

Ca²⁺-AKTIVIERTE Cl⁻-KANÄLE UND
Cl⁻-AKKUMULATION IN SINNESZELLEN DER
RATTE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Ilva Putzier
aus Leverkusen

2003

Berichtersteller:

Prof. Dr. U.B. Kaupp

Prof. Dr. S. Frings

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 2003

Zusammenfassung

In den meisten Wirbeltier-Neuronen leiten Cl^- -selektive Ionenkanäle einen inhibitorischen Cl^- -Auswärtsstrom. Einen gegenteiligen Effekt haben Cl^- -Kanäle in somatosensorischen Neuronen und Riechzellen, wo sie eine Depolarisation bewirken. Bei beiden Zelltypen ist die Aktivierung des Cl^- -Stroms an zytoplasmatische Ca^{2+} -Signale gekoppelt. So wird z.B. der Rezeptorstrom der Riechzellen zum größten Teil von einem Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal getragen. Obwohl Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle von mehreren Arbeitsgruppen elektrophysiologisch in vielen Zellen nachgewiesen wurden, konnte bisher kein verantwortliches Gen identifiziert werden. Den Produkten der *clca*-Genfamilie werden allerdings die Eigenschaften Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle zugeschrieben: Die bislang klonierten *clca*-Gene stammen allesamt aus nicht-neuronalen Geweben. In unserer Arbeitsgruppe wurde das erste neuronale Homolog, *relca1*, aus dem Riechepithel der Ratte kloniert.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *relca1* für den Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal der Riechsignalkaskade kodiert. Dazu wurde das rCLCA1-Protein zunächst mittels spezifischer Antikörper biochemisch charakterisiert und mit anderen CLCA-Proteinen verglichen: rCLCA1 ist ein glykosyliertes, 125 kDa großes Membranprotein mit vier Transmembrandomänen. Es wird - wie einige andere CLCA-Proteine - proteolytisch in ein 35 kDa und ein 97 kDa-Fragment gespalten. Es wird gezeigt, dass beide Fragmente in Zilienproteinen gegenüber dem gesamten olfaktorischen Epithel schwach angereichert sind, so wie es für alle Proteine der Riechsignalkaskade beschrieben wurde. In der Immunhistochemie konnte das rCLCA1-Protein jedoch nicht in olfaktorischen Zilien, sondern in Tight-Junction-Strukturen lokalisiert werden. Die funktionelle Untersuchung ergab, dass *relca1*-transfizierte Zellen zwar eine zusätzliche Cl^- -Leitfähigkeit erhielten, die sich jedoch grundlegend vom nativen Strom der Riechzellen unterschied. Die Untersuchung der Riechzelllinie Odora ergab schließlich, dass rCLCA1 nicht der Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal der Riechsignalkaskade sein kann, da diese Zellen zwar den bekannten Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strom zeigten, jedoch weder das *relca1*-Gen noch das entsprechende Protein exprimierten.

Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme depolarisieren somatosensorische Neurone und Riechzellen, da diese Zellen, im Gegensatz zu den meisten Neuronen des ZNS, eine besonders hohe $[\text{Cl}^-]_i$ besitzen. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse verwendet,

um die $[Cl^-]_i$ frisch dissoziierter, somatosensorischer Neurone zu bestimmen. Mit ca. 30 mM ist sie tatsächlich so hoch, dass ein Cl^- -Strom die Aktivierung dieser Neurone bewirken kann. Die $[Cl^-]_i$ der Neurone wird durch die Expression verschiedener Cl^- -Transportmoleküle bestimmt. In dieser Arbeit wurde mittels RT-PCR-Experimenten und Immunhistochemie gezeigt, dass weder Riechzellen noch somatosensorische Neurone die bekannten Kationen/ Cl^- -Kotransporter zur Cl^- -Akkumulation nutzen. Die Cl^- -Akkumulation kann in diesen Zellen somit nur durch einen aktiven Cl^- -Transport funktionieren.

Abstract

While inhibiting most neurons of the central vertebrate nervous system (CNS), Cl^- -currents activate somatosensory neurons and olfactory sensory neurons (OSN). Both cell types show Cl^- -currents coupled to intracellular Ca^{2+} -signalling. The receptor current of OSN is mostly carried by a Ca^{2+} -activated Cl^- -current. While Ca^{2+} -activated Cl^- -currents have already been detected by electrophysiological means in a variety of cells, no coding gene has been identified yet. The products of the *clca* gene family seem to have properties of Ca^{2+} -activated Cl^- -channels. Until now, *clca* genes have been cloned from non-neuronal epithelia only. We have now cloned the first neuronal *clca*-gene from olfactory epithelium.

This thesis deals with the hypothesis that *rclca1* codes for the Ca^{2+} -activated Cl^- -channel of the olfactory signal transduction cascade. rCLCA1-specific antibodies have been generated to characterize and compare the rCLCA1-protein with other CLCA-proteins. rCLCA1 is a glycosylated 125 kDa membrane protein with four transmembrane domains. It is proteolytically cleaved into two 35 kDa and 97 kDa proteins. Both rCLCA1-fragments are slightly enriched in olfactory cilia in comparison with whole olfactory epithelium. This has been shown for all olfactory signalling cascade-proteins. However, on slices of olfactory epithelium rCLCA1-antibodies do not localize the protein in cilia but detect tight-junction structures. Functional expression of rCLCA1 shows, that it generates an enhanced Cl^- -conductance in *rclca1*-transfected cells which has completely different properties than the native Cl^- -current of OSN. By examining rCLCA1 in Odora cells, an OSN-cell lineage, it could be proved that *rclca1* can not code for the Ca^{2+} -activated Cl^- -channel in OSN: Although Odora cells showed large Ca^{2+} -activated Cl^- -currents with properties of the native current, the *rclca1*-gene and its protein could not be detected in these cells.

Ca^{2+} -activated Cl^- -currents do depolarize somatosensory neurons and OSN, because these neurons have an outstandingly high $[\text{Cl}^-]_i$ compared with most CNS-neurons. In this thesis the $[\text{Cl}^-]_i$ of freshly dissociated somatosensory neurons has been measured by fluorescence-lifetime imaging (FLIM) for the first time. The $[\text{Cl}^-]_i$ was 30 mM, thus Cl^- -currents can indeed activate somatosensory neurons. The $[\text{Cl}^-]_i$ is determined by the expression of different chloride-transport molecules, like the cation/ Cl^- -cotransporter (CCC) proteins. This thesis shows that both OSN and somatosensory neurons do not express KCC2, the CCC-

molecule that leads Cl^- out of most neurons. In addition to this both types of neurons do not express NKCC1. The Cl^- -accumulation process could not be elucidated by this thesis but an active Cl^- -accumulation process will be discussed.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Somatosensorische Neurone werden durch einen Cl ⁻ -Strom aktiviert	2
1.2	Ein zweites Beispiel für die Aktivierung durch Cl ⁻ - Der Riechsinn der Wirbeltiere	4
1.3	Der Aufbau des Riechepithels	5
1.4	Signaltransduktion in Riechsinneszellen	7
1.5	Die Familie der Ca ²⁺ -aktivierten Cl ⁻ -Kanäle	9
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien und Enzyme	13
2.2	Vermehrung von <i>E. coli</i>	14
2.2.1	Verwendeter Bakterienstamm	14
2.2.2	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E. coli</i> . . .	14
2.2.3	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA	14
2.3	Molekularbiologische Methoden	15
2.3.1	Verwendete Plasmide	15
2.3.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	15
2.3.3	Reinigung von Nukleinsäuren	17
2.3.4	Quantifizierung und Analyse von Nukleinsäuren	17
2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.3.6	Subklonieren von PCR-Produkten in Plasmidvektoren	21
2.3.7	Nichtradioaktive Sequenzierung	22
2.3.8	Synthese gewebespezifischer cDNA aus Rattengewebe und Odora-Zellen	24
2.4	Zellkultur eukaryotischer Zellen	25

