sättigungsverhalten von Peakströmen (●) und Ladung (■) in Abhängigkeit der Lichtintensität. Mittelwerte und Standardabweichung, $n=3$, Michaelis-Menten Fits der Daten (—). Keine Sättigung der Peakströme im untersuchten Intensitätsbereich (nach Fit theoretisch: $I_{\max} = 7,5 \text{ nA}$, $K_m = 120\%$), jedoch Sättigung der translokierten Ladung ab ca. 25% Intensität bei $0,49 \pm 0,02 \text{ nC}$. (C) Abbau des Membranpotentials nach Deaktivierung von bR. Nach ca. 3 s kein Einfluss des Membranpotentials auf ClC-ec1 Peakstrom mehr detektierbar, monoexponentieller Fit (—) liefert eine Zeitkonstante von $1,45 \pm 0,27 \text{ s}$ für den Abfall des Potentials. Messwert bei $t=0$ entspricht Dauerbeleuchtung während des gesamten Lösungswechsels. ClC-ec1 Amplitude ohne Beleuchtung: 1 nA. (D) Pumpströme der bR Mutante D85T. Positive Ströme mit Peakamplituden von ~100 pA bei Blaulicht-Aktivierung (K40: $360 < \lambda > 420 \text{ nm}$), negative Ströme mit Amplituden von 250-300 pA bei Weißlicht-Aktivierung (LP360 nm).

4 Diskussion

4.1 Funktionelle Charakterisierung von CIC-7

Für die Etablierung eines robusten *Assays* an der SSM ist ein homogen und ausreichend stark exprimierendes Expressionssystem erforderlich. Aus diesem Grund eignen sich transiente Transfektionen nur schlecht für die Präparation und Charakterisierung an der SSM. Außerdem ist für die Präparation signifikanter Membranmengen der Einsatz großer Zellmassen (min. 1 Gramm) notwendig, so dass die Kosten für Transfektionsreagenzien nicht zu vernachlässigen sind.

4.1.1 Expressionssystem & Zellaufschluss

Daher kam in dieser Arbeit das Flp-In[™] CHO-Expressionssystem von Invitrogen zum Einsatz, welches eine spezifische Integration der gewünschten Ziel-DNA in das Genom der Expressionszelllinie ermöglicht und somit die Herstellung von homogen und stabil exprimierenden Zelllinien vereinfacht [O'Gorman *et al.*, 1991]. Durch die Integration von exakt einer Genkopie ist die Vergleichbarkeit verschiedener Zelllinien (z.B. Mutanten) in diesem System weiterhin vereinfacht. Obwohl der verwendete Expressionsvektor für eine Tetracyclin-regulierte Genexpression konzipiert wurde (2x TetR im CMV-Promotor), ist er dennoch für eine konstitutive Expression geeignet, so lange in der Zielzelllinie kein Tet-Repressor exprimiert wird. Da die CIC-7 Expression keine signifikanten zelltoxischen Eigenschaften hatte, war es nicht zwingend notwendig, die Expression zu regulieren. Bei der Kultivierung großer Zellmengen für die Membranpräparation musste jedoch sorgfältig auf die Konfluenz der Zellen geachtet werden. Diese durfte ~90% nicht überschreiten, da sich die Zellen sonst sehr schnell von der Wachstumsfläche ablösten und die Ausbeute drastisch sank. Zum Aufschluss der Zellen für die Membranpräparation kam die Druckhomogenisierung mit Hilfe einer Parr-Bombe zum Einsatz, die eine äußerst schonende Aufschluss-Methode darstellt. Der Zellaufschluss findet dabei durch die schnelle Dekompression der mit 70 Bar (Stickstoff) beaufschlagten Lösung statt, wobei die Zellen durch die N₂-Ausgasung platzen. Während bei sonst üblichen Aufschlussmethoden wie dem *Dounce-Potter* oder der *French-Press* die Zellen starken Scherkräften, zum Beispiel bei der Passage von Ventilen, ausgesetzt sind und diese Methoden immer mehrerer Zyklen bedürfen, die wiederum die Zellkompartimente bereits aufgeschlossener Zellen belasten, verursacht die Stickstoffdekompression keinen wiederholten mechanischen Stress. Dabei kann die Temperatur stabil gehalten und kontrolliert werden, es treten keine Scherkräfte auf und die Homogenate sind während der gesamten Prozedur durch die Stickstoffatmosphäre vor

Oxidation geschützt [Hunter & Commerford, 1961; Autuori *et al.*, 1982]. Die Solubilisierung mittels Detergenzien als weitere Aufschlussmethode schied für den Anwendungszweck von Anfang an aus, da CIC-7 in seiner nativen Umgebung untersucht werden und die Membranen daher intakt bleiben sollten.

4.1.2 Lokalisation und Aktivität von CIC-7

Durch die GFP-Fluoreszenzanalyse konnte die homogene Expression der generierten Zelllinien gut überprüft werden, die Mutation von GFP zu EGFP (F64L/S65T) vereinfachte weiterhin bedeutend die konfokale Lokalisationsanalyse durch die wesentlich höhere Fluoreszenzausbeute und effizientere Faltung des EGFP [Cormack *et al.*, 1996; Tsien, 1998]. Die gefundene vesikuläre Expression des WT-CIC-7, dessen (EGFP-)Fluoreszenz gut mit dem LysoTracker[®] Red Farbstoff kolokalisierte, deutet auf eine lysosomale Expression von CIC-7 auch in CHO Zellen hin und bestätigt sehr gut die bereits durchgeführten Lokalisationsuntersuchungen, bei denen CIC-7 stets in Lysosomen und niemals an der Plasmamembran gefunden wurde [Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006].

Auch die gesteigerte Fluoreszenz (=Expression) bei Koexpression von Ostm1 lässt sich gut durch die bereits in Lange *et al.* (2006) diskutierte stabilisierende Eigenschaft des Ostm1 als β -Untereinheit von CIC-7 in den Lysosomen erklären. Sobald Ostm1 exprimiert wird, scheint sich die CIC-7 Konzentration in den CHO Zellen deutlich zu erhöhen.

Dieses Verhalten wird weiterhin durch die Aktivitätsmessungen der präparierten Membranen an der SSM bestätigt, wo bei Koexpression von Ostm1 signifikant größere Ströme detektierbar waren. Die CIC-7 Konzentrationsbestimmung und Normierung erfolgte in diesem Experiment allerdings nur über die Fluoreszenz des EGFP-Fusionsproteins, wobei die zu vergleichenden Proben auf die relativ ungenaue Gesamtproteinkonzentration nach Bradford eingestellt waren. Die gemessene Fluoreszenz in den verschiedenen Präparationen lag dabei in ähnlichen Größenordnungen. Ob die beobachtete Aktivitätssteigerung jedoch lediglich auf einen Anstieg der absoluten CIC-7 Konzentration in den Lysosomen-Membranen zurückzuführen ist oder die β -Untereinheit außerdem einen modulierenden Einfluss auf die CIC-7 Transportaktivität hat, wie für CIC-Ka und Barttin beschrieben [Estevez *et al.*, 2001], lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig bestimmen. Allerdings ist auch ohne die Ostm1-Koexpression eine signifikante CIC-7 Aktivität in den SSM-Messungen vorhanden und CIC-7 wird bereits alleine korrekt an die lysosomale Membran transportiert [Lange *et al.*, 2006], so dass man davon ausgehen kann, dass CIC-7 Ostm1 nicht wie CIC-Ka Barttin obligatorisch zur Funktionalität benötigt [Estevez *et al.*, 2001].

4.1.3 G213R-CIC-7 in CHO: Ein Modellsystem für ADOII

Die untersuchte G213R Mutante des Ratten-CIC-7, die dem humanen G215R entspricht, ist physiologisch von großer Bedeutung, da sie eindeutig als eine der genetischen Ursachen der autosomal dominanten Osteopetrose (ADOII) zugeordnet werden kann und weiterhin eine der häufigsten identifizierten Mutationen im CLCN7 Gen in Verbindung mit dieser Krankheit darstellt [Cleiren *et al.*, 2001; Frattini *et al.*, 2003; Waguespack *et al.*, 2003].

Obwohl in dieser Arbeit alle Experimente mit dem Ratten-Homolog des CIC-7 durchgeführt wurden, kann aufgrund der Tatsache, dass die Proteinsequenzen des humanen und Ratten CIC-7 insgesamt 95%, die Region um die Mutation sogar 100% identisch sind, davon ausgegangen werden, dass die gewonnenen Ergebnisse auch auf das humane Modell übertragbar sind.

Interessanterweise zeigte die konfokale Analyse der CIC-7 G213R Mutante ein im Vergleich zum Wildtyp völlig verschiedenes Lokalisationsverhalten. Die über die Zellen relativ homogen verteilte, aber dennoch strukturierte EGFP-Fluoreszenz, die sehr gut mit dem ER-Tracker[™] Red Farbstoff kolokalisierte, deutet darauf hin, dass die CIC-7 Mutante nicht mehr korrekt zu den Lysosomen transportiert wird und im Endoplasmatischen Retikulum verbleibt. Dass es sich dabei nicht um eine zytosolische Verteilung des Proteins handelt wird durch den Umstand gestützt, dass nach der Membranpräparation über die Dichtegradientenzentrifugation das CIC-7-EGFP Fusionsprotein noch immer in den Membranfraktionen nachgewiesen werden konnte. Zytosolische Proteine wären bereits beim ersten UZ-Zentrifugationsschritt zum Sammeln der Membranen mit dem Überstand verworfen worden.

Die Anreicherung der CIC-7 Mutante in Fraktion 45/51, in der auch der ER-Marker Calnexin hauptsächlich nachgewiesen werden konnte, spricht weiterhin für eine Retention im ER.

Die G213R Mutation scheint bedeutenden negativen Einfluss auf Struktur und Faltung des CIC-7 Proteins zu haben, was offensichtlich von der ER-Qualitätskontrolle [Alberts *et al.*, 2008] erkannt wird und zu einer Retention des Proteins führt. Ein vergleichbares Verhalten ist auch von einigen Punkt-Mutationen im CIC-5 bekannt, die der Dent'schen Krankheit zugeordnet werden können [Ludwig *et al.*, 2005; Zifarelli & Pusch, 2007]. Auch hier verhindern einzelne *missense*-Punktmutationen die korrekte Oberflächenexpression im *Xenopus* Oozyten Expressionssystem und führen beim Menschen zur Dent'schen Krankheit.

Ein Hinweis auf die strukturelle Bedeutung des betreffenden Glycin-Restes an Position 213 (bzw. 215 im humanen Klon) gibt die vergleichende Sequenzanalyse der humanen CLC-Proteine in Abb. 4-1. Die betreffende Aminosäure ist in allen humanen CLC-Vertretern konserviert (Position A), was für eine essentielle Bedeutung des Restes für die Proteinstruktur

C1C-1	FCHLISPPQAVGSGIPEMKTIL	A	G	V	L	K	E	Y	L	T	M	K	A	F	V	A	K	V	V	A	L	T	A	G	L	G	S	G	--	I	P	V	G	E	G	P	F	235																				
C1C-2	FTQILAPQAVGSGIPEMKTIL	A	G	V	L	K	E	Y	L	T	L	K	T	F	I	A	K	V	I	G	L	T	C	A	L	G	S	G	--	M	P	L	G	E	G	P	F	208																				
C1C-Ka	FSQSITPSSGGSGIPELKTML	A	G	V	L	E	D	Y	L	D	I	K	N	F	G	A	K	V	V	G	L	S	C	T	L	A	T	G	S	T	L	F	L	G	E	G	P	F	169																			
C1C-Kb	FSQSITPSSGGSGIPEVKTML	A	G	V	L	E	D	Y	L	D	I	K	N	F	G	A	K	V	V	G	L	S	C	T	L	A	C	G	S	T	L	F	L	G	E	G	P	F	169																			
C1C-3	LVKVFAPYACGSGIPEIKTIL	A	G	V	I	R	G	Y	L	G	K	W	T	L	M	I	K	T	I	T	L	V	L	A	V	A	S	G	--	L	S	L	G	E	G	P	L	285																				
C1C-4	LVRVFAPYACGSGIPEIKTIL	A	G	V	I	R	G	Y	L	G	K	W	T	L	L	I	K	T	V	T	L	V	L	V	V	S	S	G	--	L	S	L	G	E	G	P	L	227																				
C1C-5	LVKVFAPYACGSGIPEIKTIL	A	G	V	I	R	G	Y	L	G	K	W	T	L	V	I	K	T	I	T	L	V	L	A	V	S	S	G	--	L	S	L	G	E	G	P	L	214																				
C1C-6	LLVLIIEPVAAGSGIPEVKCYL	A	G	V	K	V	P	G	I	V	R	L	R	T	L	L	C	K	V	L	G	V	L	F	S	V	A	G	--	L	F	V	G	E	G	P	M	203																				
C1C-7	IVAFIEPVAAGSGIPQIKCFL	A	G	V	K	I	P	H	V	V	R	L	K	T	L	V	I	K	V	S	G	V	I	L	S	V	V	G	--	L	A	V	G	E	G	P	M	250																				
C1C-1	SIE	C	V	I	S	T	Y	F	A	V	R	N	Y	W	R	G	F	F	A	A	T	F	S	A	F	V	F	R	V	L	A	V	W	N	K	D	A	-----	V	T	I	T	A	L	F	R	T	N	F	R	---	338						
C1C-2	SIE	C	V	I	S	T	F	F	A	V	R	N	Y	W	R	G	F	F	A	A	T	F	S	A	F	I	F	R	V	L	A	V	W	N	R	D	E	-----	E	T	I	T	A	L	F	K	T	R	F	R	---	311						
C1C-Ka	SIE	C	V	I	S	S	H	F	S	V	R	D	Y	W	R	G	F	F	A	A	T	C	G	A	F	I	F	R	L	L	A	V	F	N	S	E	Q	-----	E	T	I	T	S	L	Y	K	T	S	F	R	---	272						
C1C-Kb	SIE	C	V	I	S	S	H	F	S	V	W	D	Y	W	R	G	F	F	A	A	T	C	G	A	F	M	F	R	L	L	A	V	F	N	S	E	Q	-----	E	T	I	T	S	L	Y	K	T	S	F	R	---	272						
C1C-3	SL	C	E	V	S	Y	F	P	L	K	T	L	W	R	S	F	F	A	L	V	A	A	F	V	L	R	S	I	N	P	-----	F	G	-----	N	S	R	L	V	L	F	Y	V	E	Y	H	---	382										
C1C-4	SL	C	E	V	S	Y	F	P	L	K	T	L	W	R	S	F	F	A	L	V	A	A	F	T	L	R	S	I	N	P	-----	F	G	-----	N	S	R	L	V	L	F	Y	V	E	Y	H	---	324										
C1C-5	SL	C	E	V	S	Y	F	P	L	K	T	L	W	R	S	F	F	A	L	V	A	A	F	T	L	R	S	I	N	P	-----	F	G	-----	N	S	R	L	V	L	F	Y	V	E	F	H	---	311										
C1C-6	SL	C	E	V	S	S	F	W	N	Q	G	L	T	W	K	V	L	F	C	S	M	S	A	T	F	T	L	N	F	R	S	G	I	Q	F	G	S	W	G	--	S	F	Q	L	P	G	L	N	F	G	E	F	K	C	S	D	321	
C1C-7	SL	C	E	V	S	A	S	F	W	N	Q	F	L	T	W	R	I	F	F	A	S	M	I	S	T	F	T	L	N	F	V	L	S	I	Y	---	H	G	N	M	W	D	L	S	P	G	L	I	N	F	G	R	F	---	D	S	E	366

Abb. 4-1: Sequenzhomologie humaner CLC Proteine. Multiples Sequenzalignment mit ClustalW. (A) Über alle CLC konservierter Glycinrest, entspricht G215 bei CIC-7 (=G213 beim Rattenklon), das bei der ADOII zu Arginin (R) mutiert ist. (B) „Gating“-Glutamat ist bei allen CLCs bis auf die renalen -Ka&Kb konserviert. (C) „Proton“-Glutamat, bei allen intrazellulären CLCs (3-7) als Glutamat, bei plasmamembranständigen CLCs (1/2/Ka/Kb) jedoch als Valin konserviert [Zdebik et al., 2008].

bzw. Funktionalität spricht [Cleiren et al., 2001]. Außerdem liegt die Mutation in einer Region, die für ihren Einfluss auf die Kanaleigenschaften der CLC- Proteine bekannt ist [Ludewig et al., 1996].

4.1.4 Die Rolle von Ostm1

Die starke und direkte molekulare Interaktion von CIC-7 und seiner β -Untereinheit Ostm1, konnte bereits in Kopräzipitationsuntersuchungen nachgewiesen werden [Lange et al., 2006]. Sie wird durch die teilweise „Relokalisierung“ des mutierten CIC-7 Proteins bei Ostm1 Koexpression bestätigt. Offensichtlich bilden CIC-7 und Ostm1 bereits im ER einen molekularen Komplex, wobei die β -Untereinheit das mutierte CIC-7 Protein so weit zu stabilisieren vermag, dass es zumindest teilweise wieder in die Lysosomen transportiert und nicht von der ER-Qualitätskontrolle zurückgehalten wird.

Wie von Lange et al. (2006) beschrieben, benötigt Ostm1 für die korrekte lysosomale Lokalisation CIC-7 und wird in oder auf dem Weg zu den Lysosomen proteolytisch gespalten. Ohne Koexpression von CIC-7 verbleibt Ostm1 im ER. Diese Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Ostm1 war bei transienter Transfektion in Kontroll-CHO Zellen lediglich in seiner ungespaltenen Version (~70 kDa) nachzuweisen, während sowohl bei Koexpression mit WT als auch mit G213R CIC-7 nur das gespaltene 35 kDa Fragment detektierbar war (Abb. 3-3 B). Damit bestätigt die durchgeführte Ostm1 Western

Blot Analyse zusätzlich die molekulare Interaktion von CIC-7 und Ostm1, besonders auch mit der G213R Mutante.

Obwohl bei Koexpression von Ostm1 für die CIC-7 Mutante eine signifikante „Relokalisierung“ in der konfokalen Fluoreszenzanalyse beobachtet werden konnte, war dieser Effekt nicht besonders deutlich in der Fluoreszenzverteilung der einzelnen Membranfraktionen zu erkennen (Abb. 3-4). Ein Grund für die nur geringe detektierbare Verteilungsänderung der EGFP-Fluoreszenz könnte zum Einen die Reinheit der einzelnen Fraktionen für die untersuchten Zellorganelle sein. Obwohl die Lysosomen signifikant in Fraktion 31/45 und das ER in 45/51 angereichert waren, konnten die spezifischen Markerproteine im Western Blot auch in geringen Mengen in der jeweils anderen Fraktion nachgewiesen werden, so dass von einer gewissen Mischpräparation ausgegangen werden muss. Zum Anderen war der Relokalisierungseffekt in allen analysierten Einzelklonen für maximal 30-50% der Zellen bestimmbar, während die übrigen Zellen weiterhin eine ER-ständige Lokalisation aufwiesen. Somit ist es möglich, dass die teilweise lysosomale Lokalisierung durch die (starke) ER-Lokalisierung in der Fluoreszenzanalyse überdeckt wird und die Verteilung zusätzlich durch Kontaminationen der jeweils ungewünschten Organelle verzerrt ist. Aufgrund der ähnlichen Dichte intrazellulärer Membranvesikel ist eine absolut reine Fraktionierung sehr schwierig, vor allem Lysosomen werden oft als Verunreinigungen mit anderen Organellen gefunden. Als eine geeignetere Methode zur Isolation von Lysosomen wäre die Dichtegradientenzentrifugation mittels diskontinuierlichem Percoll-Gradient zu wählen [Graham, 2001], allerdings waren mit dieser Methode keine brauchbaren SSM-Sensoren zu gewinnen. Möglicherweise störten dabei Percoll-Reste die Anlagerung der Membranen an die SSM. Da die physiologische Charakterisierung von WT-CIC-7 in dieser Arbeit im Vordergrund stand, wurde das Präparationsprotokoll auf die Eignung für SSM-Messungen hin optimiert und die Präparation mittels Percoll-Gradient nicht weiter verfolgt.