2.4.1	Verwendete Zelllinien	25
2.4.2	Kulturbedingungen der Zelllinien	26
2.4.3	Transiente Transfektion	27
2.5	Antikörper und Nachweis der Antikörperfärbungen	28
2.5.1	Erstantikörper	28
2.5.2	Zweitantikörper	29
2.5.3	Nachweis der Proteinexpression transient transfizierter Zellen durch Immunzytochemie	30
2.6	Präparation, Auftrennung und spezifischer Nachweis von Membranproteinen	32
2.6.1	Präparation von Membranproteinen aus transfizierten Zellen	32
2.6.2	Präparation von Membranproteinen aus nativem Gewebe	33
2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz	33
2.6.4	Deglykosylierung von Proteinen	34
2.6.5	Auftrennung von Proteinen durch denaturierende Gel-Elektrophorese	34
2.6.6	Transfer und Immobilisierung von Proteinen (“Westernblot“)	35
2.6.7	Immunologischer Protein-Nachweis auf Westernblot-Membranen	35
2.7	Immunhistochemie an Ratten-Gewebeschnitten	37
2.7.1	Herstellung und Vorbereitung von Rattengewebe für Kryoschnitte	37
2.7.2	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten	38
2.7.3	Konfokale Mikroskopie	38
2.8	Zwei-Photonen Fluoreszenz Lifetime Imaging (TP-FLIM)	39
2.8.1	Das Prinzip des Zwei-Photonen Fluoreszenz Lifetime Imaging	39
2.8.2	Cl ⁻ -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe	44
2.8.3	Vorbereitung der Spinalganglienzellen für FLIM-Versuche	46
2.8.4	TP-FLIM-Messung an DRG-Neuronen	47
3	Ergebnisse	49
3.1	rCLCA1-Expression in tsA-Zellen	50
3.1.1	Herstellung rCLCA1-spezifischer Antikörper	50
3.1.2	Heterologe rCLCA1-Expression und Charakterisierung der Antikörper	52

3.1.3	Westernblot-Analysen <i>rclca1</i> -transfizierter Zellen	53
3.1.4	Deglykosylierung der rCLCA1-Proteine	56
3.1.5	Untersuchungen zur rCLCA1-Membrantopologie in tsA-Zellen	58
3.2	rCLCA1-Expression in olfaktorischem Gewebe	61
3.2.1	rCLCA1-Nachweis in den Membranproteinen von Riechzilien	61
3.2.2	Anreicherung des rCLCA1-Proteins in den Zilien	63
3.2.3	Immunhistochemische Analyse der rCLCA1-Expression im olfaktorischen Epithel der Ratte	65
3.3	Funktioneller rCLCA1-Nachweis in transfizierten Zellen	69
3.4	Proteolytische Prozessierung	74
3.4.1	Wird rCLCA1 proteolytisch prozessiert?	74
3.4.2	Wird die unter CLCA-Proteinen konservierte Protease-Erkennungsstelle verwendet?	76
3.4.3	Funktionelle Untersuchung des trunkierten rCLCA1-Klons	77
3.5	Untersuchung eines einfachen Riechzellsystems: die Odora-Zell-linie	80
3.5.1	Funktioneller Nachweis des Ca ²⁺ -aktivierten Cl ⁻ -Stroms in Odora-Zellen	81
3.5.2	rCLCA1-Expression in Odora-Zellen	81
3.6	Untersuchung des Chlorid-Haushalts in Riechzellen und in somatosensorischen Neuronen	85
3.6.1	Komponenten der Cl ⁻ -Homöostase in Riechzellen	86
3.6.2	Immunhistochemische Lokalisation der Kationen/Cl ⁻ -Kotransporter im olfaktorischen Epithel	89
3.6.3	Messung der [Cl ⁻] _i in somatosensorischen Neuronen der Ratte	93
3.6.4	RT-PCR-Nachweis von Kationen/Cl ⁻ -Kotransportern in DRG-cDNA	96
3.6.5	Immunhistochemische Lokalisierung von Kationen/Cl ⁻ -Transportern in DRGs	98

4.1	Ist rCLCA1 der Ca ²⁺ -aktivierte Cl ⁻ -Kanal der Riechsignalkaskade?	101
4.1.1	Elektrophysiologische Charakterisierung	102
4.1.2	rCLCA1-Lokalisierung in Riechzilien	103
4.1.3	rCLCA1 im Vergleich mit anderen CLCA-Proteinen	105
4.2	Chloridhomöostase in Riechzellen und somatosensorischen Neuronen	108
4.2.1	Komponenten der Chloridhomöostase in Riechzellen	108
4.2.2	Chloridhomöostase in somatosensorischen Neuronen	110
4.2.3	Expression der Kationen/Cl ⁻ -Kotransporter in DRGs	111
A	rCLCA1 - Aminosäuresequenz	127
B	Vergleich der CLCA-Proteinsequenzen	128
C	Die Familie der CLCA-Proteine	134
D	Verwendete Primer	135

Abkürzungsverzeichnis

Es wurden die üblichen Abkürzungen des “Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen und Teilen verwendet.

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ACIII	Adenylylzyklase vom Typ III
APS	Ammoniumperoxdisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
BO	<i>Bulbus olfactorius</i>
BSA	Rinderserum-Albumin
°C	Temperatur in Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaM	Calmodulin
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	revers-transkribierte DNA
CHAPS	3-[(N-Cholanamidopropyl)Dimethylammono]-1-Propansulfonat
cGK II	zyklische Guanylylkinase II
Cl ⁻	Chlorid-Ion
[Cl ⁻]	Chlorid-Ionen-Konzentration
[Cl ⁻] _a	extrazelluläre Chlorid-Ionen-Konzentration
[Cl ⁻] _i	intrazelluläre Chlorid-Ionen-Konzentration
CLCA	Ca ²⁺ -aktivierte Cl ⁻ -Kanal-Proteine (<i>chloride-channels</i> , <i>calcium activated</i>)

<i>clca</i>	Bezeichnung für die CLCA-Protein-kodierenden Gene
CNG	zyklisch Nuklotid-gesteuert (<i>Cyclic Nucleotide-Gated</i>)
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DM-Nitrophen	1-(2-nitro-4,5-Dimethoxyphenyl)-N,N,N',N'-etrakis[(Oxycarbonyl)methyl]- 1,2-Ethandiamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRG	Spinalganglion (<i>dorsal root ganglion</i>)
DTT	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-Butandiol
EDAC	1-Ethyl-3-(3Dimethylamino-Propyl)Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDXA	Elektronen-dispersive Röntgenstruktur-Mikroanalyse (<i>electro-dispersive x-ray microanalysis</i>)
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
FLIM	Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse (<i>fluorescence-lifetime imaging</i>)
g	Gramm, bzw. Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \frac{m}{s^2}$)
GTP	Guanosintriphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde(n)
HCN	hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)- Piperazin-N' - (2-Ethansulfonsäure)
I	Strom
HMW	High molecular weight-Marker
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktosid
K ⁺	Kalium-Ion
KCC	K ⁺ /Cl ⁻ -Kotransporter
Da	Dalton
l	Liter

LMW	Low molecular weight-Marker
m	Meter
M	Molar
MBP	Maltose-Bindeprotein
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger</i> -RNA)
NA	Numerische-Apertur
Na ⁺	Natrium-Ion
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ -Kotransporter
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD	Extinktion bei der im Index angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
OE	olfaktorisches Epithel
OSN	olfaktorisches Neuron, Riechzelle (<i>olfactory sensory neuron</i>)
P	Peptid
p.A.	pro analysi
PA	Paraformaldehyd
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PVDF	Polyvinylidonfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde(n)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure

TEA	<u>T</u> etra <u>e</u> thyl- <u>A</u> mmonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TJ	Tight Junctions
T _m	Hybridisierungstemperatur von Primern bei der PCR
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propandiol
TSC	Thiazid-sensitiver NA ⁺ /Cl ⁻ Kotransporter (<i>thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter</i>)
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
üN	über Nacht
UPM	Umdrehung pro Minute
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
V _M	Membranpotential
v/w	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galaktosid
Z	Zilien
ZK	Zilienknopf
ZNS	Zentralnervensystem
ZO	<i>Zonula occludens</i>

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin).

Die Aminosäuren sind nach dem Ein-Buchstabenkode abgekürzt (A: Alanin, C: Cystein, D: Asparaginsäure, E: Glutaminsäure, F: Phenylalanin, G: Glycin, H: Histidin, I: Isoleucin, K: Lysin, L: Leucin, M: Methionin, N: Asparagin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin, W: Tryptophan, Y: Tyrosin).

1 Einleitung

Nervenzellen sind elektrisch aktiv. Erhalten Nervenzellen einen adäquaten Reiz aus der Umwelt oder von einer vorgeschalteten Nervenzelle, werden sie erregt und können Aktionspotenziale an nachgeschaltete Nervenzellen weiterleiten. Aktionspotenziale werden mit Hilfe von Ionenströmen über die Zellmembran erzeugt. Damit Ionen über die Zellmembran fließen, muss ein elektro-chemisches Potenzial über die Membran aufgebaut werden. Dieses sogenannte Ruhepotenzial der Nervenzelle kommt durch die Ungleichverteilung verschiedener Ionen [v.a. Kalium (K^+), Natrium (Na^+), Chlorid (Cl^-) und organische Anionen] beiderseits der Zellmembran zu Stande. Diese Ungleichverteilung kann durch die selektive Permeabilität der Zellmembran für die verschiedenen Ionensorten aufrechterhalten werden. Das Ruhepotenzial vieler Nervenzellen liegt zwischen -40 und -70 mV. Zwei Arten integraler Membranproteine bestimmen das Membranpotenzial: *Ionenpumpen*, die Ionen aktiv (unter Energieverbrauch) gegen ihren elektro-chemischen Gradienten transportieren, und *Ionenkanäle*, die selektiv Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten die Membran passieren lassen. Die elektrische Erregung einer Nervenzelle wird durch die Depolarisation des Membranpotenzials erreicht. Das geschieht oft dadurch, dass Na^+ -Ionen in das Zellinnere der Nervenzelle strömen. Die elektrische Hemmung der Nervenzelle wird dagegen durch Hyperpolarisation des Membranpotenzials erreicht, was in der Regel durch den Fluss von Cl^- durch Cl^- -selektive Kanäle in die Nervenzelle geschieht. Die intrazelluläre Cl^- -Konzentration $[Cl^-]_i$ ist in den meisten Nervenzellen so gering gegenüber der extrazellulären Cl^- -Konzentration $[Cl^-]_e$, dass Cl^- entlang seines elektro-chemischen Potenzials nach Außen strömt und die Zelle elektrisch hemmt. Aktivierung und Hemmung einer Nervenzelle finden generell an der elektrischen Verschaltstelle zweier Nervenzellen, der Synapse, statt. Schüttet die signalgebende Nervenzelle die Botenstoffe GABA oder Glyzin in den synaptischen Spalt aus, binden sie an spezifische Rezeptoren in der postsynaptischen Membran. Dadurch wird die Leitfähigkeit für Cl^- erhöht; Cl^- strömt in die postsynaptische Zelle und hemmt die nachgeschaltete Nervenzelle.

Es gibt nur sehr wenige Arten von Nervenzellen, bei denen ein Cl^- -Strom keine Herabset-

zung der elektrischen Aktivität bewirkt, sondern im Gegenteil seine Aktivierung vermittelt. Die einzigen Nervenzellen, bei denen dieser Mechanismus bisher genauer untersucht wurde, sind die somatosensorischen Nervenzellen (im Folgenden: somatosensorische Neurone) der Spinalganglien (*dorsal root ganglia*, DRG) und die Riechsinneszellen. In diesen Zellen wird der Depolarisation durch Cl^- eine wichtige Rolle zugeschrieben. In beiden Zelltypen ist die Aktivierung eines Cl^- -Stroms an zytoplasmatische Kalzium (Ca^{2+})-Signale gekoppelt. Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle liefern den depolarisierenden Cl^- -Strom aus der Zelle.

1.1 Somatosensorische Neurone werden durch einen Cl^- -Strom aktiviert

Somatosensorische Neurone vermitteln Sinnesmodalitäten wie Schmerz, Temperatur und Berührung. Die Zellkörper der somatosensorischen Neurone befinden sich in den Spinalganglien (*dorsal root ganglia*, DRG; Abb. 1.1) und Trigeminalganglien, während ihre sensorischen Endigungen Informationen aus der Haut und von inneren Organen aufnehmen (Abb. 1.1 (A)). Die Axone dieser pseudounipolaren Neurone sind im Rückenmark verschaltet, wo die eingehenden Informationen zu den somatosensorischen Bereichen des Thalamus und Kortex geleitet werden. Somatosensorische Neurone besitzen an ihren Synapsen im Rückenmark GABA-Rezeptoren. Werden sie durch GABA-Ausschüttung präsynaptischer Nervenzellen stimuliert, werden somatosensorische Neurone nicht hyperpolarisiert, sondern depolarisiert und somit elektrisch erregt. Diese Erregung wird an nachgeschaltete Nervenzellen weitergegeben. Es wurde postuliert, dass somatosensorische Neurone aktiv Cl^- akkumulieren, und somit eine höhere $[\text{Cl}^-]_i$ als andere Neurone besitzen (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Gallagher et al., 1978). Eine Untersuchung in somatosensorischen Neuronen von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen zeigte, dass diese in somatosensorischen Neuronen einen depolarisierenden Efflux bewirken (Mayer, 1985).