Trotzdem waren bei der Verteilungsanalyse die Unterschiede zwischen Wildtyp CIC-7 und G213R Mutante sehr deutlich und bestätigten in der Tendenz die Ergebnisse der konfokalen Lokalisationsanalyse. Da Lysosomen und WT-CIC-7 hauptsächlich in Fraktion 31/45 angereichert waren, wurde diese für alle funktionalen Untersuchungen verwendet. Im Vergleich zu den anderen beiden Fraktionen waren hier außerdem die größten Chloridströme detektierbar, während entsprechende Membranen von CHO-Kontrollzellen nur geringe Ströme aufwiesen (Abb. 3-6 A).

4.1.5 Die ADOII beruht auf einem *Trafficking*-Defekt von CIC-7

Die *Ostm1*-abhängigen Aktivitätsmessungen an der SSM zeigen, dass die G213R CIC-7 Mutante noch immer funktional zu sein scheint. Die Western Blot und Lokalisationsanalysen bestätigen, dass die Mutante noch immer in der Lage ist, mit der β -Untereinheit *Ostm1* zu interagieren und im Komplex zumindest teilweise korrekt die Lysosomen erreicht. Die Aktivitätsmessungen dieser Präparationen zeigten signifikante CIC-7 Ströme mit etwa der halben Amplitude im Vergleich zu WT-Messungen. Allerdings ist auch hier kein exakter quantitativer Vergleich der Messungen möglich. Aufgrund der Limitationen bei Proteinkonzentrationsbestimmung, Normierung und ER-Verunreinigungen in der untersuchten Fraktion sind die Ergebnisse eher qualitativ zu beurteilen, zeigen aber deutlich die Transportaktivität der G213R Mutante. Auf Basis dieser Messung und der gefundenen ER-Retention ist daher davon auszugehen, dass die mit der Mutante verbundene Osteopetrose (ADOII) eher auf einen Lokalisationsdefekt als auf eine Funktionsstörung des Proteins zurück zu führen ist.

Während das Fehlen von CIC-7 in *Knockout*-Mäusen keinen signifikanten Einfluss auf den stationären lysosomalen pH hat und somit die *proton-shunt*-Theorie als seine primäre physiologische Funktion in Lysosomen überdacht werden muss [Kasper *et al.*, 2005; Wartosch *et al.*, 2009], gilt es als sicher, dass CIC-7 in den Osteoklasten maßgeblich an der Ansäuerung der Resorptionslakune beteiligt ist [Kornak *et al.*, 2001; Schaller *et al.*, 2005; Henriksen *et al.*, 2006; Henriksen *et al.*, 2008]. Die G213R Mutation führt beim Menschen zu einer eher leichten Form der Osteopetrose (ADOII) [Cleiren *et al.*, 2001], während *Knockout*-Mäuse, die überhaupt kein CIC-7 exprimieren (CIC-7^{-/-}) unter einer schweren Form der Osteopetrose leiden, die von den Symptomen mit einer rezessiven infantilen Osteopetrose (ARO) vergleichbar ist [Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005]. Dieser leichtere Krankheitsverlauf wird durch eine CIC-7 Restaktivität aufgrund der heterozygoten Verteilung der G213R Mutation und der dimären Struktur der CLC-Proteine erklärt [Cleiren *et al.*, 2001; Frattini *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2006; Jentsch, 2008]. Einen kompletten Funktionsverlust des mutierten Proteins angenommen, bestünde somit eine 25%ige Chance, dass zwei intakte Untereinheiten des nicht mutierten Allels ein funktionales Protein bilden. Im verwendeten Flp-InTM CHO Expressionssystem war jedoch nur das mutierte Gen auf dem Expressionsvektor vorhanden und trotzdem eine CIC-7 Aktivität nachweisbar.

Auch bei Messungen der Ansäuerungsleistung von G213R Osteoklasten konnte für diese eine verringerte, aber noch immer vorhandene Aktivität festgestellt werden [Henriksen *et al.*, 2004; Henriksen *et al.*, 2009]. Da *Ostm1* in Osteoklasten stark exprimiert und die Genaktivität

zusammen mit ClC-7 reguliert wird [Chalhoub *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2006; Meadows *et al.*, 2007], wäre es demnach auch möglich, dass zumindest ein Teil der Restaktivität auf die Ostm1-bedingte Relokalisierung zurück zu führen ist und sich daraus der relativ milde Krankheitsverlauf erklärt.

4.1.6 ClC-7 erreicht nicht die Plasmamembran

Durch die in dieser Arbeit gefundene und in mehreren vorherigen Studien beschriebene ausschließlich vesikuläre Lokalisation von ClC-7 [Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006] verwundert es nicht, dass in konventionellen Patch-Clamp-Untersuchungen keine signifikanten Chloridströme an der Plasmamembran detektierbar waren (Abb. 3-2 A). Dies bestätigen auch die ersten gescheiterten Versuche zur Aktivitätsmessungen von ClC-6 und -7 an *Xenopus* Oozyten [Brandt & Jentsch, 1995]. Die von Diewald *et al.* (2002) an Oozyten (TEVC) und Kajiya *et al.* (2009) an Maus-Osteoklasten und HEK-293 Zellen (Ganz-Zell-Patch-Clamp) detektierten „Säure-aktivierten“ Ströme, konnten mit den in dieser Arbeit generierten Zelllinien nicht reproduziert werden (Abb. 3-2 B). In Anbetracht der ausschließlich intrazellulären Lokalisation von ClC-7 muss möglicherweise davon ausgegangen werden, dass diese Ströme auf unspezifische endogene Prozesse zurück zu führen und nicht, wie von den jeweiligen Autoren beschreiben, der Plasmamembran-Expression von ClC-7 zuzuordnen sind.

Dass die zweite Gruppe der CLC-Proteine (ClC-3/4/5) bei heterologer Expression auf der Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten und HEK-293 Zellen exprimiert wird und somit für konventionelle elektrophysiologische Methoden zugänglich ist, liegt möglicherweise im unterschiedlichen *Trafficking* der beiden CLC-Untergruppen in die jeweiligen Zielvesikel (ClC-3/4/5 = (frühe) Endosomen; ClC-6/7 = späte Endosomen & Lysosomen) begründet. Für ClC-5 kann davon ausgegangen werden, dass der zelluläre Transport zu den Endosomen über den *exo-/endozytotischen* Weg, mit Zwischenstation auf der Plasmamembran und adaptervermittelter Endozytose geschieht [Bonifacino & Traub, 2003; Nakatsu & Ohno, 2003], da im C-Terminus des Proteins zwischen den beiden CBS Domänen ein PY-Internalisierungsmotiv gefunden wurde. Bei Mutation dieses Motivs erhöht sich die Oberflächenexpression von ClC-5 drastisch, was auf die verminderte Internalisierung zurück geführt wird [Schwake *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2005]. Bei starker heterologer Expression kommt es bei den Proteinen der zweiten CLC-Untergruppe zu einem *spill-over* auf die Plasmamembran, der die elektrophysiologische Charakterisierung mittels Patch-Clamp oder TEVC ermöglicht [Zifarelli & Pusch, 2007; Plans *et al.*, 2009].

Für CIC-7 wurde hingegen bisher kein solches Motiv identifiziert, so dass sich vermuten lässt, dass die dritte Gruppe der CLC-Proteine adaptervermittelt auf direktem Weg in die Lysosomen transportiert wird, ohne jemals die Plasmamembran zu erreichen.

Aufgrund der Unzugänglichkeit von CIC-7 für klassische elektrophysiologische Methoden wurde daher in dieser Arbeit die SSM-Technik zur Charakterisierung verwendet. Mit dieser können bei geeigneter Membranpräparation auch vesikuläre Transportprozesse in nativen Membranen untersucht werden [Obrdlik *et al.*, 2010].

4.1.7 Funktionelle Charakterisierung von CIC-7

Die Festsetzung der Chloridkonzentration auf lediglich 30 mM in der aktivierenden Lösung, obwohl sich im untersuchten Konzentrationsbereich bis 300 mM keine Sättigung der Ströme einstellt, erfolgte aus Gründen der Artefaktminimierung. Da die SSM auf Konzentrations sprünge geladener Ionen sehr sensitiv reagiert, können diese Oberflächeneffekte die Untersuchung von Transportprozessen stören [Garcia-Celma *et al.*, 2007]. Durch die Präsentation von konstant 300 mM Salz (Na-Aspartat) in allen Messpuffern konnten diese Artefakte weitgehend minimiert werden. Ein Chloridsprung von 30 mM war für die Generation von signifikanten Signalamplituden (~500 pA) ausreichend, während die Artefakte unter diesen Bedingungen gut zu kontrollieren waren.

Die gewonnenen Abhängigkeiten bei der elektrophysiologischen Charakterisierung des WT-CIC-7 erscheinen im Hinblick auf die physiologischen Verhältnisse und im Vergleich zu anderen CLC-Proteinen vernünftig. Eine Vergrößerung der Transportaktivität bei sauren Verhältnissen ist insofern sinnvoll, wenn man bedenkt, dass das Protein in Lysosomen und der Osteoklasten-Membran zumindest einseitig äußerst sauren Bedingungen ausgesetzt ist.

Auch bei den konzentrativen *Uptake*-Messungen an Ratten-Lysosomen konnte eine vergleichbare Transportaktivierung im Sauren beobachtet werden [Graves *et al.*, 2008]

Weiterhin zeigen zum Beispiel auch CIC-ec1, das in Bakterien unter sauren Bedingungen arbeiten muss, und CIC-3 eine ähnliche pH-Abhängigkeit [Iyer *et al.*, 2002; Accardi *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2010]. Im Gegensatz dazu wird CIC-5 von saurem extrazellulären (=luminalen) pH inhibiert, obwohl auch im endosomatischen Lumen ein leicht erniedrigter pH herrscht [Friedrich *et al.*, 1999; Scheel *et al.*, 2005]. Allerdings sind die pH Verhältnisse in Endosomen (pH 6,8) wesentlich gemäßiger als in Lysosomen (pH 4,5) und die tatsächliche physiologische Funktion von CIC-5 in Endosomen wird aktuell intensiv diskutiert [Plans *et al.*, 2009]. Außerdem gehört CIC-5 zur zweiten CLC-Untergruppe, während CIC-7 der dritten, nur entfernt verwandten Untergruppe zugeordnet wird (vgl. Abb. 1-2), so dass sich die beiden Proteine unter diesen Umständen nicht direkt vergleichen lassen.

4.1.8 Kanal oder Transporter?

Die gefundene Anionenselektivität von $\text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$ ist eine weitere Bestätigung für die Spezifität der gemessenen Ströme, da eine verminderte Iodid-Permeabilität im Vergleich zu Chlorid eine spezifische biophysikalische Eigenschaft der CLC-Proteine ist und sie von anderen Anionenkanälen unterscheidet [Jentsch *et al.*, 2002; Zifarelli & Pusch, 2007; Jentsch, 2008]. Weiterhin wurde eine vergleichbare Selektivität auch bei den *Uptake*-Messungen von Graves *et al.* (2008) gefunden. Aufgrund der Neigung zur Ausbildung großer Artefakte (>1 nA) von Bromid und besonders Iodid auf der SSM war die Untersuchung der Anionen-Permeabilität nicht durch die einfache Substitution des jeweiligen Anions in der aktivierenden Lösung möglich. Jedoch war für CLC-7 bereits eine Protonen-gekoppelte Transportaktivität (Cl^-/H^+ -Antiporter) postuliert, basierend auf strukturellen Parallelen mit anderen CLC-Proteinen [Picollo & Pusch, 2005; Miller, 2006; Jentsch, 2007; Zifarelli & Pusch, 2007; Zdebik *et al.*, 2008]. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der humanen CLC-Proteine, so fällt auf, dass alle vesikulären CLCs ein konserviertes *proton*-Glutamat besitzen, welches bei den Plasmamembran-ständigen CLCs als Valin vorliegt (vgl. Abb. 4-1 C). Dieses Glutamat ist essentiell für die Transportaktivität [Zdebik *et al.*, 2008] von CLC-4 und CLC-5, die beide als Cl^-/H^+ -Antiporter identifiziert werden konnten [Picollo & Pusch, 2005; Pusch *et al.*, 2006] und findet sich auch im bakteriellen CLC-Homolog CLC-ec1, für das erstmals eine Protonen-gekoppelte Transportaktivität nachgewiesen wurde [Accardi & Miller, 2004]. Daher wird auch für CLC-7 eine Cl^-/H^+ -Antiporter-Aktivität angenommen, die konzentrative *Uptake*-Messungen von Graves *et al.* (2008) kürzlich bestätigen konnten.

Aus diesem Grund konnte für die Permeabilitätsuntersuchungen ein Protokoll verwendet werden, bei dem der Transport über einen Protonengradienten getrieben wurde. Das Ergebnis bestätigte einerseits das CLC-typische Permeabilitätsverhalten und war außerdem ein erster direkter elektrophysiologischer Nachweis für die Protonen-gekoppelte Transportaktivität von CLC-7. Die weiteren Untersuchungen mit variablen Protonengradienten (Abb. 3-9) bestätigten die postulierte Transportaktivität, da sich CLC-7 in diesem Experiment wie der bekannte Cl^-/H^+ -Antiporter CLC-ec1 verhielt und sich der Einfluss der Protonengradienten gut mit einer gekoppelten Antiporter-Aktivität erklären lässt.

Allerdings muss beachtet werden, dass bei den gewählten experimentellen Bedingungen auch ein pH-regulierender Einfluss auf die Transportaktivität nicht ausgeschlossen werden kann.

Zur Differenzierung solcher Einflüsse werden im klassischen elektrophysiologischen Experiment (Patch-Clamp, TEVC) Untersuchungen zur Permeabilität oder Kopplung vorzugsweise über die Bestimmung des Umkehrpotentials und anschließender Kalkulation

mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung [Hille, 1992] durchgeführt. Dazu ist allerdings eine Spannungskontrolle über den Transporter notwendig, die an der SSM jedoch nicht gegeben und diese Methode somit nicht anwendbar ist (vgl. Kap. 4.3).

4.1.9 Inhibitoren Screening

Die gute Signalstabilität über einen langen Zeitraum und viele Messungen bei geringer Standardabweichung der Einzelmessungen führten zu einem äußerst robusten Z' -Faktor von 0,78, der den etablierten *Assay* auch für die Untersuchungen von potentiellen Inhibitoren qualifizierte. Diese Untersuchungen sind zum Einen zur Erstellung eines Inhibitionsprofils für die Überprüfung der Spezifität der detektierten Ströme nützlich. Zum Anderen kommt CIC-7 als pharmazeutisches *Target* in der Osteoporose-Therapie in Frage. Da die Symptome der Osteoporose auf ein Ungleichgewicht im Knochenstoffwechsel zurück zu führen sind, zielen einige etablierte Therapieansätze auf die Inhibition der knochenresorbierenden Osteoklastenaktivität zur Wiederherstellung des Gleichgewichts von Knochenauf- und -abbau (vgl. Kap. 1.3.2). Für CIC-7 konnte gezeigt werden, dass es obligatorisch für eine korrekte Osteoklastenaktivität ist, da die Ansäuerung der Resorptionslakune ohne den Cl^-/H^+ -Transporter nicht effizient funktioniert. Somit bietet sich CIC-7 als potentieller Angriffspunkt für eine pharmazeutische Osteoporose-Therapie an [Kornak *et al.*, 2001; Schaller *et al.*, 2005; Henriksen *et al.*, 2009].

Für das Screening und zur Charakterisierung potentieller Inhibitoren ist ein robustes Versuchssystem nötig, das die SSM-Methode in Form der SURFE²R-Technologie bieten kann [Geibel *et al.*, 2006]. Im Vergleich zu anderen Transporterfamilien existieren nur sehr wenige bekannte spezifische und hochaffine Inhibitoren, die zur physiologischen Charakterisierung der CLC-Proteine genutzt werden können [Pusch *et al.*, 2006; Matulef *et al.*, 2008].

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zur Erstellung eines Inhibitionsprofils und Überprüfung der Spezifität der gemessenen Ströme Substanzen untersucht, die als allgemeine Chloridkanal-Blocker bekannt sind oder bereits inhibitorische Effekte auf andere CLC-Proteine gezeigt haben. So inhibieren beispielsweise die Substanzen CPP, CPA und 9-AC CIC-0, -1, und -2 [Pusch *et al.*, 2006], während CIC-5 unsensitiv gegenüber den relativ unspezifischen Chloridkanalinhibitoren DIDS und NPPB ist [Steinmeyer *et al.*, 1995]. CIC-K Kanäle sind wiederum sensitiv gegenüber DIDS, CPP und NFA, wobei für Letzteres ein konzentrationsabhängiges biphasisches Modulationsverhalten gefunden wurde [Liantonio *et al.*, 2002; Picollo *et al.*, 2004; Picollo *et al.*, 2007]. Weiterhin scheiden an endogenen Leitfähigkeiten CIC-3 und Volumen-regulierte Anionenkanäle (VRAC) aus, die durch Phloretin und Tamoxifen zu inhibieren sind [Nilius & Droogmans, 2003; Matsuda *et al.*,

2008]. Auch die anderen untersuchten Flavonoide, für die ein modulierender Einfluss auf CFTR-Kanäle bekannt ist [Becq, 2006], zeigten keine signifikanten Effekte auf die ClC-7 Ströme. Der Vergleich dieser Daten mit dem gefundenen Inhibitionsprofil (Tab. 3-1) macht deutlich, dass es sich bei den detektierten Strömen nicht um endogene Aktivitäten der genannten Transport-Proteine handeln kann, da die gemessenen SSM-Ströme lediglich mit relativ hoher Affinität von DIDS und NPPB inhibiert wurden. Dies deckt sich sehr gut mit den gefundenen DIDS- und NPPB-Inhibitionen lysosomaler Chloridströme, lediglich die in dieser Arbeit beschriebene Phloretin-Sensitivität konnte nicht wiedergefunden werden [Malekova *et al.*, 2007]. Allerdings war diese Phloretin-Inhibition von den Autoren nicht regelmäßig reproduzierbar und der Effekt unklar.