Wie hält eine normale Nervenzelle eine niedrige Cl^- -Konzentration aufrecht, damit eine Hemmung durch Cl^- zuverlässig möglich ist, und wie kommen Ausnahmen mit hoher $[\text{Cl}^-]_i$ zu Stande? Interessanterweise besitzen embryonale Neurone im Gegensatz zu adulten

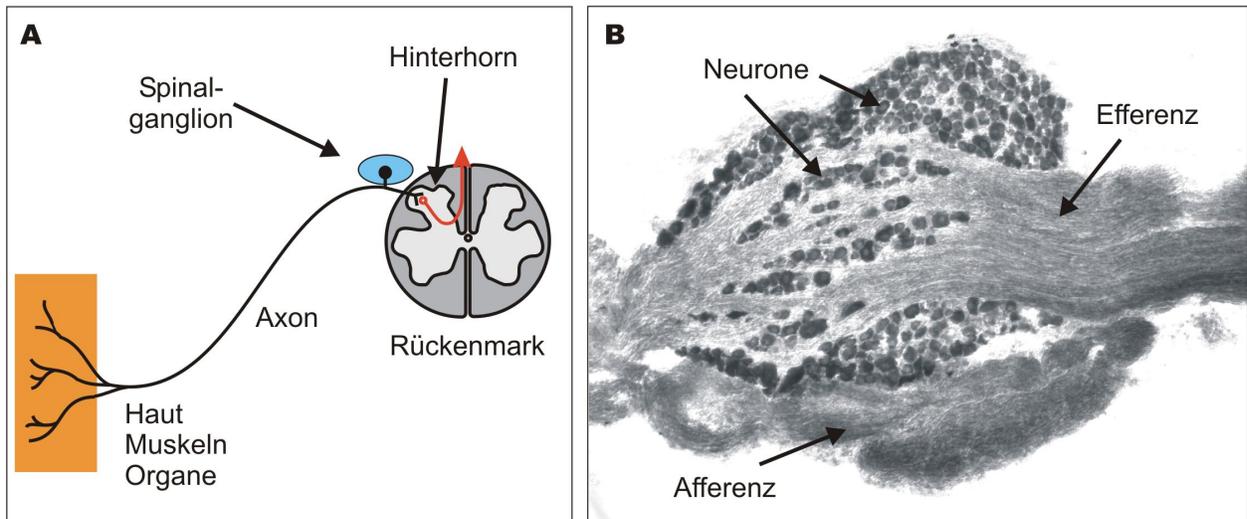


Abbildung 1.1: Aufbau und Verschaltung somatosensorischer Neurone. (A) Die Zellkörper der pseudounipolaren Neurone befinden sich im Spinalganglion (blau). Ihr Axon nimmt Informationen über Schmerz, Temperatur und Berührung, sowie chemische Reize aus der Haut, den Muskeln oder den inneren Organen auf. Die Verschaltung findet im Hinterhorn des Rückenmarks statt, wo eingehende Informationen auf nachgeschaltete Zellen übertragen werden. Die Informationsverarbeitung findet in den somatosensorischen Bereichen des Thalamus und des Cortex statt. (B) Längsschnitt durch ein Spinalganglion (*dorsal root ganglion*, DRG) der Ratte. Die Neurone erscheinen dunkel, da der Schnitt mit einer Nisselfärbung (Richardson-Blau) angefärbt wurde. Man erkennt sowohl die gebündelten Axone der somatosensorischen Neurone (Efferenz), die zentral durch das DRG ziehen, als auch die Axone der Motoneurone (Afferenz), die vom Rückenmark zu den Muskeln in der Haut und den inneren Organen projizieren.

Neuronen eine sehr hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentration, so dass GABA embryonale Neurone elektrisch erregt, während es adulte Neurone hemmt (Übersicht: Cherubini et al., 1991). Diese Funktionsänderung findet während der ersten Woche nach der Geburt statt und geht mit einer Abnahme der intrazellulären Cl^- -Konzentration einher (bei Rückenmarksneuronen von 45 mM auf 5 mM; Li et al., 1998). Die molekularen Grundlagen für die rapide Abnahme der $[\text{Cl}^-]_i$ während der Entwicklung (*“chloride switch“*) wurden durch Untersuchungen an Hippokampus-Neuronen entschlüsselt (Rivera et al., 1999): Der Übergang von der depolarisierenden zur hyperpolarisierenden GABA-Antwort geht mit der immer stärker werdenden Expression des gehirnspezifischen K^+/Cl^- -Kotransporters KCC2 einher, der Cl^- -Ionen mit Hilfe des K^+ -Gradienten aus der Zelle transportiert. Es wurde gezeigt, dass während der postnatalen Entwicklung der somatosensorischen Neurone KCC2 nicht exprimiert wird und sich im adulten Organismus KCC2 sich nicht nachweisen lässt

(Kanaka et al., 2001). Die Zellen besitzen lediglich die ubiquitäre Isoform des Transporters, KCC1.

Die Methoden, die bislang zur Messung der ungewöhnlich hohen $[\text{Cl}^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen verwendet wurden, sind invasiv (Mikroelektroden) und zudem oft indirekt (Messung des E_{Cl} , Bestimmung der Nachpotenziale). Es fehlen Messungen mit nicht-invasiven Methoden an intakten somatosensorischen Neuronen, wie zum Beispiel die Messung mit einem Cl^- -sensitiven Farbstoff. Solche Messungen sind erforderlich, um das Gleichgewichtspotenzial für Cl^- (E_{Cl}) genau zu bestimmen und die Cl^- -Homöostase in somatosensorischen Neuronen zu verstehen.

1.2 Ein zweites Beispiel für die Aktivierung durch Cl^-

- Der Riechsinn der Wirbeltiere

Auch bei olfaktorischen Sinneszellen (Riechzellen, *olfactory sensory neurons*, OSN) scheint Cl^- eine aktivierende statt hemmende Wirkung zu haben (Kaneko et al., 2001), da in Riechzellen eine sehr hohe $[\text{Cl}^-]_i$ von 46-69 mM gemessen wurde (Nakamura et al., 1997; Reuter et al., 1998). Diese Messungen wurden z.T. mit einem Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt, allerdings an isolierten Riechzellen (Nakamura et al., 1997). In unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass enzymatisch vereinzelte Riechzellen ihre ursprüngliche $[\text{Cl}^-]_i$ nicht aufrechterhalten können (H. Kaneko et al., Manuskript in Vorbereitung). In einem anderen Fall wurde die $[\text{Cl}^-]_i$ mit der Energie-dispersiven Röntgen-Mikroanalyse (*energy dispersive X-ray microanalysis*, EDXA) bestimmt, bei der die $[\text{Cl}^-]_i$ zwar in Riechepithelschnitten gemessen wird, die aber für die Messung aufwändig behandelt und eingefroren werden müssen (Reuter et al., 1998). Die Frage, ob Cl^- in Riechzellen eine depolarisierende Funktion hat, ist besonders interessant, da am Ende der Riechsignalkaskade ein Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanal steht, der in der Lage wäre, den Rezeptorstrom der Zelle mit zu tragen.

1.3 Der Aufbau des Riechepithels

Die Riechzellen der Wirbeltiere sind Teil des olfaktorischen Epithels, das die Nasenhöhle auskleidet. In der Nasenhöhle befinden sich dünne Knorpelscheiben (*Conchen*), die fächerartig hintereinander liegen und ebenfalls mit Riechepithel bedeckt sind (Abb. 1.2). Dadurch wird die Oberfläche des Epithels vergrößert; es enthält 6-15 Millionen Riechzellen. Neben den Riechzellen besteht das Epithel vor allem aus Stützzellen und Basalzellen (Abb. 1.3 auf der folgenden Seite).

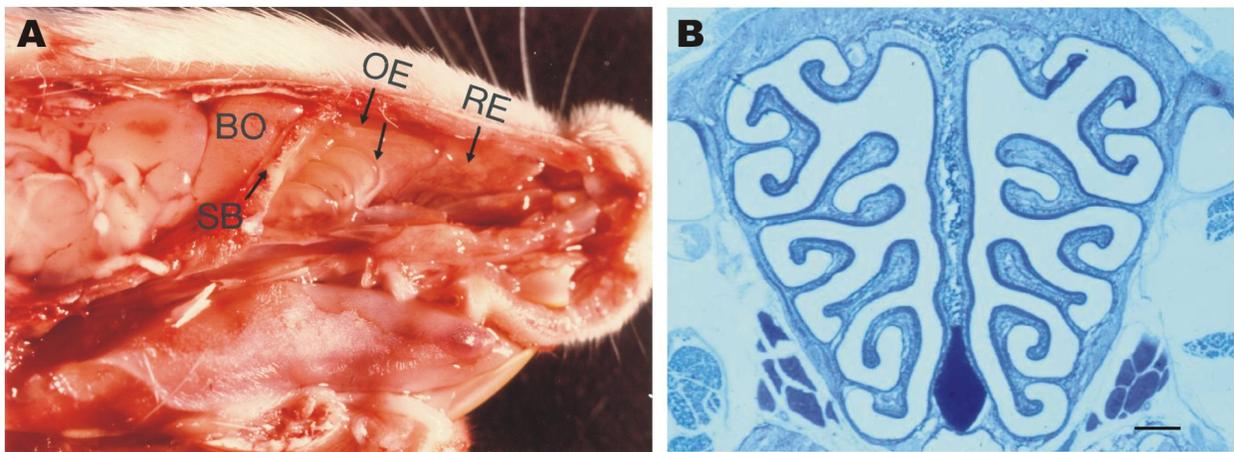


Abbildung 1.2: (A) Lage des olfaktorischen Epithels im Rattenschädel. Das Bild zeigt einen Sagittalschnitt durch den Schädel einer ca. vier Wochen alten Wistar-Ratte. Man erkennt rechts die Nasenspitze. Das respiratorische Epithel (RE) befindet sich im vorderen Teil der Nasenhöhle, dahinter das leicht gelbliche olfaktorische Epithel (OE). Das OE wird durch das Siebbein (SB) des Schädelknochens vom Gehirn getrennt. Die Axone der Riechzellen projizieren durch das Siebbein zum *Bulbus olfactorius* (BO), wo die Informationen zum Gehirn weitergeleitet werden. (Foto zur Verfügung gestellt von Dr. B. Menco, University of Maryland, Baltimore, 1994.) (B) Toluidin-Blau-gefärbter Coronarschnitt durch die Nase einer drei Wochen alten Wistar-Ratte. Der Schnitt zeigt die hintere Region der Nasenhöhle. Das olfaktorische Epithel ist dunkelblau angefärbt und liegt auf den zur Nasenscheidewand spiegelsymmetrisch angeordneten Conchen. Der Balken entspricht ca. 200 μm . (Foto zur Verfügung gestellt von Dr. J. Strotmann, Universität Hohenheim.)

Die Stützzellen sind palisadenartig angeordnet und tragen Mikrovilli an ihrer apikalen Membran. Sie haben eine ähnliche Versorgungsfunktion wie die Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS). In das olfaktorische Epithel sind Bowman'sche Drüsen eingebettet. Sie erneuern stetig die Schleimschicht (Mucus), die das olfaktorische Epithel bedeckt. Laterale Zellverbindungen (*Zonulae occludentes*) zwischen den Stützzellen bilden im apikalen Bereich

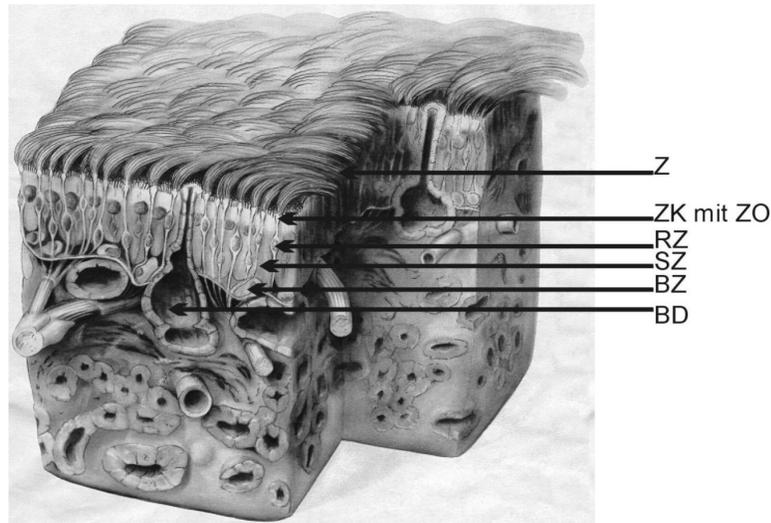


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels. Z: Zilien; ZK mit ZO: Zilienknopf mit *Zonula occludens*; RZ: Riechzelle; SZ: Stützzelle; BZ: Basalzelle; BD: Bowman'sche Drüse. Quelle: Anholt, 1993.

des Epithels eine Diffusionsgrenze zwischen Mukus und der interstiziellen Flüssigkeit. Unterhalb der Stützzellen liegen die Basalzellen. Aus ihnen entwickeln sich stetig neue Riechzellen, so dass sich die Riechzellpopulation ständig erneuert.

Riechzellen sind primäre bipolare Sinneszellen (Abb. 1.4). Am apikalen Ende entsenden die

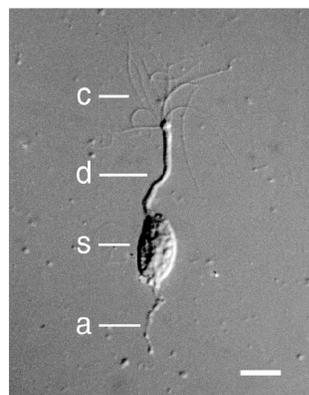


Abbildung 1.4: Aus dem Riechepithel eines Frosches isolierte Riechzelle. Zu erkennen sind die sensorischen Zilien (c), der Dendrit (d), der Zellkörper (Soma, s) und der Rest des Axons (a). Der Balken entspricht 10 μm ; Quelle: Kleene und Gesteland, 1981)

Zellkörper einen Dendriten zur Oberfläche des olfaktorischen Epithels, der sich zu einer 2-5 μm großen, knopfartigen Auswölbung verdickt (Zilienknopf). Aus dem Zilienknopf ragen 10

bis 20 feine Zilien, die am Ansatz weniger als 1 μm dick sind und sich zu ihrer Spitze hin verjüngen. Die Membranen der Zilien bilden eine große chemosensorische Oberfläche und enthalten die molekularen Komponenten der chemoelektrischen Signaltransduktion. Informationen über Intensität und Zusammensetzung eines Geruchs werden von den Riechzellen in Form von Aktionspotenzialen kodiert, die über das Axon durch das Siebbein des Schädelknochens zum Gehirn geleitet werden. Die erste Verschaltstelle im Gehirn ist der Riechkolben (*Bulbus olfactorius*, BO), in dem die Informationen der Riechzellen räumlich geordnet werden, bevor sie zu spezialisierten Regionen des Cortex, zum Thalamus und zum Limbischen System weitergeleitet werden.