Der beste Vergleich des Inhibitionsmusters ist mit Untersuchungen von Henriksen *et al.* (2008) möglich, wo der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten und die Ansäuerung von Membranvesikeln aus Osteoklasten bestimmt wurde. Auch hier konnte ein inhibitorischer Effekt von NPPB mit vergleichbarer Affinität nachgewiesen werden. Die Autoren fanden ebenso keinen signifikanten Effekt von 9-AC, CPP und CPA. Während DIDS aufgrund von Interaktionen mit den dort verwendeten Versuchssystemen leider nicht charakterisiert werden konnte, war es mit dem etablierten SSM-Assay wiederum nicht möglich, die Affinität von IAA-94 zu bestimmen. Diese Substanz, bekannt für ihre inhibitorische Wirkung auf CLIC-1 und -5 [Tulk *et al.*, 2000; Berryman *et al.*, 2004], verursachte große konzentrationsabhängige Artefakte, welche eine Charakterisierung verhinderten. Für eine weitere interessante Substanzklasse war von den Autoren bereits zuvor ein Einfluss auf die Ansäuerung der Resorptionslakune und somit Osteoklastenaktivität beschrieben worden [Bennekou *et al.*, 2001; Henriksen *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 2004; Karsdal *et al.*, 2005]. Die Substanz NS5818 konnte auch im SSM-Assay mit einem IC₅₀ von 52 µM als relativ potenter Inhibitor identifiziert und somit die Wirkung als ClC-7 Blocker bestätigt werden. Die Substanz NS3736, ein verwandtes Analog zu NS5818, war wiederum nicht mit der SSM-Technik zu charakterisieren. Sie verursachte konzentrationsabhängig große Artefakte und hatte gleichzeitig starken Einfluss auf die Leitfähigkeit der Sensoren. Bei der Untersuchung der Substanz unter salzfreien Bedingungen (20 mM HEPES/TRIS, pH 7,0) am Lipid-Bilayer konnte eine konzentrationsabhängige Leitfähigkeitserhöhung nachgewiesen werden (Abb. 4-2), was für eine ionophorische Wirkung der Substanz spricht.

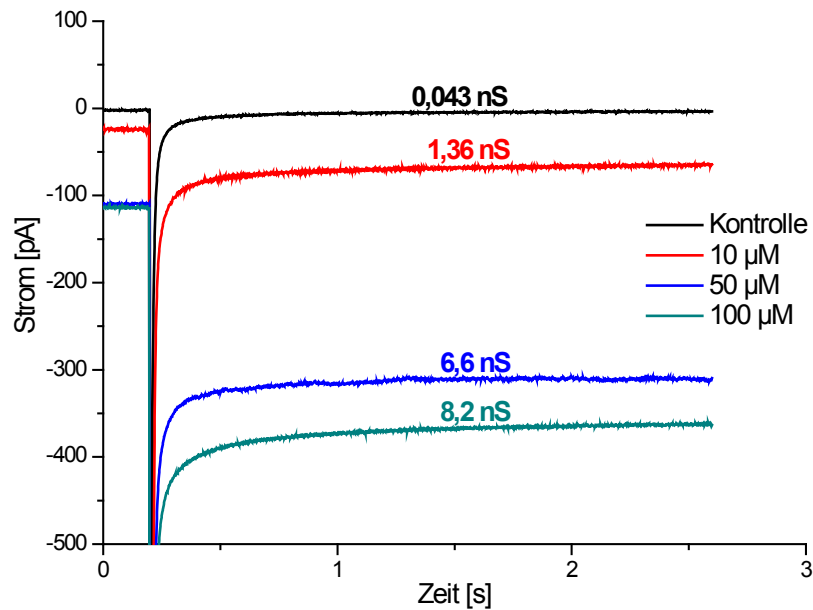


Abb. 4-2: Ionophorische Wirkung von NS3736. Konzentrationsabhängige Leitfähigkeitserhöhung durch NS3736 am Lipid-Bilayer. Puffer: 20 mM HEPES/TRIS, pH 7,0, salzfrei. Lipid: Phosphatidylcholin/Octadecylamin (60:1). Applikation eines Spannungssprungs (30 mV), Bestimmung der Leitfähigkeit nach Kap. 2.8.5. 5 min Inkubation nach Substanzzugabe.

Da bei den Untersuchungen keine Ionen außer den Puffern anwesend waren, scheint die Leitfähigkeit, ähnlich wie bei CCCP²⁰, von Protonen getragen zu sein. Vergleichbare, weniger drastische Leitfähigkeitseffekte hatten die Inhibitoren Tamoxifen und NFA, ohne dabei jedoch starke Artefakte zu verursachen. Möglicherweise bedingt dies, dass für diese Substanzen keine signifikanten Inhibitionen gefunden werden konnten, während Tamoxifen mit relativ hoher Affinität die Resorptionsaktivität von Osteoklasten inhibierte [Henriksen *et al.*, 2008]. Die von den Autoren gefundene Inhibition für NS3736 könnte auf Grundlage der Leitfähigkeitsmessung auch auf eine unspezifische Protonen-entkoppelnde Wirkung der Substanz im verwendeten *Assay* zurückzuführen sein. Bei diesem beruht der Nachweis auf der H⁺-ATPase-getriebenen Ansäuerung von Membranvesikeln, die fluorometrisch mittels Acridine-Orange verfolgt wird [Henriksen *et al.*, 2008]. Eine Entkopplung des Protonengradienten würde in diesem Fall den Effekt einer Inhibition simulieren.

Obwohl mit Hilfe des SSM-*Assays* keine besonders potenten ClC-7 Inhibitoren identifiziert werden konnten (höchste Affinität mit DIDS, IC₅₀ = 39 µM), waren die Inhibitionsmessungen geeignet, die Spezifität der gemessenen Ströme zu überprüfen. Weiterhin konnte durch die Untersuchungen gezeigt werden, dass der etablierte *Assay* hinreichend robust und daher zum Inhibitoren-*Screening* für die pharmakologische Wirkstoffcharakterisierung neuer Osteoporose-Therapeutika geeignet ist. Die SSM-Technik bietet somit die Möglichkeit, die Aktivität des vesikulären Transporters direkt zu untersuchen, was mit konventionellen

²⁰ CCCP: carbonyl cyanide n-chlorophenylhydrazone

elektrophysiologischen Methoden nicht möglich ist. Mit der *batch*-weisen Membranpräparation können auf dieser Grundlage außerdem größere Versuchskampagnen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden. Durch die direkte Aktivitätsbestimmung, ohne den notwendigen Einsatz sekundärer Sonden wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe, sind Fehlerquellen aufgrund von Substanz-Sonden-Wechselwirkungen ausgeschlossen, was die Robustheit des *Assays* im Vergleich zu etablierten Testsystemen verbessert und die potentielle Rate falsch-positiver bzw. falsch-negativer Treffer minimiert.

4.2 Charakterisierung von Ionenkanälen mit der SSM-Technik

Die SSM-Technik kam in den letzten 10 Jahren vielfach erfolgreich zur Charakterisierung von elektrogenen Transportproteinen zum Einsatz [Schulz *et al.*, 2008; Ganea & Fendler, 2009], jedoch waren die Zielproteine bisher immer nur primär oder sekundär aktive Transporter und keine Ionenkanäle. Deshalb sollte in dieser Arbeit auch die Eignung der Technik zur Charakterisierung von Ionenkanälen überprüft werden. Zu diesem Zweck kam der ATP-abhängige Kationenkanal P2X₂ zum Einsatz, ein Vertreter aus der Familie der purinergen Rezeptoren. Das Protein besteht aus 472 Aminosäuren und besitzt nur zwei Transmembrandomänen, die über einen großen extrazellulären Loop miteinander verbunden sind. Zur Bildung eines funktionalen Kanals lagern sich jeweils drei Untereinheiten zu Trimeren zusammen [Nicke *et al.*, 1998; Aschrafi *et al.*, 2004]. Bei der Bindung von extrazellulärem ATP öffnet sich der Kanal und ist dann relativ unselektiv einwärts gleichrichtend permeabel für monovalente Kationen ($K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$) und Calcium [Brake *et al.*, 1994; Ding & Sachs, 1999a; North, 2002; Egan *et al.*, 2006].

P2X Rezeptoren sind in eine Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Prozesse eingebunden, wie z.B. bei der Regulation schneller exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Vorgänge in der Signaltransduktion [North, 2002; Gevert *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006].

Durch den Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit bekannten Literaturdaten konnte eine Einschätzung zu Eignung der SSM-Technik getroffen werden. Da zu Beginn dieser Arbeit auch noch nicht nachgewiesen war, ob es sich bei ClC-7 um einen Chloridkanal oder Cl⁻/H⁺-Antiporter handelt, war dieses Wissen auch für die Messungen am ClC-7 von Bedeutung.

4.2.1 Konventionelle Elektrophysiologie vs. SSM-Technik

Bei den klassischen elektrophysiologischen Methoden (TEVC, Patch-Clamp) werden Transportprozesse über Ionenkanäle üblicherweise über eine extern applizierte Spannung gesteuert. Diese kann jedoch bei der SSM-Technik nicht als treibende Kraft für einen Ionentransport genutzt werden, da der kapazitiv gekoppelte Membranverbund aus SSM und adsorbierten Vesikeln wie ein Spannungsteiler wirkt, bei dem der Hauptanteil der Spannung über die SSM abfällt, welche einen sehr hohen spezifischen Widerstand aufweist [Florin & Gaub, 1993]. Durch den fehlenden direkten elektrischen Zugang zum Inneren des adsorbierten Membranvesikels kann daher an dieser Membran keine beliebige Spannung angelegt werden, mit der ein Transport über eingelagerte Transportproteine zu steuern wäre (weitere Erläuterung vgl. Kap. 4.3). Aber auch ohne Existenz einer externen Spannung sollten an der SSM unter Gradientenbedingungen Ströme durch Ionenkanäle messbar sein, da der

Ionenstrom (I_i) über die Membran unter physiologischen Bedingungen vom vorherrschenden Membranpotential (V_m) und dem Gleichgewichtspotential (E_i) des transportierten Ions abhängt:

$$I_i = G_i(V_m - E_i)$$

wobei die elektrochemische Triebkraft durch die Differenz von V_m und E_i definiert ist (G_i = Leitfähigkeit des spezifischen Ions). Selbst wenn keine externe Spannung anliegt (bzw. kein Membranpotential vorherrscht: $V_m = 0$) besteht bei einem ausreichend großen Ionengradienten eine signifikante elektrochemische Triebkraft aus dem Gleichgewichtspotential des transportierten Ions, welches über die Nernst-Gleichung definiert ist:

$$E_i = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{i(\text{au\ss en})}}{c_{i(\text{innen})}}$$

Aus diesem Grund wurde für die initialen Versuchsbedingungen ein Na^+ -Gradient von 100 mM gewählt, was einerseits annähernd dem physiologischen Natriumgradienten an der Plasmamembran entspricht und außerdem eine ausreichend starke treibende Kraft generieren sollte. Bereits die ersten elektrophysiologischen Messungen von P2X_2 haben gezeigt, dass der Kanal makroskopisch praktisch keine und auf Einzelkanalebene nur eine sehr geringe Selektivität für einwertige Kationen besitzt ($\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$). Größere organische Kationen wie TMA^+ werden fast nicht geleitet [Ding & Sachs, 1999a], wobei der Kanal jedoch bei dauerhafter ATP-Applikation auch für NMDG^+ geringfügig permeabel ist [Egan *et al.*, 2006]. Um die SSM-Messpuffer osmotisch auszugleichen, wurde daher in der Ruhelösung Na^+ durch 100 mM TMA^+ ersetzt.

Aufgrund der Oberflächenartefakte durch veränderte Pufferbedingungen [Garcia-Celma *et al.*, 2007] konnte für die Detektion der P2X_2 Ströme kein einfaches Lösungswechselprotokoll verwendet werden. Stattdessen musste ein 5-stufiges Doppellösungswechselprotokoll angewendet werden, das es ermöglichte, die Artefakte bei der Etablierung des Na^+ -Gradienten ($\text{R} \rightarrow \text{NA}$) zeitlich von den ATP vermittelten Rezeptorströmen ($\text{NA} \rightarrow \text{A}$) zu separieren (Abb. 3-12 A).

4.2.2 Orientierungsspezifische P2X₂-Aktivierung der Membranvesikel

Interessanterweise führte die Änderung der vektoriellen Richtung des etablierten Gradienten (Abb. 3-12 B) zu einem Rezeptor-vermittelten Strom ähnlicher Amplitude in entgegengesetzter Richtung. Aufgrund der normalerweise stark einwärts rektifizierenden Charakteristik der P2X₂ Ströme in elektrophysiologischen Standardsystemen [North, 2002; Egan *et al.*, 2006] wäre unter einem auswärts gerichteten Gradienten eher eine verringerte Amplitude in entgegengesetzter Richtung zu erwarten gewesen. Wie bereits zu Beginn erwähnt, dient bei diesen Untersuchungen im Patch-Clamp oder TECV üblicherweise eine extern applizierte Spannung als treibende Kraft für den Ionentransport, während der Kanalstrom im SSM-Experiment ausschließlich über den Konzentrationsgradienten getrieben wird und die Versuchsbedingungen daher nicht direkt vergleichbar sind. Der molekulare Mechanismus der Rektifizierung ist weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass der Effekt auf eine spannungsabhängige Änderung des *Gatings* und/oder der Kanalleitfähigkeit zurück zu führen ist [Cloues, 1995; Zhou & Hume, 1998]. Somit käme dieser bei einer reinen Gradientenaktivierung wie im SSM-Experiment nicht zum Tragen.

Weiterhin ist das rektifizierende Verhalten des P2X₂ Rezeptors auch unter Standard-elektrophysiologischen Bedingungen nicht immer zu beobachten [Evans *et al.*, 1996; North, 2002]. Dennoch wurde für alle weiteren Untersuchungen ausschließlich ein einwärts gerichteter Ionengradient verwendet, der einer rektifizierenden Aktivität des Kanals nicht widerspricht. Obwohl bei der verwendeten Membranpräparation davon ausgegangen werden muss, dass die gewonnenen Vesikel in einer Mischorientierung vorliegen bzw. Membranfragmente sich in einer Mischorientierung an die SSM anlagern (vgl. Kap. 3.3.1 & 4.3), sollte der Ionentransport über den P2X₂-Rezeptor unter diesen Bedingungen (physiologisch) einwärts gerichtet stattfinden, da die Aktivierung des Rezeptors durch ATP ausschließlich über die extrazelluläre/-vesikuläre Bindungsstelle resultieren kann [North, 2002] und daher nur *rightside-out* Vesikel einen Strom generieren. In *inside-out* Vesikeln wäre die Bindungsstelle für extravesikulär appliziertes ATP nicht zugänglich, diese würden nicht zum Gesamtstrom beitragen. Somit entspricht ein einwärts gerichteter Ionengradient bei extravesikulärer ATP-Applikation am ehesten den physiologischen Verhältnissen an der Plasmamembran.

Obwohl die gemessenen Ströme mit 300-500 pA eine ausreichende Amplitude aufwiesen, waren sie wesentlich kleiner als bei konventionellen Ganz-Zell Patch-Clamp Messungen mit derselben Zelllinie (2-3 nA bei -100 mV, K. Feldbauer, AG Bamberg). Auch hier kann die Ursache in der Orientierung der angelagerten Membranpräparation gesucht werden.

Berücksichtigt man die Daten der bR-Pumpmessungen aus CHO-Membranpräparationen (vgl. Kap. 3.3.1), bei denen ausnahmslos positive bR-Pumpströme detektiert wurden, so ist davon auszugehen, dass die angelagerten Membranvesikel mehrheitlich in einer *inside-out* Konfiguration vorliegen. Da aber dennoch P2X₂-Ströme detektierbar sind, muss zumindest ein Teil der angelagerten Vesikel in einer *rightside-out* Orientierung vorhanden sein, so dass insgesamt von einer Mischorientierung mit einem Überschuss an *inside-out* orientierten Vesikeln auszugehen ist. Da die extrazelluläre ATP-Bindungsstelle der P2X-Kanäle jedoch in *inside-out* Vesikeln nicht durch einen schnellen extravesikulären ATP-Lösungswechsel zu erreichen ist (vgl. Abb. 4-3), trägt nur ein Teil der angelagerten Membranen zum Signal bei und es resultieren relativ geringe Amplituden.

Außerdem muss beim Vergleich der elektrophysiologischen Systeme berücksichtigt werden, dass die Patch-Clamp Untersuchungen meist bei stark negativen Potentialen (-100 mV) durchgeführt werden. Wählt man in einem solchen Experiment zur SSM vergleichbare Bedingungen (100 mM Na⁺-Gradient, 0 mV), lassen sich auch mit der Patch-Clamp Technik nur Ströme von wenigen 100 pA detektieren.

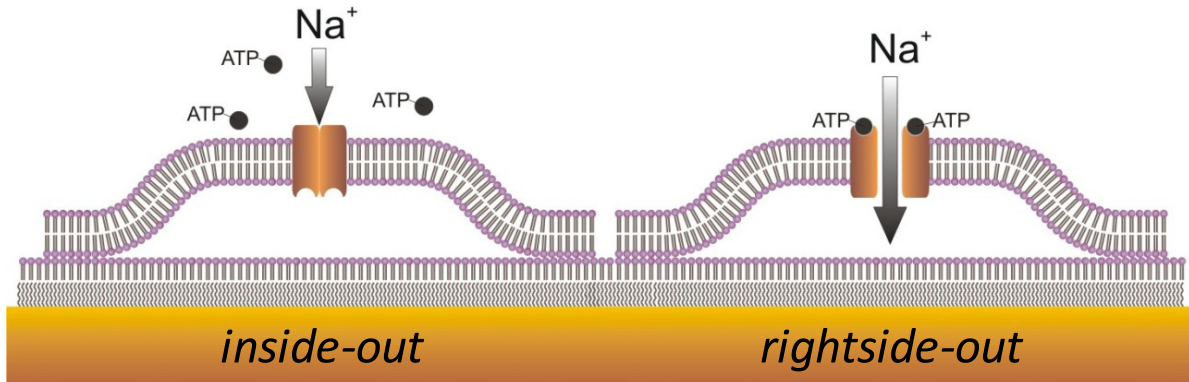


Abb. 4-3: Orientierung der adsorbierten Membranvesikel. In *inside-out* orientierten Vesikeln bzw. Fragmenten (links) liegt die ATP-Bindungsstelle der P2X₂-Rezeptoren im Inneren der Vesikel und ist daher für extrazellulär appliziertes ATP nicht erreichbar. Nur *rightside-out* orientierte Vesikel (rechts) tragen zum Signal bei.

4.2.3 Stabilität der Na⁺-Gradienten

Die unter den o.g. Bedingungen generierten Rezeptorströme waren mit einem Aktivitätsverlust von maximal 10% über einem Zeitraum von 90 Minuten und mindestens 100 Einzelmessungen hinreichend stabil, um Dosis-Wirkungsbeziehungen (ATP, Suramin) im gesamten Konzentrationsbereich an einem Einzelsensor durchführen zu können.