1.4 Signaltransduktion in Riechsinneszellen

Duftstoffe, die durch die Atemluft getragen werden, diffundieren durch den Mukus und binden an Duftstoffrezeptoren in der Zilienmembran (Buck und Axel, 1991; Breer et al., 1996; Freitag et al., 1998). Duftstoffrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Bindung eines Duftstoffes löst eine Signaltransduktionskaskade in den Riechzilien aus (Abb. 1.5 auf der folgenden Seite) (Schild und Restrepo, 1998; Breer et al., 1994; Zufall et al., 1994). Das G-Protein G_{olf} (Jones und Reed, 1989) wird durch die Rezeptoren aktiviert und leitet das olfaktorische Signal weiter zu einer membranständigen Adenylylzyklase, die daraufhin aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisiert (Firestein et al., 1991; Pace et al., 1985). Die in den Zilien der Riechzellen exprimierte Adenylylzyklase gehört zum AC III-Typ (Bakalyar und Reed, 1990; Pfeuffer et al., 1989). In Folge der AC III-Stimulation durch G_{olf} steigt die cAMP-Konzentration in den Riechzilien an und erreicht innerhalb von 100 Millisekunden (ms) ihr Maximum (Breer et al., 1990). cAMP fungiert innerhalb der Signaltransduktionskaskade als Botenstoff (“*second messenger*“).

In der Zilienmembran befinden sich zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle). Ein Duftstoff-induzierter Anstieg der ziliären cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung der CNG-Kanäle (Nakamura et al., 1997; Frings et al., 1992; Firestein et al., 1991). Neben monovalenten Kationen leiten die CNG-Kanäle hauptsächlich Ca^{2+} -Ionen vom Mukus in das Zilien-Lumen (Dzeja et al., 1999; Seifert et al., 1999; Kleene, 1995; Frings et al.,

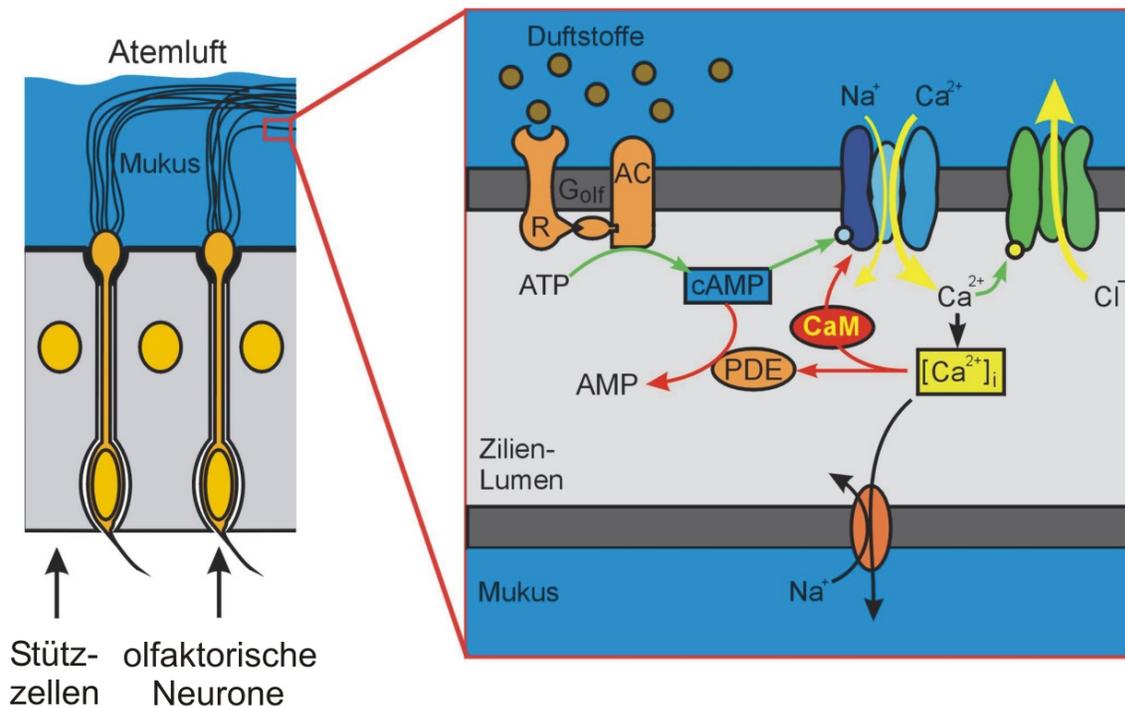


Abbildung 1.5: Signaltransduktionskaskade in den Riechzilien der Vertebraten. Abkürzungen: cAMP: Zyklisches Adenosinmonophosphat; ATP: Adenosintri-phosphat; G_{olf} : GTP-bindendes Protein; PDE: Phosphodiesterase; CaM: Calmodulin; AC: Adenylylzyklase; R: Rezeptor.

1995; Zufall und Firestein, 1996). Das führt sowohl zu einem schnellen Anstieg der ziliären Ca^{2+} -Konzentration (Leinders-Zufall et al., 1997), als auch zu einer Depolarisation der Rezeptormembran.

Zusätzlich zu diesem depolarisierenden Kationenstrom vermittelt Ca^{2+} als „*third messenger*“ einen ungewöhnlichen Verstärkungsmechanismus. In der Zilienmembran befinden sich in höherer Dichte als die CNG-Kanäle auch Ca^{2+} -aktivierte Cl^{-} -Kanäle (Reisert et al., 2003; Kleene und Gesteland, 1991). Diese Kanäle werden aktiviert, wenn die $[Ca^{2+}]_i$ mikromolare ($K_{1/2} = 2 \mu M$) Konzentrationen erreicht (Reisert et al., 2003; Kleene, 1997; Kleene, 1993; Kleene und Gesteland, 1991). Die mukosale $[Cl^{-}]$ bei Ratten beträgt ca. 55 mM (Reuter et al., 1998), während 23-120 mM Cl^{-} für das Zytosol von Ratten- und Amphibien-Riechzellen angenommen werden. Deshalb führt die Aktivierung der Cl^{-} -Kanäle in den Zilien vermutlich zu einem depolarisierenden Ausstrom von Cl^{-} (Dubin und Dionne, 1994; Zhainazarov und Ache, 1995; Nakamura et al., 1997; Reuter et al., 1998). Der Rezeptorstrom

in Riechzellen hat also eine kationische (CNG-Kanäle) und eine anionische (Cl^- -Kanäle) Komponente. In isolierten Riechzellen macht der von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen getragene Strom über 90% des Rezeptorstroms aus (Reisert et al., 2003; Kleene, 1993 ; Kurahashi und Yau, 1993; Lowe und Gold, 1993). Sowohl die Aktivierung der CNG-Kanäle durch cAMP als auch die der Cl^- -Kanäle durch Ca^{2+} erfolgt kooperativ. Das bewirkt eine nicht-lineare Verstärkung des Duftstoffsignals. Duftstoff-induzierte Schwankungen der cAMP-Konzentration, die unter einem Schwellenwert liegen, induzieren keinen Strom. Liegt die cAMP-Konzentrationen nur wenig über dem Schwellenwert, verursacht das dagegen eine starke Aktivierung der Kanäle und somit eine elektrische Erregung (Lowe und Gold, 1993). Ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher entfernt das eingeströmte Ca^{2+} aus der Zelle. Die Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanäle schließen, wenn sich die Ca^{2+} -Konzentration wieder der Ruhekonzentration nähert. Die Cl^- -Komponente des Rezeptorstroms wird so abgeschaltet (Reisert und Matthews, 1996). Das Zusammenwirken der hier beschriebenen Mechanismen führt dazu, dass nach oder während der Duftstoff-Stimulation die Riechzelle adaptiert, der Rezeptorstrom beendet und das Ruhepotenzial wiederhergestellt wird.

Die meisten Komponenten der Riechsignalkaskade sind bereits sehr gut charakterisiert. Die Gene für viele der beschriebenen Komponenten, beispielsweise Gene für olfaktorische Rezeptoren oder den CNG-Kanal sind identifiziert (Kaupp und Seifert, 2002; Bönigk et al., 1999; Buck und Axel, 1991; Dhallan et al., 1990). Die dazugehörigen Proteine wurden bereits sowohl biophysikalisch als auch proteinbiochemisch untersucht. Obwohl der Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal wahrscheinlich die entscheidende Komponente des Rezeptorstroms ist, wurde bisher jedoch kein Gen für diesen Kanal eindeutig identifiziert. Bislang war die Klonierung eines Ionenkanals und die Untersuchung des heterolog in Ammenzellen exprimierten Gens stets ein entscheidender Schritt für das Verständnis seiner physiologischen Funktion. Diese Möglichkeit ist für den Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal der Riechzellen noch nicht gegeben.

1.5 Die Familie der Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanäle

Bisher wurden erst wenige Cl^- -Kanalfamilien identifiziert, darunter die Familien der spannungsgesteuerten Cl^- -Kanäle, Volumen-regulierte Cl^- -Kanäle (*volume regulated anion channels*, VRAC) und die Liganden-gesteuerten Cl^- -Kanäle, zu denen CFTR (*cystic*

fibrosis transmembrane conductance regulator), GABA_A-Rezeptoren und Glycin-Rezeptoren zählen (Übersicht: Nilius und Droogmans, 2003; Jentsch et al., 2002). Zudem wurde eine Proteinfamilie entdeckt, deren Mitglieder die Eigenschaften Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle aufweisen: die CLCA-Proteine (*chloride channel, calcium activated*). Die Mitglieder dieser Familie weisen keinerlei Homologie zu den anderen bekannten Cl⁻-Kanalfamilien auf. Das erste CLCA-Protein wurde in der Rinder-Trachea identifiziert (Cunningham et al., 1995). Die CLCA-Proteinfamilie umfasst bislang elf Mitglieder, die innerhalb der letzten zehn Jahre aus den Epithelien nicht-erregbarer Gewebe wie Trachea, Aorta, Lunge (Elble et al., 2002; Agnel et al., 1999; Gruber und Pauli, 1999a; Gruber und Pauli, 1999b; Komiya et al., 1999; Lee et al., 1999; Romio et al., 1999; Gandhi et al., 1998; Gruber et al., 1998; Elble et al., 1997; Übersicht: Gruber et al., 2000; Pauli et al., 2000) kloniert wurden (Sequenzen s. Anhang). Es wäre möglich, dass der - elektrophysiologisch gut charakterisierte (Mayer, 1985; Scott, 1995) - Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Strom der Riech- und Schmerzstellen durch eines der *clca*-Gene kodiert wird.

In unserer Arbeitsgruppe wurde 1998 auf Basis von *mclca1* (Gruber et al., 1998) (m = Maus) ein *clca*-Gen anhand der cDNA (*“complementary DNA“* = revers transkribierte RNA) des olfaktorischen Epithels der Ratte kloniert (J. Bradley, IBI-1, Forschungszentrum Jülich). Es ist das erste *clca*-Gen, das aus einem neuronalen Epithel kloniert wurde. Da es das erste bekannte *clca*-Gen aus der Ratte war und mit Hilfe der *mclca1*-Sequenz kloniert wurde, wurde es *rlca1* genannt. Das Gen ist in seiner Sequenz jedoch ähnlicher zu der des erst kürzlich klonierten *mclca4*-Gens (Elble et al., 2002; s. Sequenzvergleich im Anhang). Das *rlca1*-Gen stellt einen Wegweiser für die Suche nach dem in der olfaktorischen Signaltransduktion so bedeutenden Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanal dar. Dr. J. Bradley konnte durch *in situ*-Hybridisierung die Expression der *rlca1*-mRNA in den olfaktorischen Neuronen nachweisen (unveröffentlicht). Dieses Ergebnis weist auf eine Beteiligung des rCLCA1-Proteins bei der Signaltransduktion in olfaktorischen Neuronen hin.

Obwohl vieles darauf hindeutet, gibt es dennoch Zweifel daran, dass die Mitglieder der CLCA-Familie tatsächlich Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle bilden (Jentsch et al., 2002). Ein Grund dafür sind zum Teil widersprüchliche Ergebnisse bei der funktionellen Analyse

der heterolog exprimierten Proteine. Bei der Expression von *bclca1* in *Xenopus* Oozyten (die endogene Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle besitzen) wurden große, zeitunabhängige und auswärts gleichrichtende Cl^- -Ströme gemessen. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration musste dafür allerdings nicht erhöht werden (!). Im Gegensatz dazu war der Cl^- -Strom in *bclca1*-transfizierten COS-7-Zellen linear und konnte nur gemessen werden, wenn die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht wurde (Cunningham et al., 1995). Whole-Cell Patch-Clamp-Experimente mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin in der Badlösung, oder mit 5 mM Ca^{2+} in der Pipette, wurden vorgenommen, um CLCA-assoziierte Ströme zu induzieren. Hierbei wurde immer mit sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen gearbeitet (2 mM) (Gruber und Pauli, 1999a; Gandhi et al., 1998; Gruber et al., 1998). Das ist weitaus höher als die physiologisch relevante Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle. Es ist somit nicht geklärt, ob die CLCA-Proteine physiologisch relevante Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle bilden.

Zielsetzung dieser Arbeit

Aus dem hier dargestellten Stand der Forschung ergeben sich für meine Arbeit folgende Fragestellungen:

- Kodiert das *rclca1*-Gen für den Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal der Riechsignalkaskade?
- Welche Mechanismen sind an der Cl^- -Akkumulation der Riechzellen beteiligt?
- Wie hoch ist die $[\text{Cl}^-]_i$ in frisch dissoziierten somatosensorischen Neuronen?

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wurden, falls nicht anders angegeben, aus Sambrook et al., 1989 entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Chemikalien und Enzyme

Es wurden Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Riedel-de Haën AG (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Quiagen (Hilden) und USB (Bad Homburg) bezogen.

Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Amersham Pharmacia Biotech, GIBCO BRL, NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien der Firma Sigma verwendet. Chemikalien und Fertiglösungen für die Zellkultur wurden von GIBCO BRL und Sigma bezogen. Primär- und Sekundär-Antikörper sowie Reagenzien für immunologische Nachweise wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), Eurogentec (Seraing, Belgien), Davids (Regensburg), Alpha Diagnostics International (San Antonio, USA), Amersham Pharmacia Biotech, BioSource (Camarillo, USA), Dianova (Hamburg), Molecular Probes (Leiden, Niederlande) und Pierce (Rockford, USA) bezogen. Proteine wurden auf die PVDF-Membran Immobilon P der Firma Millipore (Eschborn) transferiert. Für die Autoradiographie und die Chemilumineszenz wurden ECL Hyperfilme von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. MQAE für die Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen wurde von Molecular Probes bezogen.