Bereits bei der Etablierung des geeigneten Lösungswechselprotokolls wurde deutlich, dass die Reproduzierbarkeit der Signalamplituden wesentlich von der Regeneration des Na⁺-Gradienten abhängt. Wurde der Sensor nach einer Aktivierung nicht vollständig mit Na⁺-freier Ruhelösung gespült und erfolgte die nächste Aktivierung in sehr kurzem zeitlichen Abstand (10 Sekunden), war ein signifikanter Einbruch der Signalamplituden festzustellen.

Die Untersuchungen zur Stabilität des Ionengradienten (Kap. 3.2.8) zeigten, dass der Na⁺-Gradient ohne Rezeptoraktivierungen über einen längeren Zeitraum relativ stabil zu bleiben scheint. Auch bei SSM-Messungen am Glutamat-Transporter EAAC1 konnten für K⁺-Gradienten Stabilitäten im Minuten-Bereich nachgewiesen werden [Krause *et al.*, 2009]. Sobald der P2X₂-Rezeptor jedoch in derselben Beobachtungszeit regelmäßig aktiviert wurde, war ein dramatischer Einbruch der Signalamplituden bis zu einem fast vollständigen Signalverlust zu beobachten (Zeitkonstante des Abfalls rund 100 s). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die angelagerten Vesikel bzw. Membranfragmente relativ dicht für einen passiven Na⁺-Leckstrom sind, bei Aktivierung des P2X₂ jedoch ein signifikanter Stofftransport über den Rezeptor stattfindet, der bei repetitiver Messung den Na⁺-Gradienten abbaut. Aus diesem Grund ist eine sorgfältige Regenerierung der Sensoren wichtig für reproduzierbare Signale bei wiederholten Messungen.

4.2.4 Spezifität der gemessenen Ströme

Durch Kontrollexperimente mit Digitoxigenin-Inhibition konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den gemessenen Signalen um Ströme der plasmamembranständigen Na⁺/K⁺-ATPase aus *inside-out* orientierten Vesikeln handelt, deren Ströme auch mit der SSM-Technik nachzuweisen sind [Seifert *et al.*, 1993; Pintschovius & Fendler, 1999; Pintschovius *et al.*, 1999] und die im nanomolaren Bereich durch Digitoxigenin vollständig inhibiert werden [Erlenkamp *et al.*, 1998]. Dass der gemessene Strom unter K⁺-Bedingungen eine vergleichbare Amplitude wie unter Na⁺-Bedingungen aufwies zeigt weiterhin, dass es sich bei den beobachteten Transportprozessen um passive Ionenströme entlang des etablierten Konzentrationsgradienten handelt. Ein aktiver Pump-Strom der Na⁺/K⁺-ATPase, bei der die jeweiligen Ionen mit Hilfe der Energie der ATP-Hydrolyse in entgegengesetzte Richtungen transportiert werden und daher in Anwesenheit von K⁺ kein (positiver) Strom auftreten sollte,

kann ausgeschlossen werden. Zum Einen ist intravesikulär unter Gradientenbedingungen kein K^+ vorhanden, welches exportiert werden könnte (was zu negativen Signalamplituden führen würde) und zum Anderen kann die ATP-Hydrolyse und somit der elektrogene Transportzyklus nur in Anwesenheit von gebundenem Na^+ stattfinden [Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Jorgensen *et al.*, 2003]. Dieses Verhalten konnte bereits zuvor bei vergleichbaren BLM-Messungen mit der Na^+/K^+ -ATPase beobachtet werden [Fendler, 1985]. Außerdem waren die detektierbaren Signale von adsorbierten, nicht exprimierenden Kontrollmembranen vernachlässigbar klein (Daten nicht gezeigt).

Die durchgeführte Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit zur Bestimmung des optimalen Na^+ -Gradienten (Kap. 3.2.4) ergab für den Rezeptorstrom ein sättigendes Verhalten ab ca. 100 mM Na^+ bei einem K_m -Wert von 25 mM. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Untersuchungen ein Na^+ -Gradient von 100 mM als optimal erachtet, da dieser in etwa den physiologischen Verhältnissen entspricht und durch eine weitere Erhöhung des Gradienten keine Vergrößerung der Rezeptorströme zu erwarten gewesen wäre. Ein ähnliches Sättigungsverhalten konnte bereits 1999 bei Einzelkanalmessungen an $P2X_2$ exprimierenden HEK-293 Zellen beobachtet werden, wobei dort eine spannungsabhängige (-140 bis -80 mV) Sättigung mit einem K_m im Bereich von 35-70 mM zu beobachten war [Ding & Sachs, 1999b]. Da an der SSM, wie bereits bei der Rektifizierung beschrieben, die Ströme über den Konzentrationsgradienten und nicht über die Spannung getrieben werden, ist es nicht möglich, die gewonnenen Werte direkt zu vergleichen. Allerdings liegt der berechnete K_m von 25 mM durchaus in derselben Größenordnung wie die Werte der Einzelkanalmessungen.

Das durch die Vorversuche optimierte Aktivierungsprotokoll war schließlich mit einem Z' -Faktor [Zhang *et al.*, 1999] von 0,67 (Kap. 3.2.5) ausreichend robust (Z' -Faktor $>0,5$), um Dosis-Wirkungsabhängigkeiten für agonistische Liganden und Inhibitoren zu bestimmen.

Der EC_{50} -Wert für ATP wird in der Literatur im Bereich von 10 – 30 μ M angegeben [Ding & Sachs, 1999a; Nakazawa & Ohno, 2004; Ohta *et al.*, 2005], jeweils mit einem Hill-Koeffizienten >1 , was für eine positive Kooperativität der ATP-Bindung spricht und somit zur Kanalöffnung mehrere ATP Moleküle benötigt werden [North, 2002].

Der an der SSM gemessene EC_{50} -Wert von 17,4 μ M (Hill-Koeffizient: 1,15) entspricht somit sehr gut den Literaturangaben (Kap. 3.2.6) und auch die Inhibitionsmessung (Kap. 3.2.7) mit dem $P2X$ -Standard-Inhibitor Suramin [Bultmann *et al.*, 1996], dessen Inhibitions-Mechanismus kontrovers diskutiert und für den der IC_{50} in einem breiten Konzentrationsbereich von 1-34 μ M angegeben wird [Evans *et al.*, 1995; Wildman *et al.*,

1998; Bianchi *et al.*, 1999; Trujillo *et al.*, 2006], fügt sich mit einem Wert von 6,7 μM gut in die bekannten Literaturwerte ein.

Zusammenfassend lässt sich auf Basis der gewonnenen Daten daher festhalten, dass sich die SSM-Technik neben dem Einsatz an primär und sekundär aktiven Transportern auch zur Charakterisierung von Ionenkanälen nutzen lässt.

Unabhängig von der unterschiedlichen Aktivierung des Ionenflusses durch die Kanäle lassen sich auch mit Hilfe eines rein Konzentrationsgradienten-getriebenen Transports vergleichbare elektrophysiologische Eigenschaften detektieren, bei denen die gemessenen Affinitäten für Agonisten und Inhibitoren gut mit den Literaturwerten aus Standard-elektrophysiologischen Versuchen überein stimmen.

4.3 Lichtgesteuerte Spannungskontrolle an der SSM

Wie in Kapitel 4.2 bereits kurz angesprochen, besteht bei der SSM-Technik nicht die Möglichkeit, den Fluss durch membranständige Transportproteine über eine extern angelegte Spannung zu steuern. Dies erschwert zum Einen die Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten mit klassischen elektrophysiologischen Experimenten und verhindert außerdem die Charakterisierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle wie z.B. Vertreter der Na⁺- und K⁺-Kanäle. Die Applikation einer externen Spannung über einen Funktionsgenerator ist an der SSM sehr wohl möglich und wird auch zur Bestimmung der elektrischen Eigenschaften und Qualitätskontrolle der Sensoren genutzt, jedoch hatte diese Spannung bei keinem der bisher untersuchten Proteine einen signifikanten Einfluss auf die Transportströme.

4.3.1 Kapazitive Kopplung und Spannungskontrolle

Die Ursache für diese Beobachtung ist durch die elektrische Geometrie des SSM-Membranverbunds zu erklären. Da bei dieser Technik die Transportproteine nicht in eine freistehende Membran inkorporiert werden wie es beispielsweise bei der BLM-Technik möglich ist, sondern in einem zweiten Membransystem (Liposom, Vesikel) auf die SSM aufgelagert werden, kommt es elektrisch zur kapazitiven Kopplung des Membranverbunds, wobei die SSM als eine kapazitive Elektrode mit hoher Kapazität und geringer Leitfähigkeit arbeitet. Dadurch ergibt sich für die Widerstände (bzw. Leitfähigkeiten) der einzelnen Membranen eine serielle Anordnung im Ersatzschaltbild.

Diese Konfiguration ist elektrisch als Spannungsteiler zu interpretieren, bei dem eine Gesamtspannung an den einzelnen (verschieden großen) Widerständen nach dem Ohm'schen Gesetz ($U = R \cdot I$) unterschiedlich stark abfällt. Da die SSM einen sehr hohen spezifischen Widerstand von $\sim 10^9 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ besitzt [Florin & Gaub, 1993], der Widerstand adsorbierter Liposomen- oder Vesikel-Membranen aufgrund eingelagerter Proteine aber deutlich kleiner ist, ist anzunehmen, dass ein Großteil der angelegten Spannung an der SSM abfällt und ein Transportprotein in der Vesikelmembran nur sehr geringen Spannungen ausgesetzt ist.

Weil elektrisch kein direkter Zugang zum Inneren des adsorbierten Vesikels besteht, dazu wäre eine Elektrode im Vesikel-Volumen notwendig, kann an dieser Membran keine kontrollierte Spannung angelegt werden, mit der Transportprozesse durch beispielsweise Ionenkanäle anzutreiben wären.

Eine verbreitete Methode, an vesikulären Membransystemen ohne elektrischen Zugang ein Potential zu erzeugen, ist der Einsatz von Ionophoren wie z.B. Valinomycin, einem hochspezifischen K⁺-Carrier [Stark *et al.*, 1971; Läuger, 1972], in Kombination mit einem entsprechenden K⁺-Ionengradienten, über den das einzustellende Potential kontrolliert werden

kann [Graves *et al.*, 2008]. Da Valinomycin allerdings eine sehr hohe Transportrate von 10^4 K^+ -Ionen/s pro Molekül aufweist, ist es für den Einsatz an der SSM nicht geeignet. Bei Inkorporation von Valinomycin in die Vesikelmembran würde dieses jeglichen Ladungstransport eines zu charakterisierenden Zielproteins sofort kompensieren, so dass keine netto-Ladungsverschiebung über die Membran detektierbar wäre. Das Vesikel wäre somit praktisch konstant auf das Gleichgewichtspotential des K^+ -Gradienten „geklemmt“ und die kapazitive Elektrode der SSM könnte keine Potentialänderungen detektieren.

Eine weitere relativ einfache Methode, die auch mit der SSM-Technik einsetzbar ist, stellt die Etablierung von asymmetrischen Ionengradienten unter Verwendung eines (passiv, unspezifisch) gut permeablen Ions in Verbindung mit einem nur schlecht permeablen Gegenion (siehe z.B. [Perozo & Hubbell, 1993]) dar. Durch das einseitige Einstellen der Gleichgewichtsbedingungen aufgrund der Ionendiffusion wird somit bei ausreichend großem Gradienten und geeigneter Ionenkombination ein Diffusionspotential aufgebaut. Die Methode hat gegenüber Ionophoren den Vorteil, dass man über die Kombination der Ionenkomposition die Permeabilität kontrollieren kann. Diese Strategie setzt allerdings voraus, dass die Ionenkompositionen in die Lösungswechselprotokolle zur Aktivierung der Zielproteine integriert werden können. Dies ist vor allem bei Proteinen, die zur Aktivierung ein doppeltes Lösungswechselprotokoll benötigen, weil ohnehin ein bestimmter Ionengradient aufgebaut werden muss, jedoch nicht immer problemlos möglich. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die Ionen zur Generierung des Membranpotentials nicht durch das Zielprotein transportiert werden und somit die eigentliche Messung der Proteinaktivität beeinflussen, was vor allem bei unspezifischen Ionenkanälen problematisch wäre. Aus diesem Grund müsste ein solcher Ionengradient für jedes zu untersuchende Zielprotein spezifisch angepasst werden, was einen erheblichen Entwicklungsaufwand bedeutet.

Deutlich eleganter wäre es, eine Möglichkeit der Spannungskontrolle zu etablieren, die sich generisch auf verschiedene Zielproteine anwenden lässt und nicht mit den fluidischen Aktivierungsprotokollen dieser Proteine interferiert.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit versucht, die Licht-getriebene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin [Oesterhelt & Stoeckenius, 1973] als Stromquelle zur Erzeugung einer Vesikelmembran-spezifischen Spannung einzusetzen.

4.3.2 Kombinierte Licht- & Lösungswechselaktivierung

Für den Einsatz von bR war es notwendig, apparative Voraussetzungen zu schaffen, die es ermöglichen, eine Licht- und Lösungswechselaktivierung gleichzeitig durchzuführen, da bisher immer nur Messaufbauten zum Einsatz kamen, die entweder auf eine Lichtaktivierung oder einen schnellen Lösungswechsel optimiert waren [Seifert *et al.*, 1993; Pintschovius & Fendler, 1999; Krause, 2006]. Von den drei getesteten Küvetten-Systemen vereinte nur die modifizierte SURFE²R One Küvette die gewünschten Voraussetzungen. Mit der klassischen SSM-Küvette konnten keine ausreichenden Signalamplituden erreicht werden, weder bei Licht- noch bei Lösungswechselaktivierung. Die Vergrößerung der aktiven Sensorfläche durch den Einsatz der Sensorplatten führte zwar zur gewünschten Verbesserung bei der Lichtaktivierung, jedoch waren mit diesem System keine stabilen Lösungswechselaktivierungen möglich. Die Auswascheffekte, die auftraten, wenn die Sensoren mit System-Drücken überspült wurden, welche für eine angemessene Zeitauflösung der messbaren Signale zwingend notwendig waren, lassen sich möglicherweise mit der geänderten Geometrie des Lösungswechsels erklären, da unter diesen Umständen der Sensor nicht mehr perfekt konzentrisch angespült werden konnte. Möglicherweise führten auftretende turbulente Strömungen somit zu einer Zerstörung der Sensoren. Außerdem waren mit diesem System keine ausreichenden Zeitaufösungen des Lösungswechsels zu erreichen, weil die Zuleitung zwischen Ventil und Sensor sehr lange sein musste, um die einzelnen *Wells* der Sensorplatten zu erreichen. Obwohl bei der modifizierten SURFE²R One Küvette fluidisch eine ähnliche Konfiguration bestand, traten hier beim Lösungswechsel keine Probleme auf, so dass diese für alle weiteren Messungen genutzt wurde.

4.3.3 Expression & Spannungskontrolle von bR in CHO Zellen

bR konnte zur Etablierung von Membranpotentialen zuvor bereits erfolgreich beispielsweise zur Aktivierung von spannungsgesteuerten Na⁺-Kanälen verwendet werden [Perozo & Hubbell, 1993]. Während bR dort zusammen mit Na⁺-Kanälen in Liposomen rekonstituiert wurde, was eine aufgereinigte Form des Zielproteins voraussetzt, lag der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung eukaryotischer Cl⁻-Kanäle und -transporter, die heterolog in CHO bzw. HEK-293 Zellen exprimiert wurden. Daher war das Ziel, bR simultan in diesen Zellen mit dem Zielprotein auf der Plasmamembran zu koexprimieren, um die präparierten Membranen direkt für die Messungen nutzen zu können. Zur Verbesserung der Oberflächenexpression von bR kam ein bereits zuvor charakterisiertes Fusionskonstrukt zum Einsatz, das N-terminal ein Transmembranfragment der β -Untereinheit der H⁺/K⁺-ATPase trug, welches den Transport des bakteriellen bRs in die Säugetierzellmembran unterstützen sollte [Geibel *et al.*, 2001].

Trotz dieses Schrittes zeigte die konfokale Analyse der Proteinlokalisierung über das C-terminal fusionierte EGFP, dass nur ein geringer Teil des exprimierten bRs in CHO Zellen die Plasmamembran erreicht, während ein Großteil in intrazellulären Kompartimenten, höchstwahrscheinlich ER und Golgi, verbleibt. Ein Verhalten, das auch bei der Expression von Halorhodopsin in Säugetierzellen wie Neuronen beobachtet werden kann [Zhao *et al.*, 2008]. Die Patch-Clamp Untersuchungen der generierten Zelllinie bestätigten diese Beobachtungen, da selbst bei Aktivierung mit sehr hohen Lichtintensitäten über einen DPSS-Laser nur kleine stationäre bR-Pumpströme im Bereich von ~ 1 pA/pF detektiert werden konnten und daher auch die bR-induzierten Spannungsänderungen nur wenige mV betragen. Im Vergleich dazu konnte bei Expression desselben Fusionsproteins in HEK-293 Zellen deutlich größere Ströme und Spannungsänderungen gemessen (vgl. Abb. 3-21) und auch in der Fluoreszenzanalyse eine bessere Membranexpression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so dass anzunehmen ist, dass das *Trafficking* des Fusionsproteins in HEK-293 Zellen effizienter funktioniert als in CHO Zellen. Allerdings sind HEK-293 Zellen für die Untersuchung von Cl-Kanälen an der SSM nicht geeignet, da Membranpräparationen dieser Zellen im Aktivierungsprotokoll für Cl-Kanäle (vgl. Kap. 2.8.6) unspezifische Artefakte generieren, die eine Auswertung der Transportprozesse verhindern. Außerdem besitzen HEK-293 Zellen eine wesentlich langsamere Dopplungsrate und sind in der Zellkultur sensibler, was die Gewinnung großer Zellmengen zur Membranpräparation im Vergleich zu CHO-Zellen erschwert.

4.3.4 Orientierung & Potentialaufbau von bR an der SSM

In seiner physiologischen Funktion transportiert bR Protonen von innen nach außen über die Plasmamembran, was zur Ausbildung eines negativen Membranpotentials führt, welches für die Steuerung eines Anionenstroms über einen Chloridkanal ungeeignet wäre. Allerdings werden bei Adsorption von Purpormembranen an BLM und SSM und auch bei Korekonstitution von bR in Liposomen ausschließlich Ströme detektiert, die auf eine *inside-out* Orientierung von bR hinweisen [Bamberg *et al.*, 1979; Seifert *et al.*, 1993; Lorch *et al.*, 2005; Basting *et al.*, 2008] und somit ein positives vesikuläres Membranpotential bewirken. Auch Membranpräparationen von bR-exprimierenden CHO Zellen generieren nach Adsorption an die SSM positive Ströme [Krause, 2006], was dafür spricht, dass sich entweder bereits beim Zellaufschluss Membranvesikel in einer *inside-out* Konfiguration bilden oder sich diese Vesikel bzw. Membranfragmente mehrheitlich in einer solchen Konfiguration an die SSM anlagern (Abb. 4-4).

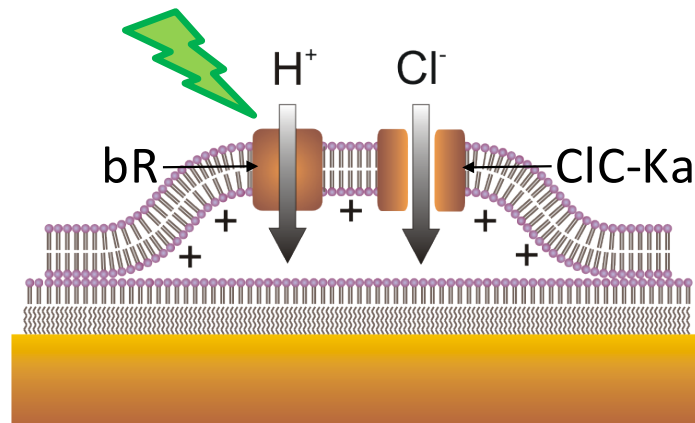


Abb. 4-4: Inside-out Orientierung von bR angelagerten Membranfragmenten. Durch die inside-out Orientierung von bR in angelagerten Membranfragmenten bzw. Vesikeln und fusionierten Liposomen wird durch den bR-Pumpstrom ein positives Potential an der Vesikelmembran aufgebaut. Dieses kann zum Antrieb eines Anionenkanals (ClC-Ka) genutzt werden.

Auf Basis der Lokalisations- und Patch-Clamp Daten der generierten ClC-Ka/bR CHO Zelllinie war es nicht überraschend, dass in den SSM-Messungen keinerlei Einfluss eines bR-induzierten Membranpotentials auf die ClC-Ka Ströme festgestellt werden konnte.

Analysiert man durch Integration der gemessenen Ströme die translokierte Ladung von bR bis zur Kanalaktivierung (~ 18 pC) und vergleicht diese mit der translokierten Ladung im Anstieg der Substratkonzentration bis zum Peakmaximum der ClC-Ka Ströme (~ 40 pC), welche zur Auswertung der Modulationseffekte genutzt wurden, so fällt auf, dass jegliches etabliertes Membranpotential bis zu diesem Zeitpunkt durch den Chlorid-Einstrom bereits wieder kompensiert sein musste. Selbst bei Reduktion der aktivierenden Chlorid-Konzentration auf 1 mM, welche die Amplituden der resultierenden Kanalströme annähernd an die bR Ströme angleicht, konnte kein modulierender Effekt festgestellt werden (Abb. 3-24). Auch bei solch geringen Strömen dürfte nach Analyse der translokierten Ladung (~ 10 pC) mehr als 50% des etablierten Potentials kompensiert worden sein.

Dass bR prinzipiell zur Erzeugung von signifikanten Membranpotentialen geeignet ist, konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Dabei wurden bei Messungen mit inkorporiertem bR in planaren *Bilayern* Spannungsänderungen im Bereich von 50-150 mV gemessen und eine Antriebskraft von 200 bis zu 300 mV kalkuliert [Drachev *et al.*, 1976; Setaka *et al.*, 1986]. Auch bei vesikulären Messungen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt ($\Delta\Psi$: 90 mV, PMF^{21} : 200 mV) [Renthal & Lanyi, 1976]. In Bamberg *et al.* (1979) konnte das maximal durch bR erreichbare Potential von Purpurmembranen, adsorbiert an eine BLM (und damit in direkt vergleichbarer Adsorptionsgeometrie zur SSM), auf 200 mV berechnet werden. Allerdings ist dieses Ergebnis eher als Richtwert zu betrachten, da zur Berechnung einige Annahmen gemacht werden mussten, wie z.B. der Ausschluss von H^+ -Leckleitfähigkeiten, welche aber

²¹ PMF: *proton-motive force*

im physiologischen Experiment sehr wohl vorhanden sein dürften. Somit ist dieser Wert eher als Obergrenze zu interpretieren. Das reale maximale Membranpotential kann etwas niedriger vermutet werden. Dennoch sind diese erreichbaren Potentialänderungen vergleichbar mit denen, die üblicherweise in klassischen elektrophysiologischen Untersuchungen von Ionenkanälen zum Einsatz kommen und sollten daher einen signifikanten Effekt auf die analysierten Kanalströme haben.

Allerdings waren die aus Purpurmembranen erreichbaren absoluten bR Ströme in der Regel wesentlich größer als die mit der generierten CIC-Ka/bR Zelllinie gemessenen und es konnte zuvor gezeigt werden, dass die Potentialänderung Lichtintensitäts- und somit auch bR-Amplituden abhängig ist [Perozo & Hubbell, 1993].

Um die prinzipielle Nutzbarkeit von bR als Mittel zur Potentialkontrolle an der SSM dennoch nachzuweisen, wurden daher auch Purpurmembranen untersucht, die bereits bei den ersten funktionellen Untersuchungen der SSM-Technik zum Einsatz kamen [Seifert *et al.*, 1993].

Die wesentlich größeren erreichbaren Signalamplituden von rund 3 nA bei Purpurmembranen im Vergleich zu den nur ~100 pA der CIC-Ka/bR Membranpräparation (unter identischen Messbedingungen, Abb. 3-25) motivierten zur Verwendung eines Fusionsprotokolls zur Korekonstitution von bR in CIC-ec1 Proteoliposomen [Lorch *et al.*, 2005; Basting *et al.*, 2008]. Bei der Rekonstitution mit dieser Methode kommt es zu einer Ausrichtung von rund 90% in *inside-out* Orientierung [Perozo & Hubbell, 1993].

Fusionierte Liposomen zeigten im selben Aktivierungsprotokoll wie die CIC-Ka/bR Membranpräparation vergleichbare Amplituden von Pump- und Kanalstrom im nA Bereich. Vergleicht man bei diesen Messungen wieder analog zu CIC-Ka/bR die translokierte Ladung von bR bis zur Kanalaktivierung (~500 pC) mit der translokierten Ladung von Aktivierung bis zum Peakmaximum des Kanalstroms (max. 80 pC), so ist ersichtlich, dass zu diesem Zeitpunkt lediglich knapp 20% des etablierten Potentials kompensiert sind und daher auch signifikante Amplitudenvergrößerungen von rund 100% der CIC-ec1 Ströme beobachtet werden konnten. Ein Vergleich der potentialbedingten CIC-ec1 Stromvergrößerung um einen Faktor von zwei mit Standard-elektrophysiologischen Messung inkorporierter CIC-ec1 Proteine im *Bilayer* [Accardi & Miller, 2004] ist nicht direkt möglich, da das tatsächlich vorherrschenden Membranpotential an der SSM nicht bekannt ist. Allerdings zeigt dieser bakterielle Transporter im Gegensatz zu einigen anderen CLC-Proteinen keinerlei rektifizierendes Verhalten, sondern eine rein Ohm'sche Strom-Spannungsabhängigkeit, so dass auch bei diesen Messungen Potentialänderungen von 50-60 mV nur eine Änderung der Stromamplitude von einem Faktor 3 zur Folge hatten [Accardi *et al.*, 2004].

4.3.5 Sättigung des bR-induzierten Potentials

Das Sättigungsverhalten der ClC-ec1 Modulation in Abhängigkeit von der Lichtintensität ab ca. 25% lässt sich nicht allein mit den bR Amplituden erklären, welche selbst bei voller Intensität und auch unter Einsatz des leistungsstärkeren DPSS-Lasers keine Sättigung erreichten (Abb. 3-28 A&B). Analysiert man allerdings wieder die translokierte Ladung im Zeitbereich der Lichtaktivierung (0,5 – 2,0 s), zeigt sich für diese sehr wohl ein Sättigungsverhalten mit einem Maximum von rund 500 pC ab ~25% Lichtintensität. Ab dieser Intensität erfolgte die Aufladung des Vesikels lediglich schneller. Aufgrund der fehlenden Information über Sensorbelegung und tatsächlicher Vesikelgröße nach Adsorption kann zwar keine Aussage über die absolute Kapazität der fusionierten Proteoliposomen gemacht, allerdings kann deren Kapazität als konstant betrachtet werden, da sich an der Geometrie während der Messung nichts ändert. Über die Beziehung:

$$C = \frac{Q}{U}$$

lässt sich unter Annahme konstanter Kapazität (C) und konstanter Ladung (Q) bei hohen Lichtintensitäten daher folgern, dass auch die Spannung (U) einen konstanten Wert annimmt und sich somit die beobachtete Sättigung der ClC-ec1 Modulation gut erklären lässt. Man könnte annehmen, dass auch bei kleineren bR-Pumpströmen (< 500 pA) immer dasselbe Potential aufgebaut wird, es bis zur vollständigen Etablierung entsprechend der Aufladezeit des Vesikels nur länger dauert. Allerdings sprechen die gewonnenen Ergebnisse (Abb. 3-28 B) eher dafür, dass bR bei geringen Lichtintensitäten und somit kleinen Stromamplituden nur geringe Potentiale zu induzieren vermag, da der modulierende Effekt auf die ClC-ec1 Ströme erst ab einer gewissen „Schwellenintensität“ einsetzte und dann bis zur Sättigung bei rund 25% stetig mit der Lichtintensität stieg, obwohl die bR Ströme auch bei geringen Intensitäten vollständig bis zur Kanalaktivierung abgeklungen waren.

Dieses Verhalten lässt sich möglicherweise durch Leckleitfähigkeiten für Protonen der Vesikel in der vorliegenden Adsorptionsgeometrie erklären, die einem durch bR aufgebauten Potential entgegen wirken, so dass eine gewisse Ladungstranslokation durch bR erreicht werden muss, um die Leckströme zu kompensieren und ein signifikantes Potential aufzubauen. Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen zur Potentialstabilität unterstützt (Abb. 3-28 C), bei der festgestellt werden konnte, dass ein etabliertes Potential innerhalb kurzer Zeit ($\tau = 1,45$ s) nach „Deaktivierung“ von bR nicht mehr nachzuweisen war. Da unter diesen Messbedingungen bis zur Kanalaktivierung (mit 30 mM Cl⁻) keinerlei Membran-permeable Anionen in den Messpuffern vorhanden waren (ausschließlich Aspartat und Gluconat), kann eine Kompensation des Membranpotentials durch nachfließende

Anionen ausgeschlossen werden. Auch bei Messungen von kombinierten Anionendiffusions- und bR-Potentialen waren die Spannungsänderungen abhängig von der Lichtintensität [Perozo & Hubbell, 1993].

4.3.6 pH-Einfluss & Einsatz von D85T bR

Es kann weiterhin ausgeschlossen werden, dass die modulierende Eigenschaft durch bR auf den Cl^-/H^+ -Antiporter CIC-ec1 auf Effekte durch pH- bzw. Protonengradienten zurückzuführen ist. Kalkuliert man unter Annahme einer typischen spezifischen Kapazität für biologische Membranen von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [Adam *et al.*, 2003] mit oben genannter Formel für ein durchschnittliches Liposom (Durchmesser: 200 nm) die zu translokierende Ladung, die zur Aufladung dieses Liposoms bei einer vorherrschenden Spannung von 200 mV über die Membran ins Vesikelinnere verschoben wird, so erhält man für einen Protonen-getragenen Ladungstransport eine intravesikuläre Änderung der Protonenkonzentration um lediglich rund $600 \mu\text{M}$. Bedenkt man weiterhin, dass die Messpuffer mit 60 mM HEPES (pH 7,2) stark gepuffert sind, ergibt sich über die Anwendung der Henderson-Hasselbalch'schen Gleichung eine pH-Änderung im Inneren des Liposoms von vernachlässigbaren 0,004 pH. Diese Werte sind allerdings nur als grobe Abschätzung zu interpretieren, da weder die exakt vorherrschende Spannung im Vesikel bekannt ist (welche tendenziell als niedriger anzunehmen ist), noch Daten über die Geometrie und das innere Volumen der adsorbierten Liposomen existieren.

Aufgrund der gerichteten Inkorporation von bR in Proteoliposomen ist es mit dieser Methode nur möglich, positive Potentiale zu erzeugen, was für die Untersuchung von Anionenkanälen und -transportern an der SSM zwar hilfreich, bei der Charakterisierung von Kationenkanälen allerdings nutzlos erscheint, wenn man aus den genannten Gründen auf Anionendiffusionspotentiale verzichten möchte. Elegant wäre eine Lösung, bei der man durch über das eingestrahlte Licht die Richtung des Potentials kontrollieren könnte. Die bR Mutante D85T wäre zu diesem Einsatz optimal geeignet, da sie je nach Bestrahlung mit weißem oder blauem Licht die Vektorialität ihrer Pumpeigenschaften verändert (Abb. 3-28 D) [Tittor *et al.*, 1994; Tittor *et al.*, 1995]. Leider hat sich der Einsatz der Mutante als nicht praktikabel erwiesen, da auch mit dieser nur relativ kleine bR-Pumpströme realisiert werden konnten und kein Einfluss des damit etablierten Potentials auf die CIC-ec1 Ströme detektierbar war. Weiterhin war das Fusionsprotokoll der Purpurmembranen nicht auf die CIC-Ka CHO-Membranpräparationen übertragbar. Bei Anwendung war auch hier keine Potential-bedingte Modulation feststellbar.

4.3.7 Alternative Möglichkeiten

Auf Grundlage der vorliegenden Daten lässt sich zusammenfassen, dass eine Licht-getriebene Protonenpumpe wie bR prinzipiell sehr gut zur Spannungskontrolle bei SSM-Experimenten geeignet ist. Allerdings erscheint die konventionelle Säugetierzelllinie CHO als Expressionssystem zu diesem Zweck ungeeignet, da diese offensichtlich das bakterielle Protein nicht korrekt prozessieren kann und die Oberflächenexpression für die gewünschte Anwendung nicht ausreicht. Aufgrund der gewonnenen Daten lässt sich abschätzen, dass zur Bildung eines ausreichend großen und über die gesamte Messung stabilen Membranpotentials bR Pumpströme mit einer Peakamplitude von mindestens 1 nA notwendig sind. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass im SSM-Experiment auch unfusionierte Purpurchloroplasten zum Gesamtsignal beitragen und anhand der vorliegenden Daten keine Aussage über die Effizienz der Fusion und somit den relativen Beitrag unfusionierter Vesikel zum makroskopischen Strom getroffen werden kann.

Prinzipiell scheinen HEK-293 Zellen bR besser auf ihrer Plasmamembran exprimieren zu können, allerdings waren auch hier keine wesentlich größeren bR Ströme messbar, von denen man ausgehen könnte, dass sie im SSM-Experiment ausreichende Potentiale produzieren. Die von Geibel *et al.* (2001) publizierten Pumpströme von 20 pA/pF konnten mit identischem Expressionsvektor jedenfalls nicht reproduziert werden.

Möglicherweise ließe sich die Oberflächenexpression von bR durch Veränderung der Signal-Peptidsequenz und Einfügung von ER-Exportsignalen analog zu Halorhodopsin (hR) optimieren [Zhao *et al.*, 2008]. Auch der direkte Einsatz von hR, das mittlerweile in der „Optogenetik“ verbreitet Anwendung findet [Zhang *et al.*, 2007; Gradinaru *et al.*, 2008], wäre denkbar, allerdings ist dieser Ansatz aufgrund der Cl⁻-Pumpeigenschaft [Bamberg *et al.*, 1994] zur Untersuchung von Chlorid-Kanälen und -transportern ungeeignet.

Schließlich wäre als eine weitere Möglichkeit der Einsatz von eukaryotischen Licht-getriebenen H⁺-Pumpen wie zum Beispiel dem *Acetabularia* Rhodopsin (aR) aus der Alge *Acetabularia acetabulum* zu nennen, welches in *Xenopus* Oozyten große Pumpströme generiert und das aufgrund der engeren Verwandtschaft auch in Säugetier-Expressionssystemen wie HEK-293 und CHO besser exprimiert werden könnte und somit eine größere Oberflächenexpression erreichbar wäre [Tsunoda *et al.*, 2006].

4.4 Zusammenfassung & Ausblick

Anhand des ligandengesteuerten Kationenkanals P2X₂ konnte die prinzipielle Eignung der SSM-Technik für die elektrophysiologische Charakterisierung von Ionenkanälen gezeigt werden. Es war möglich, stabile Kationengradienten zu generieren, P2X₂ spezifische Ströme durch schnelle ATP-Applikation zu detektieren und somit einen robusten *Assay* zur Untersuchung des P2X₂-Kanals zu etablieren. Die gemessenen Affinitäten für ATP und den Standardinhibitor Suramin waren gut mit den Literaturwerten aus konventionellen elektrophysiologischen Untersuchungen vergleichbar. Dennoch waren die erreichbaren Signalamplituden aufgrund der fehlenden Spannungskontrolle deutlich geringer als im konventionellen elektrophysiologischen Experiment (z.B. Patch-Clamp).

Durch die fehlende Spannungskontrolle können die klassischen elektrophysiologischen Messbedingungen an der SSM daher nicht exakt nachgestellt werden. Die Strategie, eine Spannungskontrolle durch Koexpression von Bakteriorhodopsin zu etablieren, war aufgrund der schlechten Membranexpression des bakteriellen Proteins in CHO Zellen nicht direkt erfolgreich. Prinzipiell konnte jedoch gezeigt werden, dass die Modulation eines Ionenkanals mit Hilfe einer Licht-gesteuerten Ionenpumpe möglich ist. Der Einsatz eukaryotischer Ionenpumpen, kombiniert mit Ionendiffusionspotentialen [Perozo & Hubbell, 1993], könnte sich daher als erfolgsversprechend erweisen und die SSM-Technik für die Charakterisierung von spannungsgesteuerten Ionenkanälen öffnen.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit mit ClC-7 ein intrazelluläres Transportprotein in seiner nativen Membranumgebung mit Hilfe der SSM-Technik elektrophysiologisch charakterisiert werden. Neben der heterologen Expression und grundsätzlichen elektrophysiologischen Untersuchung war es außerdem möglich, das Lokalisationsverhalten einer physiologisch wichtigen Mutante (G213R) nachzuweisen. Die osteopetrotischen Symptome, die mit dieser Mutation in Verbindung gebracht werden (ADOII), scheinen auf Grundlage der vorliegenden Untersuchungen in einem gestörten *Trafficking* und weniger in einer gestörten Aktivität von ClC-7 begründet zu sein.

Mit Hilfe der SSM-Technik konnten die grundlegenden charakteristischen Eigenschaften wie pH-Abhängigkeit und Anionenpermeabilität von ClC-7 untersucht werden. Weiterhin war es möglich, die Protonen gekoppelte Transportaktivität direkt nachzuweisen und ClC-7 somit der Gruppe der Cl⁻/H⁺-Antiporter zu zuordnen. Auch die Interaktion von ClC-7 mit seiner Untereinheit Ostm1 konnte mit Hilfe der SSM-Technik nachgewiesen und untersucht werden.

Eine intensive elektrophysiologische Charakterisierung beispielsweise der Kopplungs-Stöchiometrie war allerdings aufgrund der fehlenden Spannungskontrolle und Artefaktanfälligkeit der SSM-Technik mit den verwendeten Methoden nicht möglich.

Dennoch konnte auf dieser Grundlage ein *Assay* etabliert werden, der die Charakterisierung von potentiellen CIC-7 Inhibitoren ermöglicht. Wegen seiner Relevanz in der Osteoporose-Therapie ist CIC-7 auch von bedeutendem pharmakologischem Interesse, entzieht sich jedoch aufgrund seiner intrazellulären Lokalisierung den konventionellen elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden. In diesem Feld besitzt die SSM-Technik ein großes Potential. In Verbindung mit den etablierten CIC-7 Zelllinien könnte sie eine robuste *Screening*-Plattform zur Untersuchung und Optimierung möglicher Inhibitoren bieten.

5 Literatur

- Accardi A., Kolmakova-Partensky L., Williams C., Miller C. (2004) Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *J Gen Physiol* **123**: 109-119
- Accardi A., Miller C. (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *Nature* **427**: 803-807
- Accardi A., Walden M., Nguitragool W., Jayaram H., Williams C., Miller C. (2005) Separate ion pathways in a Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* **126**: 563-570
- Adam G., Läuger P., Stark G. Physikalische Chemie und Biophysik, 4. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg, 2003
- Alberts B., Johnson A., Walter P., Lewis J., Raff M., Roberts K., Orme N. Molecular Biology of the Cell, 5. Auflage, Taylor & Francis, London, 2008
- Aschrafi A., Sadtler S., Niculescu C., Rettinger J., Schmalzing G. (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes. *J Mol Biol* **342**: 333-343
- Autuori F., Brunk U., Peterson E., Dallner G. (1982) Fractionation of isolated liver cells after disruption with a nitrogen bomb and sonication. *J Cell Sci* **57**: 1-13
- Bamberg E., Apell H.J., Dencher N.A., Sperling W., Stieve H., Lauger P. (1979) Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin on Planar Bilayer Membranes. *Biophys Struct Mech* **5**: 277-292
- Bamberg E., Oesterhelt D., Tittor J. (1994) Function of halorhodopsin as a light-driven H⁺ pump. *Ren Physiol Biochem* **17**: 194-197
- Bartolommei G., Buoninsegni F.T., Moncelli M.R. (2004) Calcium transport by sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase can be investigated on a solid-supported membrane. *Bioelectrochemistry* **63**: 157-160
- Basting D., Lorch M., Lehner I., Glaubitz C. (2008) Transport cycle intermediate in small multidrug resistance protein is revealed by substrate fluorescence. *FASEB J* **22**: 365-373
- Becq F. (2006) On the discovery and development of CFTR chloride channel activators. *Curr Pharm Des* **12**: 471-484
- Bennekou P., de Franceschi L., Pedersen O., Lian L., Asakura T., Evans G., Brugnara C., Christophersen P. (2001) Treatment with NS3623, a novel Cl⁻ conductance blocker, ameliorates erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice: a possible new therapeutic approach for sickle cell disease. *Blood* **97**: 1451-1457
- Bennetts B., Parker M.W., Cromer B.A. (2007) Inhibition of skeletal muscle CLC-1 chloride channels by low intracellular pH and ATP. *J Biol Chem* **282**: 32780-32791

- Bennetts B., Rychkov G.Y., Ng H.L., Morton C.J., Stapleton D., Parker M.W., Cromer B.A. (2005) Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels. *J Biol Chem* **280**: 32452-32458
- Berryman M., Bruno J., Price J., Edwards J.C. (2004) CLIC-5A functions as a chloride channel in vitro and associates with the cortical actin cytoskeleton in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **279**: 34794-34801
- Bianchi B.R., Lynch K.J., Touma E., Niforatos W., Burgard E.C., Alexander K.M., Park H.S., Yu H., Metzger R., Kowaluk E., Jarvis M.F., van Biesen T. (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **376**: 127-138
- Bonifacino J.S., Traub L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**: 395-447
- Brake A.J., Wagenbach M.J., Julius D. (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**: 519-523
- Brandt S., Jentsch T.J. (1995) ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett* **377**: 15-20
- Bregestovski P., Waseem T., Mukhtarov M. (2009) Genetically encoded optical sensors for monitoring of intracellular chloride and chloride-selective channel activity. *Front Mol Neurosci* **2**: 15
- Brüggemann A., Stoelzle S., George M., Behrends J.C., Fertig N. (2006) Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording. *Small* **2**: 840-846
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. (1987) X11-Blue - a High-Efficiency Plasmid Transforming *Escherichia-Coli* Strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* **5**: 376-&
- Bultmann R., Wittenburg H., Pause B., Kurz G., Nickel P., Starke K. (1996) P2-purinoceptor antagonists: III. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to suramin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**: 498-504
- Burzik C., Kaim G., Dimroth P., Bamberg E., Fendler K. (2003) Charge displacements during ATP-hydrolysis and synthesis of the Na⁺-transporting FoF1-ATPase of *Ilyobacter tartaricus*. *Biophys J* **85**: 2044-2054
- Buyse G., Voets T., Tytgat J., De Greef C., Droogmans G., Nilius B., Eggermont J. (1997) Expression of human pICln and ClC-6 in *Xenopus* oocytes induces an identical endogenous chloride conductance. *J Biol Chem* **272**: 3615-3621
- Campos-Xavier A.B., Saraiva J.M., Ribeiro L.M., Munnich A., Cormier-Daire V. (2003) Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Genet* **112**: 186-189

- Chalhoub N., Benachenhou N., Rajapurohitam V., Pata M., Ferron M., Frattini A., Villa A., Vacher J. (2003) Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat Med* **9**: 399-406
- Cleiren E., Benichou O., Van Hul E., Gram J., Bollerslev J., Singer F.R., Beaverson K., Aledo A., Whyte M.P., Yoneyama T., deVernejoul M.C., Van Hul W. (2001) Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CLCN7 chloride channel gene. *Hum Mol Genet* **10**: 2861-2867
- Cloues R. (1995) Properties of ATP-gated channels recorded from rat sympathetic neurons: voltage dependence and regulation by Zn²⁺ ions. *J Neurophysiol* **73**: 312-319
- Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38
- Diewald L., Rupp J., Dreger M., Hucho F., Gillen C., Nawrath H. (2002) Activation by acidic pH of CLC-7 expressed in oocytes from *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 421-424
- Ding S., Sachs F. (1999a) Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol* **172**: 215-223
- Ding S., Sachs F. (1999b) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J Gen Physiol* **113**: 695-720
- Drachev L.A., Frolov V.N., Kaulen A.D., Liberman E.A., Ostroumov S.A., Plakunova V.G., Semenov A.Y., Skulachev V.P. (1976) Reconstitution of Biological Molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin. *J Biol Chem* **251**: 7059-7065
- Dunlop J., Bowlby M., Peri R., Vasilyev D., Arias R. (2008) High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 358-368
- Duran C., Thompson C.H., Xiao Q., Hartzell H.C. (2009) Chloride Channels: Often Enigmatic, Rarely Predictable. *Annu Rev Physiol*
- Dutzler R. (2007) A structural perspective on ClC channel and transporter function. *FEBS Lett* **581**: 2839-2844
- Dutzler R., Campbell E.B., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**: 287-294
- Egan T.M., Samways D.S., Li Z. (2006) Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch* **452**: 501-512
- Engelman D.M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**: 578-580
- Erlenkamp S., Gretzer B., Zillikens S., Glitsch H.G., Pusch H., Staroske T., Welzel P. (1998) Na⁺/K⁺ pump inhibition and positive inotropic effect of digitoxigenin and some C-22-

- substituted derivatives in sheep cardiac preparations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **357**: 54-62
- Estevez R., Boettger T., Stein V., Birkenhager R., Otto E., Hildebrandt F., Jentsch T.J. (2001) Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* **414**: 558-561
- Estevez R., Jentsch T.J. (2002) CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 531-539
- Estevez R., Pusch M., Ferrer-Costa C., Orozco M., Jentsch T.J. (2004) Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *J Physiol* **557**: 363-378
- Evans R.J., Lewis C., Buell G., Valera S., North R.A., Surprenant A. (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* **48**: 178-183
- Evans R.J., Lewis C., Virginio C., Lundstrom K., Buell G., Surprenant A., North R.A. (1996) Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* **497 (Pt 2)**: 413-422
- Faundez V., Hartzell H.C. (2004) Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway. *Sci STKE* **2004**: re8
- Fendler J.H. (1985) Molecular recognition, catalysis, and transport in polymerized surfactant vesicles. *Ann N Y Acad Sci* **446**: 308-318
- Flores C.A., Niemeyer M.I., Sepulveda F.V., Cid L.P. (2006) Two splice variants derived from a *Drosophila melanogaster* candidate CLC gene generate CLC-2-type Cl⁻ channels. *Mol Membr Biol* **23**: 149-156
- Florin E.L., Gaub H.E. (1993) Painted supported lipid membranes. *Biophysical Journal* **64**: 375-383
- Frattoni A., Pangrazio A., Susani L., Sobacchi C., Mirolo M., Abinun M., Andolina M., Flanagan A., Horwitz E.M., Mihci E., Notarangelo L.D., Ramenghi U., Teti A., Van Hove J., Vujic D., Young T., Albertini A., Orchard P.J., Vezzoni P., Villa A. (2003) Chloride channel CLCN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J Bone Miner Res* **18**: 1740-1747
- Freundt E.C., Czapiga M., Lenardo M.J. (2007) Photoconversion of LysoTracker Red to a green fluorescent molecule. *Cell Res* **17**: 956-958
- Friedrich T., Breiderhoff T., Jentsch T.J. (1999) Mutational analysis demonstrates that CLC-4 and CLC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* **274**: 896-902
- Fuchs R., Male P., Mellman I. (1989) Acidification and ion permeabilities of highly purified rat liver endosomes. *J Biol Chem* **264**: 2212-2220

- Fujita N., Mori H., Yura T., Ishihama A. (1994) Systematic sequencing of the Escherichia coli genome: analysis of the 2.4-4.1 min (110,917-193,643 bp) region. *Nucleic Acids Res* **22**: 1637-1639
- Ganea C., Fendler K. (2009) Bacterial transporters: charge translocation and mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 706-713
- Garcia-Celma J.J., Hatahet L., Kunz W., Fendler K. (2007) Specific anion and cation binding to lipid membranes investigated on a solid supported membrane. *Langmuir* **23**: 10074-10080
- Garcia-Celma J.J., Smirnova I.N., Kaback H.R., Fendler K. (2009) Electrophysiological characterization of LacY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7373-7378
- Geibel S., Flores-Herr N., Licher T., Vollert H. (2006) Establishment of cell-free electrophysiology for ion transporters: application for pharmacological profiling. *J Biomol Screen* **11**: 262-268
- Geibel S., Friedrich T., Ormos P., Wood P.G., Nagel G., Bamberg E. (2001) The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior. *Biophys J* **81**: 2059-2068
- Gever J.R., Cockayne D.A., Dillon M.P., Burnstock G., Ford A.P. (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* **452**: 513-537
- Gill S., Gill R., Lee S.S., Hesketh J.C., Fedida D., Rezazadeh S., Stankovich L., Liang D. (2003) Flux assays in high throughput screening of ion channels in drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* **1**: 709-717
- Gonzalez J.E., Oades K., Leychkis Y., Harootunian A., Negulescu P.A. (1999) Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets. *Drug Discov Today* **4**: 431-439
- Gradinaru V., Thompson K.R., Deisseroth K. (2008) eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol* **36**: 129-139
- Graham J.M. (2001) Isolation of lysosomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**: Unit 3 6
- Graves A.R., Curran P.K., Smith C.L., Mindell J.A. (2008) The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* **453**: 788-792
- Greene J.R., Brown N.H., DiDomenico B.J., Kaplan J., Eide D.J. (1993) The GEF1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol Gen Genet* **241**: 542-553
- Gropp T., Brustovetsky N., Klingenberg M., Muller V., Fendler K., Bamberg E. (1999) Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys J* **77**: 714-726
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

- Hara-Chikuma M., Wang Y., Guggino S.E., Guggino W.B., Verkman A.S. (2005) Impaired acidification in early endosomes of ClC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun* **329**: 941-946
- Hebeisen S., Biela A., Giese B., Muller-Newen G., Hidalgo P., Fahlke C. (2004) The role of the carboxyl terminus in ClC chloride channel function. *J Biol Chem* **279**: 13140-13147
- Hebeisen S., Heidtmann H., Cosmelli D., Gonzalez C., Poser B., Latorre R., Alvarez O., Fahlke C. (2003) Anion permeation in human ClC-4 channels. *Biophys J* **84**: 2306-2318
- Hechenberger M., Schwappach B., Fischer W.N., Frommer W.B., Jentsch T.J., Steinmeyer K. (1996) A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a ClC gene disruption. *J Biol Chem* **271**: 33632-33638
- Henriksen K., Gram J., Neutzky-Wulff A.V., Jensen V.K., Dziegiel M.H., Bollerslev J., Karsdal M.A. (2009) Characterization of acid flux in osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in ClC-7. *Biochem Biophys Res Commun* **378**: 804-809
- Henriksen K., Gram J., Schaller S., Dahl B.H., Dziegiel M.H., Bollerslev J., Karsdal M.A. (2004) Characterization of osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in ClC-7 causing autosomal dominant osteopetrosis type II. *Am J Pathol* **164**: 1537-1545
- Henriksen K., Sorensen M.G., Jensen V.K., Dziegiel M.H., Nosjean O., Karsdal M.A. (2008) Ion transporters involved in acidification of the resorption lacuna in osteoclasts. *Calcif Tissue Int* **83**: 230-242
- Henriksen K., Sorensen M.G., Nielsen R.H., Gram J., Schaller S., Dziegiel M.H., Everts V., Bollerslev J., Karsdal M.A. (2006) Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification. *J Bone Miner Res* **21**: 58-66
- Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes, 2. Auflage, Sinauer Associates Inc., Sunderland, 1992
- Hunter M.J., Commerford S.L. (1961) Pressure homogenization of mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* **47**: 580-586
- Iyer R., Iverson T.M., Accardi A., Miller C. (2002) A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* **419**: 715-718
- Jentsch T.J. (2007) Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of ClC chloride transporters. *J Physiol* **578**: 633-640
- Jentsch T.J. (2008) ClC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 3-36
- Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A.A. (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**: 503-568

- Jentsch T.J., Steinmeyer K., Schwarz G. (1990) Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes*. *Nature* **348**: 510-514
- Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* **65**: 817-849
- Kajiya H., Okamoto F., Ohgi K., Nakao A., Fukushima H., Okabe K. (2009) Characteristics of ClC7 Cl⁻ channels and their inhibition in mutant (G215R) associated with autosomal dominant osteopetrosis type II in native osteoclasts and hClcn7 gene-expressing cells. *Pflugers Arch* **458**: 1049-1059
- Karsdal M.A., Henriksen K., Sorensen M.G., Gram J., Schaller S., Dziegiel M.H., Heegaard A.M., Christophersen P., Martin T.J., Christiansen C., Bollerslev J. (2005) Acidification of the osteoclastic resorption compartment provides insight into the coupling of bone formation to bone resorption. *Am J Pathol* **166**: 467-476
- Kasper D., Planells-Cases R., Fuhrmann J.C., Scheel O., Zeitz O., Ruether K., Schmitt A., Poet M., Steinfeld R., Schweizer M., Kornak U., Jentsch T.J. (2005) Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *EMBO J* **24**: 1079-1091
- Kornak U., Kasper D., Bosl M.R., Kaiser E., Schweizer M., Schulz A., Friedrich W., Delling G., Jentsch T.J. (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**: 205-215
- Kornak U., Schulz A., Friedrich W., Uhlhaas S., Kremens B., Voit T., Hasan C., Bode U., Jentsch T.J., Kubisch C. (2000) Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Hum Mol Genet* **9**: 2059-2063
- Krause R. (2006) Festkörperunterstützte Membranen zur Untersuchung von elektrogenen Transportvorgängen und deren Potential für die Hochdurchsatz-Wirkstoffsuche. Dissertation, Abt. Biophysikalische Chemie, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt
- Krause R., Watzke N., Kelety B., Dorner W., Fendler K. (2009) An automatic electrophysiological assay for the neuronal glutamate transporter mEAAC1. *J Neurosci Methods* **177**: 131-141
- Lachnit W.G., Costantin J.L. (2002) Drug discovery technology for ion channels. *Drug Discov Today* **7**: 651-652
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lange P.F., Wartosch L., Jentsch T.J., Fuhrmann J.C. (2006) ClC-7 requires Ostml as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* **440**: 220-223
- Läuger P. (1972) Carrier-mediated ion transport. *Science* **178**: 24-30

- Liantonio A., Accardi A., Carbonara G., Fracchiolla G., Loiodice F., Tortorella P., Traverso S., Guida P., Pierno S., De Luca A., Camerino D.C., Pusch M. (2002) Molecular requisites for drug binding to muscle CLC-1 and renal CLC-K channel revealed by the use of phenoxy-alkyl derivatives of 2-(p-chlorophenoxy)propionic acid. *Mol Pharmacol* **62**: 265-271
- Lindl T., Bauer J. Zell- und Gewebekultur, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1989
- Lingrel J.B., Kuntzweiler T. (1994) Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem* **269**: 19659-19662
- Lorch M., Lehner I., Siarheyeva A., Basting D., Pflieger N., Manolikas T., Glaubitz C. (2005) NMR and fluorescence spectroscopy approaches to secondary and primary active multidrug efflux pumps. *Biochem Soc Trans* **33**: 873-877
- Lorenz C., Pusch M., Jentsch T.J. (1996) Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13362-13366
- Ludewig U., Pusch M., Jentsch T.J. (1996) Two physically distinct pores in the dimeric CLC-0 chloride channel. *Nature* **383**: 340-343
- Ludwig M., Doroszewicz J., Seyberth H.W., Bokenkamp A., Balluch B., Nuutinen M., Utsch B., Waldegger S. (2005) Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: implications for CLC-5 channel trafficking and internalization. *Hum Genet* **117**: 228-237
- Lurin C., Guclu J., Cheniclet C., Carde J.P., Barbier-Brygoo H., Maurel C. (2000) CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers. *Biochem J* **348 Pt 2**: 291-295
- Malekova L., Tomaskova J., Novakova M., Stefanik P., Kopacek J., Lakatos B., Pastorekova S., Krizanova O., Breier A., Ondrias K. (2007) Inhibitory effect of DIDS, NPPB, and phloretin on intracellular chloride channels. *Pflugers Arch* **455**: 349-357
- Manolagas S.C. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**: 115-137
- Maranda B., Chabot G., Decarie J.C., Pata M., Azeddine B., Moreau A., Vacher J. (2008) Clinical and cellular manifestations of OSTM1-related infantile osteopetrosis. *J Bone Miner Res* **23**: 296-300
- Markovic S., Dutzler R. (2007) The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel CLC-Ka reveals a conserved interaction interface. *Structure* **15**: 715-725
- Martin T.J., Seeman E. (2007) New mechanisms and targets in the treatment of bone fragility. *Clin Sci (Lond)* **112**: 77-91
- Matsuda J.J., Filali M.S., Collins M.M., Volk K.A., Lamb F.S. (2010) The CLC-3 Cl⁻/H⁺ antiporter becomes uncoupled at low extracellular pH. *J Biol Chem* **285**: 2569-2579

- Matsuda J.J., Filali M.S., Volk K.A., Collins M.M., Moreland J.G., Lamb F.S. (2008) Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**: C251-262
- Matulef K., Howery A.E., Tan L., Kobertz W.R., Du Bois J., Maduke M. (2008) Discovery of potent CLC chloride channel inhibitors. *ACS Chem Biol* **3**: 419-428
- Meadows N.A., Sharma S.M., Faulkner G.J., Ostrowski M.C., Hume D.A., Cassady A.I. (2007) The expression of *Clcn7* and *Ostm1* in osteoclasts is coregulated by microphthalmia transcription factor. *J Biol Chem* **282**: 1891-1904
- Mellman I., Fuchs R., Helenius A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**: 663-700
- Meyer S., Savaresi S., Forster I.C., Dutzler R. (2007) Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter CLC-5. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 60-67
- Miller C. (2006) CLC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* **440**: 484-489
- Miller C., White M.M. (1984) Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 2772-2775
- Mitchner N.A., Harris S.T. (2009) Current and emerging therapies for osteoporosis. *J Fam Pract* **58**: S45-49
- Mohammad-Panah R., Harrison R., Dhani S., Ackerley C., Huan L.J., Wang Y., Bear C.E. (2003) The chloride channel CLC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking. *J Biol Chem* **278**: 29267-29277
- Nakatsu F., Ohno H. (2003) Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct* **28**: 419-429
- Nakazawa K., Ohno Y. (2004) Desensitization of P2X2 receptor/channel pore mutants. *Eur J Pharmacol* **495**: 27-33
- Neutzsky-Wulff A.V., Karsdal M.A., Henriksen K. (2008) Characterization of the bone phenotype in CLC-7-deficient mice. *Calcif Tissue Int* **83**: 425-437
- Nicke A., Baumert H.G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E., Schmalzing G. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* **17**: 3016-3028
- Nicolson G.L., Singer S.J. (1972) Electron microscopic localization of macromolecules on membrane surfaces. *Ann N Y Acad Sci* **195**: 368-375
- Nilius B., Droogmans G. (2003) Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* **177**: 119-147
- North R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**: 1013-1067

- O'Gorman S., Fox D.T., Wahl G.M. (1991) Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251**: 1351-1355
- Obrdlik P., Diekert K., Watzke N., Keipert C., Pehl U., Brosch C., Boehm N., Bick I., Ruitenbergh M., Volkandt W., Kelety B. (2010) Electrophysiological characterization of ATPases in native synaptic vesicles and synaptic plasma membranes. *Biochem J*
- Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 2853-2857
- Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1974) Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol* **31**: 667-678
- Ohta T., Kubota A., Murakami M., Otsuguro K., Ito S. (2005) P2X(2) receptors are essential for $[Ca^{2+}]_i$ increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol-Gastr L* **289**: G935-G948
- Perozo E., Hubbell W.L. (1993) Voltage activation of reconstituted sodium channels: use of bacteriorhodopsin as a light-driven current source. *Biochemistry* **32**: 10471-10478
- Piccolo A., Liantonio A., Babini E., Camerino D.C., Pusch M. (2007) Mechanism of interaction of niflumic acid with heterologously expressed kidney CLC-K chloride channels. *J Membr Biol* **216**: 73-82
- Piccolo A., Liantonio A., Didonna M.P., Elia L., Camerino D.C., Pusch M. (2004) Molecular determinants of differential pore blocking of kidney CLC-K chloride channels. *EMBO Rep* **5**: 584-589
- Piccolo A., Pusch M. (2005) Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature* **436**: 420-423
- Pintschovius J., Fendler K. (1999) Charge translocation by the Na^+/K^+ -ATPase investigated on solid supported membranes: rapid solution exchange with a new technique. *Biophys J* **76**: 814-826
- Pintschovius J., Fendler K., Bamberg E. (1999) Charge translocation by the Na^+/K^+ -ATPase investigated on solid supported membranes: cytoplasmic cation binding and release. *Biophys J* **76**: 827-836
- Piwon N., Gunther W., Schwake M., Bosl M.R., Jentsch T.J. (2000) CLC-5 Cl^- -channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* **408**: 369-373
- Planells-Cases R., Jentsch T.J. (2009) Chloride channelopathies. *Biochim Biophys Acta* **1792**: 173-189
- Plans V., Rickheit G., Jentsch T.J. (2009) Physiological roles of CLC Cl^-/H^+ exchangers in renal proximal tubules. *Pflugers Arch* **458**: 23-37

- Poet M., Kornak U., Schweizer M., Zdebik A.A., Scheel O., Hoelter S., Wurst W., Schmitt A., Fuhrmann J.C., Planells-Cases R., Mole S.E., Hubner C.A., Jentsch T.J. (2006) Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13854-13859
- Ponting C.P. (1997) CBS domains in CIC chloride channels implicated in myotonia and nephrolithiasis (kidney stones). *J Mol Med* **75**: 160-163
- Pusch M., Accardi A., Liantonio A., Guida P., Traverso S., Camerino D.C., Conti F. (2002) Mechanisms of block of muscle type CLC chloride channels (Review). *Mol Membr Biol* **19**: 285-292
- Pusch M., Ludewig U., Rehfeldt A., Jentsch T.J. (1995) Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**: 527-531
- Pusch M., Zifarelli G., Murgia A.R., Picollo A., Babini E. (2006) Channel or transporter? The CLC saga continues. *Exp Physiol* **91**: 149-152
- Renthal R., Lanyi J.K. (1976) Light-induced membrane potential and pH gradient in Halobacterium halobium envelope vesicles. *Biochemistry* **15**: 2136-2143
- Roberts J.A., Vial C., Digby H.R., Agboh K.C., Wen H., Atterbury-Thomas A., Evans R.J. (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* **452**: 486-500
- Rutledge E., Bianchi L., Christensen M., Boehmer C., Morrison R., Broslat A., Beld A.M., George A.L., Greenstein D., Strange K. (2001) CLH-3, a CIC-2 anion channel ortholog activated during meiotic maturation in *C. elegans* oocytes. *Curr Biol* **11**: 161-170
- Salazar G., Love R., Styers M.L., Werner E., Peden A., Rodriguez S., Gearing M., Wainer B.H., Faundez V. (2004) AP-3-dependent mechanisms control the targeting of a chloride channel (CIC-3) in neuronal and non-neuronal cells. *J Biol Chem* **279**: 25430-25439
- Schaller S., Henriksen K., Sorensen M.G., Karsdal M.A. (2005) The role of chloride channels in osteoclasts: CIC-7 as a target for osteoporosis treatment. *Drug News Perspect* **18**: 489-495
- Schaller S., Henriksen K., Sveigaard C., Heegaard A.M., Helix N., Stahlhut M., Ovejero M.C., Johansen J.V., Solberg H., Andersen T.L., Hougaard D., Berryman M., Shiodt C.B., Sorensen B.H., Lichtenberg J., Christophersen P., Foged N.T., Delaisse J.M., Engsig M.T., Karsdal M.A. (2004) The chloride channel inhibitor NS3736 [corrected] prevents bone resorption in ovariectomized rats without changing bone formation. *J Bone Miner Res* **19**: 1144-1153
- Scheel O., Zdebik A.A., Lourdel S., Jentsch T.J. (2005) Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**: 424-427
- Schenck S., Wojcik S.M., Brose N., Takamori S. (2009) A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat Neurosci* **12**: 156-162

- Schmidt-Rose T., Jentsch T.J. (1997) Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J Biol Chem* **272**: 20515-20521
- Scholl U., Hebeisen S., Janssen A.G., Muller-Newen G., Alekov A., Fahlke C. (2006) Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11411-11416
- Schriever A.M., Friedrich T., Pusch M., Jentsch T.J. (1999) CLC chloride channels in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **274**: 34238-34244
- Schulz P., Dueck B., Mourot A., Hatahet L., Fendler K. (2009) Measuring ion channels on solid supported membranes. *Biophys J* **97**: 388-396
- Schulz P., Garcia-Celma J.J., Fendler K. (2008) SSM-based electrophysiology. *Methods* **46**: 97-103
- Schwake M., Friedrich T., Jentsch T.J. (2001) An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl-channel mutated in dent's disease. *J Biol Chem* **276**: 12049-12054
- Scott J.W., Hawley S.A., Green K.A., Anis M., Stewart G., Scullion G.A., Norman D.G., Hardie D.G. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* **113**: 274-284
- Seeman E. (2003) Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int* **14 Suppl 3**: S2-8
- Seeman E. (2004) Estrogen, androgen, and the pathogenesis of bone fragility in women and men. *Curr Osteoporos Rep* **2**: 90-96
- Seifert K., Fendler K., Bamberg E. (1993) Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophys J* **64**: 384-391
- Setaka M., Satoh N., Kobayashi T., Hongo T., Kwan T., Yamaguchi A., Futai M. (1986) Light-induced potential and current across a large bacteriorhodopsin-asolectin planar membrane stabilized on a polyacrylamide gel surface. *J Biochem* **99**: 777-783
- Silverman S.L. (2009) New therapies for osteoporosis: zoledronic acid, bazedoxifene, and denosumab. *Curr Osteoporos Rep* **7**: 91-95
- Sly W.S., Hewett-Emmett D., Whyte M.P., Yu Y.S., Tashian R.E. (1983) Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 2752-2756
- Sonawane N.D., Thiagarajah J.R., Verkman A.S. (2002) Chloride concentration in endosomes measured using a ratioable fluorescent Cl⁻ indicator: evidence for chloride accumulation during acidification. *J Biol Chem* **277**: 5506-5513
- Sonawane N.D., Verkman A.S. (2003) Determinants of [Cl⁻] in recycling and late endosomes and Golgi complex measured using fluorescent ligands. *J Cell Biol* **160**: 1129-1138

- Southan A., Clark G. (2009) Recent advances in electrophysiology-based screening technology and the impact upon ion channel discovery research. *Methods Mol Biol* **565**: 187-208
- Stark G., Ketterer B., Benz R., Lauger P. (1971) The rate constants of valinomycin-mediated ion transport through thin lipid membranes. *Biophysical Journal* **11**: 981-994
- Stark Z., Savarirayan R. (2009) Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* **4**: 5
- Steinmeyer K., Ortland C., Jentsch T.J. (1991) Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* **354**: 301-304
- Steinmeyer K., Schwappach B., Bens M., Vandewalle A., Jentsch T.J. (1995) Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem* **270**: 31172-31177
- Stobrawa S.M., Breiderhoff T., Takamori S., Engel D., Schweizer M., Zdebik A.A., Bosl M.R., Ruether K., Jahn H., Draguhn A., Jahn R., Jentsch T.J. (2001) Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **29**: 185-196
- Suzuki T., Rai T., Hayama A., Sohara E., Suda S., Itoh T., Sasaki S., Uchida S. (2006) Intracellular localization of CLC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J Cell Physiol* **206**: 792-798
- Tadini Buoninsegni F., Bartolommei G., Moncelli M.R., Inesi G., Guidelli R. (2004) Time-resolved charge translocation by sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase measured on a solid supported membrane. *Biophys J* **86**: 3671-3686
- Tittor J., Oesterhelt D., Bamberg E. (1995) Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85,96N as proton pumps. *Biophys Chem* **56**: 153-157
- Tittor J., Schweiger U., Oesterhelt D., Bamberg E. (1994) Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. *Biophys J* **67**: 1682-1690
- Trujillo C.A., Nery A.A., Martins A.H., Majumder P., Gonzalez F.A., Ulrich H. (2006) Inhibition mechanism of the recombinant rat P2X(2) receptor in glial cells by suramin and TNP-ATP. *Biochemistry* **45**: 224-233
- Tseng P.Y., Bennetts B., Chen T.Y. (2007) Cytoplasmic ATP inhibition of CLC-1 is enhanced by low pH. *J Gen Physiol* **130**: 217-221
- Tsien R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544
- Tsunoda S.P., Ewers D., Gazzarrini S., Moroni A., Gradmann D., Hegemann P. (2006) H⁺ - pumping rhodopsin from the marine alga *Acetabularia*. *Biophys J* **91**: 1471-1479
- Tulk B.M., Schlesinger P.H., Kapadia S.A., Edwards J.C. (2000) CLIC-1 functions as a chloride channel when expressed and purified from bacteria. *J Biol Chem* **275**: 26986-26993

- Uchida S., Sasaki S. (2005) Function of chloride channels in the kidney. *Annu Rev Physiol* **67**: 759-778
- Venturi M., Padan E. (2003) Purification of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of Escherichia coli for 3D or 2D crystallization. In *Membrane Protein Purification and Crystallization*, 179-190. San Diego, CA, U.S.A.: Academic Press/Elsevier Science
- Verkman A.S., Galiotta L.J.V. (2009) Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 153-171
- Waguespack S.G., Hui S.L., Dimeglio L.A., Econs M.J. (2007) Autosomal dominant osteopetrosis: clinical severity and natural history of 94 subjects with a chloride channel 7 gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 771-778
- Waguespack S.G., Koller D.L., White K.E., Fishburn T., Carn G., Buckwalter K.A., Johnson M., Kocisko M., Evans W.E., Foroud T., Econs M.J. (2003) Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations and autosomal dominant osteopetrosis, type II. *J Bone Miner Res* **18**: 1513-1518
- Wartosch L., Fuhrmann J.C., Schweizer M., Stauber T., Jentsch T.J. (2009) Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein ClC-7. *FASEB J* **23**: 4056-4068
- Weinreich F., Jentsch T.J. (2001) Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J Biol Chem* **276**: 2347-2353
- Wellhauser L., Kuo H.H., Stratford F.L., Ramjeesingh M., Huan L.J., Luong W., Li C., Deber C.M., Bear C.E. (2006) Nucleotides bind to the C-terminus of ClC-5. *Biochem J* **398**: 289-294
- Wildman S.S., King B.F., Burnstock G. (1998) Zn²⁺ modulation of ATP-responses at recombinant P2X₂ receptors and its dependence on extracellular pH. *Br J Pharmacol* **123**: 1214-1220
- Wrong O.M., Norden A.G., Feest T.G. (1994) Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *QJM* **87**: 473-493
- Xie X.S., Stone D.K., Racker E. (1983) Determinants of clathrin-coated vesicle acidification. *J Biol Chem* **258**: 14834-14838
- Zdebik A.A., Zifarelli G., Bergsdorf E.Y., Soliani P., Scheel O., Jentsch T.J., Pusch M. (2008) Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J Biol Chem* **283**: 4219-4227
- Zen K., Biwersi J., Periasamy N., Verkman A.S. (1992) Second messengers regulate endosomal acidification in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **119**: 99-110

- Zhang F., Wang L.P., Brauner M., Liewald J.F., Kay K., Watzke N., Wood P.G., Bamberg E., Nagel G., Gottschalk A., Deisseroth K. (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**: 633-639
- Zhang J.H., Chung T.D., Oldenburg K.R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**: 67-73
- Zhao Q., Wei Q., He A., Jia R., Xiao Y. (2009) CLC-7: a potential therapeutic target for the treatment of osteoporosis and neurodegeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **384**: 277-279
- Zhao S., Cunha C., Zhang F., Liu Q., Gloss B., Deisseroth K., Augustine G.J., Feng G. (2008) Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. *Brain Cell Biol* **36**: 141-154
- Zhao Z., Li X., Hao J., Winston J.H., Weinman S.A. (2007) The CLC-3 chloride transport protein traffics through the plasma membrane via interaction of an N-terminal dileucine cluster with clathrin. *J Biol Chem* **282**: 29022-29031
- Zheng W., Spencer R.H., Kiss L. (2004) High throughput assay technologies for ion channel drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* **2**: 543-552
- Zhou A., Wozniak A., Meyer-Lipp K., Nietschke M., Jung H., Fendler K. (2004) Charge translocation during cosubstrate binding in the Na⁺/proline transporter of E.coli. *J Mol Biol* **343**: 931-942
- Zhou Z., Hume R.I. (1998) Two mechanisms for inward rectification of current flow through the purinoceptor P2X2 class of ATP-gated channels. *J Physiol* **507 (Pt 2)**: 353-364
- Zifarelli G., Pusch M. (2007) CLC chloride channels and transporters: a biophysical and physiological perspective. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **158**: 23-76
- Zifarelli G., Pusch M. (2009) Intracellular regulation of human CLC-5 by adenine nucleotides. *EMBO Rep* **10**: 1111-1116
- Zuber D., Krause R., Venturi M., Padan E., Bamberg E., Fendler K. (2005) Kinetics of charge translocation in the passive downhill uptake mode of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaA of Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* **1709**: 240-250

6 Zusammenfassung

Chloridkanäle und -transporter sind an wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt [Jentsch *et al.*, 2002; Zifarelli & Pusch, 2007; Jentsch, 2008] und mutationsbedingte Funktionsdefekte können mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht werden [Planells-Cases & Jentsch, 2009]. Trotz der großen physiologischen Relevanz bilden diese Proteine eine unterrepräsentierte Klasse in der pharmakologischen Wirkstoffsuche [Verkman & Galletta, 2009], auch aufgrund fehlender adäquat robuster und Durchsatz-starker Testsysteme. Vor allem die Vertreter der intrazellulären CLC-Proteine, von denen bereits zwei eindeutig relevanten Krankheiten zugeordnet werden konnten (CLC-5 – Dent'sche Krankheit; CLC-7 – Osteopetrose), entziehen sich aufgrund ihrer vesikulären Lokalisation den klassischen elektrophysiologischen Methoden.

Aus diesem Grund kam in dieser Arbeit die SSM-Technik [Schulz *et al.*, 2008] zur Charakterisierung des lysosomalen Cl^-/H^+ -Antiporters CLC-7 zum Einsatz. Bei geeigneter Membranpräparation können mit dieser Methode auch vesikuläre Transportprozesse elektrophysiologisch untersucht werden.

Neben der grundlegenden biophysikalischen Untersuchung von CLC-7 war es mit Hilfe der SSM-Technik möglich, die Protonen-gekoppelte Antiportaktivität dieses vesikulären CLC-Vertreters nachzuweisen. Außerdem wurde ein robuster *Assay* etabliert, der auch die pharmakologische Untersuchung von CLC-7 erlaubt. Mit diesem konnte gezeigt werden, dass CLC-7 spezifisch durch die Chloridkanalblocker DIDS und NPPB mit relativ hoher Affinität (DIDS: $\text{IC}_{50} = 39 \mu\text{M}$, NPPB: $\text{IC}_{50} = 156 \mu\text{M}$) zu inhibieren ist. Da CLC-7 auch als potentiell Target in der Osteoporose-Therapie diskutiert wird [Schaller *et al.*, 2005], bietet die SSM-Technik somit eine Plattform für pharmakologische Untersuchungen an diesem Transporter.

Neben dem Wildtyp Protein wurde weiterhin die Funktionalität einer physiologisch wichtigen, der Osteopetrose zuzuordnenden Mutante (G215R), untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutante noch immer eine signifikante Transportaktivität besitzt, jedoch einen schweren Lokalisationsdefekt aufweist und nicht mehr korrekt in die Lysosomen transportiert wird. Durch Koexpression der funktionalen β -Untereinheit Ostm1 [Lange *et al.*, 2006] war es möglich, die lysosomale Lokalisation teilweise, jedoch nicht vollständig wiederherzustellen. Dieser Effekt könnte somit ein Grund für den relativ milden Krankheitsverlauf der mit dieser Mutation verbundenen autosomal dominanten Osteopetrose (ADOII, Albers-Schönberg Krankheit) sein.

Da die SSM-Technik bisher ausschließlich zur Untersuchung primär und sekundär aktiver Transporter zum Einsatz kam [Schulz *et al.*, 2008; Ganea & Fendler, 2009], wurde weiterhin die Eignung der Methode zur Charakterisierung passiver Ionenkanäle anhand des ligandengesteuerten P2X₂ Rezeptors überprüft. Ein Vergleich der gewonnenen elektrophysiologischen und pharmakologischen Daten lieferte gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen konventioneller elektrophysiologischer Untersuchungen. So konnte gezeigt werden, dass sich die SSM-Technik auch zur Charakterisierung von Ionenkanälen eignet.

Da Ströme über Ionenkanäle bei den klassischen Methoden über eine extern angelegte Spannung gesteuert werden, solch eine Kontrolle bei der SSM-Technik jedoch nicht möglich ist, wurde schließlich in dieser Arbeit versucht, mit Hilfe der lichtgesteuerten Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (bR) eine Spannungskontrolle zu etablieren.

Anhand eines Fusions-basierten Modellsystems [Perozo & Hubbell, 1993] konnte gezeigt werden, dass lichtgesteuerte Ionenpumpen prinzipiell zur Kontrolle von Ionenkanälen an der SSM genutzt werden können. Allerdings eignet sich bR aufgrund seiner geringen Plasmamembranexpression in CHO Zellen nicht zur direkten Koexpression und Steuerung von Vertebraten-Proteinen. Der Einsatz eukaryotischer Ionenpumpen, kombiniert mit Anionendiffusionspotentialen [Perozo & Hubbell, 1993], könnte sich allerdings als erfolgsversprechend erweisen und die SSM-Technik auch für die Charakterisierung von stark spannungsabhängigen Ionenkanälen öffnen.

7 Summary

Chloride channels and transporters are involved in important biological processes [Jentsch *et al.*, 2002; Zifarelli & Pusch, 2007; Jentsch, 2008]. Loss of function mutations can be related to several human diseases [Planells-Cases & Jentsch, 2009].

Despite this significant physiological relevance, these proteins represent an under-explored target class in pharmacological drug screening [Verkman & Galiotta, 2009]. Robust high throughput methods are still missing. Especially members of the intracellular CLC-family, of which two already could be related to human diseases (CLC-5 – Dent's disease; CLC-7 – osteopetrosis), are inaccessible to conventional electrophysiological methods (patch-clamp, TEVC) due to their vesicular localization.

For that reason we introduced the SSM-technique [Schulz *et al.*, 2008] to characterize the lysosomal Cl^-/H^+ -antiporter CLC-7. Assuming a proper membrane preparation this method is capable to investigate also vesicular transport processes electrophysiologically. Beside the basic biophysical characterization of CLC-7, it was possible to demonstrate the proton coupled transport activity of that protein directly.

Furthermore, a robust assay could be established, which allows the pharmacological investigation of CLC-7. It could be shown that CLC-7 is inhibited specifically by the chloride channel-blockers DIDS and NPPB with relatively high affinities (DIDS: $\text{IC}_{50}= 39 \mu\text{M}$, NPPB: $\text{IC}_{50}= 156 \mu\text{M}$). Because CLC-7 is also discussed as target for osteoporose therapy [Schaller *et al.*, 2005], the SSM-technique opens the possibility for pharmacological drug screening of that transporter.

Apart from the wildtype, an osteopetrosis related mutant (G215R) was additionally investigated for transport function. A significant transport activity could be demonstrated, but a severe localization defect, which prevents the protein to reach the lysosomes, was found. Co-expression of its functional β -subunit Ostml [Lange *et al.*, 2006] could restore the lysosomal localization to some extent but not completely. Therefore, this effect could be an additional reason for the relatively mild course of disease of this autosomal dominant osteopetrosis (ADOII, Albers-Schönberg disease) related to this mutation.

Because the SSM-technique was only used for characterization of primary and secondary active transporters in the past [Schulz *et al.*, 2008; Ganea & Fendler, 2009], we furthermore investigated the applicability for the characterization of passive ion channels. Therefore, we used the well characterized ligand-gated P2X_2 receptor. Comparison of the obtained electrophysiological and pharmacological results with data of conventional

electrophysiological investigations confirmed the applicability of the SSM-technique for the characterization of ion channels.

Currents across ion channels are controlled by the application of an external voltage in conventional methods. Because the external voltage control cannot be used with the SSM-technique, we finally tried to establish a voltage control by means of the light driven proton-pump bacteriorhodopsin (bR). Using a fusion-based model system [Perozo & Hubbell, 1993] it could be shown, that light driven ion pumps are useful to obtain voltage control at the SSM in principle. However, direct co-expression of bR in CHO cells is not suitable, due to its low plasmamembrane localization.

The use of eucaryotic ion pumps combined with anion diffusion potentials [Perozo & Hubbell, 1993] might be a promising strategy to open the SSM-technique for the characterization of strongly voltage dependent ion channels.

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt...

...Prof. Dr. Klaus Fendler für die vollumfängliche Betreuung meiner Arbeit, die vielen hilfreichen Diskussionen, Tipps, Anregungen und die stets offene Tür.

...Prof. Dr. Ernst Bamberg für die Möglichkeit, in einer perfekt ausgestatteten und kreativen Umgebung meine Promotion durchzuführen.

...Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Bereitschaft der Zweitbegutachtung.

...Dr. Juan-Jose Garcia-Celma und Thomas Mager für die vielen Labor- und Freitagsdiskussionen.

...Johannes Werner für die Unterstützung beim CIC-7 Projekt, die mir einige Stunden in der Zellkultur und Molekularbiologie erspart hat.

...Lina Hatahet für die Domptur diverser Praktikanten, das Labormanagement, die CIC-ec1 Aufreinigung und die Unterstützung auf der ständigen Suche irgendwelcher Kleinigkeiten.

...Dr. Ulrich Terpitz und Dr. Katrin Feldbauer für die Patch-Clamp Messungen am P2X₂ und natürlich die diversen Cocktailabende, die das Doktoranden-Leid erträglicher gemacht haben. Ein besonderer Dank geht außerdem an die „Promotionsberatung Uli“!

...Dr. Christine Keipert für die Adoption meiner Zellkultur zu Urlaubszeiten.

...Dr. Christian Bamann für das ultimative Know How, gleich zu welchem Thema und besonders für die nette Betreuung meines „Schnupperpraktikums“, das mich überhaupt erst für die Arbeit am MPI begeistert hat.

...allen anderen fleißigen TAs, die den Laden am Laufen halten.

...Dr. Klaus Hartung für die ganze organisatorische Unterstützung z.B. des Studentenpraktikums und die stets offene Tür.

...der gesamten Arbeitsgruppe für die spannende Arbeitsatmosphäre.

...Helga Husmann für die kreative Unterstützung bei der Erstellung diverser Poster, Präsentationen und Doktor-Hüte.

...allen unsichtbaren Heinzelmännchen im Hintergrund aus Werkstatt, Verwaltung und Haustechnik, die dafür sorgen, dass das Licht nicht ausgeht.

...dem gesamten Team von Iongate, besonders Anja Knecht, Dr. Wolfgang Dörner und Dr. Béla Kelety für den prompten technischen und wissenschaftlichen Support rund um den SURFE²R.

... Prof. Dr. Dr. Peter Mombaerts und Dr. Masayo Omura für die Möglichkeit der Nutzung und die Einweisung in das konfokale Mikroskop.

- ...Dr. Kim Henriksen für die Bereitstellung der CIC-7 Inhibitoren, die Anregungen für das Projekt und die Begutachtung des Manuskripts.
- ...Dr. Henning Vollert für die Unterstützung bei der Auswahl der CIC-7 Inhibitoren und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.
- ...Prof. Dr. Raimund Dutzler für die Bereitstellung des CIC-ec1 Expressionsvektors.
- ...Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch und Prof. Dr. Martin Pusch für die Bereitstellung der CIC-7 und Ostm1-Konstrukte und des Ostm1-Antikörpers. Außerdem ein besonderer Dank an Prof. Jentsch und Dr. Tobias Stauber für die sorgfältige Begutachtung des CIC-7 Manuskripts.
- ...dem Büro B 1.155 für die ruhige und entspannte Arbeitsatmosphäre.
- ...insbesondere meinen Eltern, die mich die ganze Zeit gefördert und unterstützt haben und stets an meiner Arbeit interessiert waren.
- ...Julia für die Unterstützung, die Geduld, das offene Ohr, die Sterne-Küche und überhaupt...

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Abb.	Abbildung	IC ₅₀	Halbmaximale
ADO	Autosomal dominante Osteopetrose	ITO	Inhibitorkonzentration
AP	Alkalische Phosphatase	Konz.	Konzentration
ARO	Autosomal rezessive Osteopetrose	Lamp-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
Asp	Aspartat	LB	<i>Lysogeny Broth</i>
ATP	Adenosintriphosphat	LDL	Lipoprotein niederer Dichte (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
BLM	<i>Black Lipid Membrane</i>	LDS	Lithiumdodecylsulfat
BP	Bandpass	LP	Longpass
BR	Bakteriorhodopsin	LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
BSA	Rinderserumalbumin	min.	mindestens
CBS	Cystathion- β -Synthase	MES	Morpholinoethansulfonsäure
CHO	<i>Chinese Hamster Ovarian Zellen</i>	MOPS	Morpholino-Propansulfonsäure
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>	MPI	Max-Planck-Institut
CLN	Ceroid-Lipofuszinose	MW	Mittelwert
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	NMG	N-Methylglucamin
CMV	Zytomegalie-Virus	OD	Optische Dichte
DC	Gleichstrom (<i>Directed Current</i>)	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
d.h.	das heißt	PC	Personal Computer / Diphytanoyl-Phosphatidylcholin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PMSF	Phenylmethyl-sulfonylfluorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RIPA	<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>
DPSS	<i>Diode Pumped Solid State (Laser)</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotation per minute</i>)
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
EC ₅₀	Halbmaximale Effektorkonzentration	SOC	<i>Super Optimal Broth</i> + Glukose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SSM	<i>Solid Supported Membrane</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	STABW	Standardabweichung
Em	Emission	SURFE ² R	<i>Surface Electrogenic Event Reader</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum	Tab.	Tabelle
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Ex	Excitation	TB	<i>Terrific Broth</i>
FCS	Fötale Kälber Serum (<i>Fetal Calf Serum</i>)	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
FLIPR	<i>Fluorometric Imaging Plate Reader</i>	TetR	Tetracyclin Repressor
G-418	Genitacin	TEVC	<i>Two-Elektrode-Voltage-Clamp</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	TMA	Tetramethylammonium
HA	Hämagglutinin	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HBO	Quecksilber-Kurzbogenlampe	TTL	Transistor-Transistor-Logik
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	USA	<i>United States of America</i>
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen 293	vgl.	vergleiche
HeNe	Helium/Neon (Laser)	WHO	Weltgesundheitsorganisation
HEPES	Hydroxyethylpiperazin- ethansulfonsäure	WT	Wildtyp
		WW	Wechselwirkung

9.2 Einheiten

p	piko	= 10 ⁻¹²
n	nano	= 10 ⁻⁹
μ	mikro	= 10 ⁻⁶
m	milli	= 10 ⁻³
c	centi	= 10 ⁻²
k	kilo	= 10 ³
M	Mega	= 10 ⁶
G	Giga	= 10 ⁹
[A]	Ampere	
[bar]	10 ⁵ N/m ²	
[C]	Coulomb	
[Da]	Dalton	
[F]	Farad	
[g]	Gramm	
[h]	Stunde	
[Hz]	Hertz	
[J]	Joule	
[K]	Kelvin	
[L]	Liter	
[m]	Meter	
[M]	mol/l	
[min]	Minute	
[Osm]	osmol/l	
[Pa]	Pascal	
[s]	Sekunde	
[S]	Siemens	
[V]	Volt	
[W]	Watt	
[Ω]	Ohm	

9.3 Physikalische Größen

°C	Grad Celsius
A	Fläche
C	Kapazität [F]
ε	Permittivität (Dielektrizitätskonstante)
F	Faraday-Konstante (96485,339 C mol ⁻¹)
g	Gravitationsbeschleunigung [m s ⁻²]
G	Leitfähigkeit
I	Stromstärke [A]
λ	Wellenlänge
n	Anzahl
Q	Ladung
R	Gaskonstante (8,314 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
r	Radius
R	Widerstand
t	Zeit
T	Temperatur
U / V	Spannung [V] / enzymatische Einheit

9.4 *Abbildungsverzeichnis*

Abb. 1-1: Schematischer Aufbau von Membranen.	2
Abb. 1-2: Die Vertreter der CLC-Proteine in Säugetieren.	5
Abb. 1-3: Topologie-Modell und Struktur der CLC-Proteine.	7
Abb. 1-4: Vesikuläre Transporter und Kanäle mit Einfluss auf das Membranpotential.	8
Abb. 1-5: Subzelluläre Lokalisation vesikulärer CLC-Proteine.	10
Abb. 1-6: Die osteopetrotische $ClCn7^{-/-}$ Knockoutmaus.	13
Abb. 1-7: Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels.	15
Abb. 2-1: Neubauer Zählkammer.	28
Abb. 2-2: Anregungs- und Emissionsspektrum von EGFP (grün) und LysoTracker [®] Red (rot).	36
Abb. 2-3: Schematische Adsorptionsgeometrie.	37
Abb. 2-4: SURFE ² R One Messeinrichtung.	38
Abb. 2-5: Vereinfachtes Fluidiksystem.	39
Abb. 3-1: Lokalisation von ClC-7 in CHO Zellen.	45
Abb. 3-2: Ganz-Zell Patch-Clamp Untersuchungen der WT-ClC-7/Ostm1 CHO Zelllinie.	47
Abb. 3-3: (A) Fluoreszenzspektrum der WT-ClC-7 Sucrose-Membran-Präparation.	48
Abb. 3-4: Charakterisierung der Sucrose-Membran-Präparation.	49
Abb. 3-5: ClC-7 Ströme an der SSM.	51
Abb. 3-6: Aktivität von WT und G213R ClC-7.	52
Abb. 3-7: pH Abhängigkeit der ClC-7 Ströme.	53
Abb. 3-8: Anionen-Selektivität von ClC-7.	54
Abb. 3-9: Kanal oder Transporter?	55
Abb. 3-10: Subtraktion des pH Artefakts (—) vom Cl ⁻ -Signal (—).	56
Abb. 3-11: Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener ClC-7 Inhibitoren.	57
Abb. 3-12: ATP induzierter P2X ₂ Rezeptorstrom.	60
Abb. 3-13: Spezifitätskontrolle der P2X ₂ vermittelten Ströme.	61
Abb. 3-14: Zeitabhängige Stabilitätsbestimmung der P2X ₂ Ströme.	62
Abb. 3-15: Na ⁺ -Konzentrationsabhängige Sättigung des Rezeptorstroms.	63
Abb. 3-16: Bestimmung des Z'-Faktors für P2X ₂	64
Abb. 3-17: ATP-Abhängigkeit der Rezeptorströme.	65
Abb. 3-18: Inhibition von P2X ₂ durch Suramin.	66
Abb. 3-19: Zeitlicher Abfall des Kationengradienten.	67
Abb. 3-20: Aktivierungsabhängiger Abfall des Kationengradienten.	67
Abb. 3-21: Generierung der ClC-Ka/bR Zelllinie.	69
Abb. 3-22: Eingesetzte Küvetten zur kombinierten Licht-/Lösungswechselaktivierung.	70
Abb. 3-23: Licht- & Lösungswechsel-aktivierte Ströme mit SSM-Messeinsatz.	71
Abb. 3-24: Modulation von ClC-Ka durch bR-induziertes Potential.	73

Abb. 3-25: Vergleich ClC-Ka/bR & Purpurmembran.....	74
Abb. 3-26: Modulation von ClC-ec1 durch bR in fusionierten Purpurmembran-Proteoliposomen.....	74
Abb. 3-27: Lichtabhängigkeit der ClC-ec1 Modulation.....	75
Abb. 3-28: Charakterisierung des bR-induzierten Membranpotentials.....	77
Abb. 4-1: Sequenzhomologie humaner CLC Proteine.....	81
Abb. 4-2: Ionophorische Wirkung von NS3736.....	89
Abb. 4-3: Orientierung der adsorbierten Membranvesikel.....	94
Abb. 4-4: Inside-out Orientierung von bR angelagerten Membranfragmenten.....	102

9.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Vergleich von Membrantransport-Assay-Methoden.....	17
Tab. 2-1: Verwendete Primer zum Einfügen von Punktmutationen in rClC-7 und (S65T)-GFP.....	24
Tab. 2-2: Optimale Kultivierungsbedingungen für eukaryotische Zelllinien.....	26
Tab. 2-3: Optimale Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion von stabilen Zelllinien.....	30
Tab. 2-4: Übersicht der untersuchten Fluorophore.....	35
Tab. 2-5: Fluidikprotokoll für einfachen Lösungswechsel.....	41
Tab. 2-6: Fluidikprotokoll für doppelten Lösungswechsel.....	42
Tab. 3-1: Untersuchte potentielle ClC-7 Inhibitoren.....	58

9.6 Lebenslauf

Patrick Schulz

*30. Sept. 1982 in Offenbach

Zum Königssee 8
63512 Hainburg

Schule

08/1989 - 07/1993

Johannes-Kepler Grundschule, Hainburg

08/1993 - 06/1999

Einhardschule Seligenstadt, Gymnasium

08/1999 - 06/2002

Claus-von-Stauffenberg-Schule, Rodgau-Dudenhofen,
gymnasiale Oberstufe

Studium

09/2002 - 08/2006

Biotechnologie, Hochschule Darmstadt
Abschluss: Dipl. Ing. (FH) Biotechnologie

Diplomarbeit

03/2006 - 08/2006

„Entwicklung eines Assaysystems zur Charakterisierung von Ionenkanälen auf Basis von zellfreier Elektrophysiologie“

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main

NAT – New Assay Technologies

(intern: Prof. Dr. F. J. Meyer-Almes, extern: Dr. H. Vollert)

Promotion

10/2006 – heute

„Elektrophysiologische Charakterisierung des lysosomalen Cl⁻/H⁺-Antiporters CIC-7 mit Hilfe der SSM-Technik“

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main

Abteilung Biophysikalische Chemie

(Prof. Dr. K. Fendler)

9.7 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in Fachzeitschriften veröffentlicht und mit freundlicher Genehmigung der Verlage verwendet.

Publikationen in Fachzeitschriften

Schulz P., Garcia-Celma J.J., Fendler K. (2008) SSM-based electrophysiology. *Methods* **46**: 97-103

Schulz P., Dueck B., Mourot A., Hatahet L. and Fendler K. (2009). Measuring ion channels on solid supported membranes. *Biophys J* **97**(1): 388-396

Konferenzen

Schulz P., Hatahet L. and Fendler K. (2008) Measuring ClC-Transporters on Solid Supported Membranes. *Transporters 2008*, Murten, Schweiz

Schulz P., Dück B., Mourot A., Hatahet L. and Fendler K. (2008) Measuring Ion Channels on Solid Supported Membranes. *Membrane Transport and Communication*, Frankfurt

Schulz P., Hatahet L., Vollert H. and Fendler K. (2009) Biophysical Characterization of ClC-7 on Solid Supported Membranes. *GRC-Mechanisms of Membrane Transport*, Waterville, ME, USA