Alle Lösungen wurden ausschließlich mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 min; 121°C) sterilisiert.

2.2 Vermehrung von *E. coli*

2.2.1 Verwendeter Bakterienstamm

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* K12-Stamm XL1-Blue benutzt. Dieser Bakterienstamm (Bullock et al., 1987) (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *lac* [*F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)*]) wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA verwendet.

2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E. coli*

Bakterien wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Es ist aus 1% (w/v) Baktotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt und 1% (w/v) NaCl zusammengesetzt. Für LB-Agar-Platten wurden 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Die Flüssigmedien wurden in Portionen aufgeteilt, autoklaviert (20 min; 121°C) und bei RT gelagert. Agar enthaltende Medien wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml/Platte). Das Selektionsantibiotikum Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) wurde kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60°C heißen Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden mit einer modifizierten Form der CaCl₂-Methode nach Mandel und Higa, 1970 hergestellt. 0,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur (ÜK) wurden in 50 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert und 10 min bis 2 h auf Eis abgekühlt. Bei den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen auf Eis gehalten und ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet.

Die Zellen wurden 10 min zentrifugiert (5.000 x g; 4°C), das Pellet vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und auf 25 ml aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1 ml 0,1 M CaCl₂/25% Glycerin resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Nach weiteren 2 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Bei Bedarf wurden die Zellen auf Eis aufgetaut.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Plasmide

Für Subklonierungen wurde das Plasmid pBlueskript SK⁻ (Short et al., 1988; Stratagene) benutzt. Als Expressionsvektor für die verschiedenen Zelllinien wurde pcDNA 3.1 Amp (Invitrogen) verwendet.

2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.3.2.1 Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doley, 1979

Für die Präparation wurden die Bakterienzellen aus 1,5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation (14.000 UpM; 2 min; RT) pelletiert und in 100 μ l Lösung I (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lösung II (0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS) und vorsichtigem Mischen (Invertieren) lysieren die Zellen, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden bleibt. Zur Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine wurden 150 μ l Lösung III (3 M KAc pH 4,8) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min zentrifugiert (14.000 UpM; RT). Der Überstand wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.4.1). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 1 ml Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (15.300 UpM; 4°C ; 5 min). Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 μ l TE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.3.2.2 LiCl-Mini-Präparation für die LICOR-Sequenzierung

Sollte die DNA sequenziert (2.3.7) werden, wurde sie mit einer LiCl-Plasmid-Präparation isoliert. Dazu wurden die Bakterienzellen aus einer 5 ml Übernachtskultur durch zwei Zentrifugationsschritte (14.000 UpM; 2 min) in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß pelletiert. Analog zur oben beschriebenen Mini-Präparation (2.3.1) wurden die Zellen in 150 μ l Lösung I resuspendiert, durch Zugabe von 180 μ l Lösung II lysiert und Zelltrümmer und Proteine mit 225 μ l Lösung III präzipitiert. Nach Zentrifugation (17.000 x g; 5 min; 4°C) wurde der

Überstand mit 1,5 ml Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 60 μ l 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Zur Präzipitation der RNA wurden 100 μ l 4 M LiCl zugegeben, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (17.000 x g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde mit 500 μ l eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l TE_{Rnase} (4 μ l Rnase-Cocktail (Ambion)/ml TE-Puffer) aufgenommen, und 20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 μ l 3 M NaAc pH 4,8 und 300 μ l eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 μ l TE aufgenommen. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der Kultur 1,5-4 μ g Plasmid-DNA.

2.3.2.3 Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen

Größere DNA-Mengen wurden durch LiCl-Plasmid-Präparationen isoliert. Für eine Maxi-Präparation wurden die Bakterienzellen aus einer 250 ml Übernachtskultur pelletiert (5.000 x g; 10 min; 4°C), in 20 ml Lösung I (2.3.2.1) resuspendiert und mit 30 ml Lösung II (2.3.2.1) lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III (2.3.2.1) gefällt und pelletiert (5.000 x g; 10 min; RT). Die Plasmidlösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (5.000 x g; 10 min; 4°C) und die Nukleinsäuren in 2,9 ml H₂O und 100 μ l Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 5 ml 4 M LiCl wurde die RNA gefällt und pelletiert (5.000 x g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 12 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (5.000 g; 15 min; 4°C) wurde das Pellet in 500 μ l TE_{Rnase} resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Extraktion (2.3.3.1) und Ethanol-Präzipitation (2.3.3.2) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 250 μ l TE aufgenommen.

Mega-Präparationen wurden aus 500 ml Bakterienkulturen angefertigt. Die Volumina der oben angegebenen Lösungen wurden entsprechend angepasst. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der Übernachtskultur 0,5-1 μ g Plasmid-DNA/ml eingesetzter Bakterienkultur.

2.3.3 Reinigung von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Phenol-/Chloroform-Extraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind (z.B. Proteine oder Membranbestandteile), wurden durch Phenol-/Chloroform-Extraktion entfernt. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, die Phasen gut gemischt und durch Zentrifugation (14.000 UpM; 2 min; RT) getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.3.3.2).

2.3.3.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine NaAc-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt, kurz gemischt und bei kleineren DNA-Fragmenten zusätzlich mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15.300 UpM; 4°C) pelletiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach Größe und Konzentration der DNA. Je kleiner und je geringer konzentriert die DNA war, desto länger wurde zentrifugiert (10-60 min). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

2.3.4 Quantifizierung und Analyse von Nukleinsäuren

2.3.4.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit der Agarosegel-Elektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Die Agarose-Konzentration der Gele variierte zwischen 0,5%, zur Auftrennung von Fragmenten >5000 Bp, und 2%, zur Auftrennung von Fragmenten <500 Bp.

Die Agarose wurde in 1x TBE (12,11% (w/v) TrisBase; 6,18% (w/v) Borsäure; 0,74% (w/v) EDTA) aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf 60°C wurde die

Gellösung mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit Probenaschen-Former gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurden die Proben, die zuvor mit 1/5 Volumen Probenpuffer (100 mM EDTA; 20% (w/v) Ficoll400; 0,001% (w/v) Bromphenolblau; 0,001% (w/v) Xylencyanol) versetzt worden waren, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE als Laufpuffer, der ebenfalls 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid enthielt, bei 90-120 V bis zur ausreichenden Trennung der Nukleinsäuren durchgeführt. Durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid waren die Fragmente unter UV-Licht (254 nm) sichtbar.

2.3.4.2 DNA-Größen- und Mengenstandards

Als DNA-Größenstandard wurde EcoRI/HindIII geschnittene λ -DNA (MBI Fermentas; St. Leon-Rot) verwendet. Es wurden jeweils 500 ng der DNA in einer Spur des Gels aufgetragen. Die Fragmentgrößen und DNA-Mengen betragen: 21.226 Bp (291,8 ng), 5.184 Bp (70,8 ng), 4.973 (68,4 ng), 4.268 Bp (58,7 ng), 3.530 Bp (48,5 ng), 2.027 Bp (27,9 ng), 1.904 Bp (26,2 ng), 1.584 Bp (23,5 ng), 1.375 Bp (18,9 ng), 947 Bp (13,0 ng), 831 Bp (11,4 ng), 564 Bp (7,8 ng), 124 Bp (1,7 ng).

2.3.4.3 DNA-Analyse durch Restriktion mit Endonukleasen

Zur Analyse von DNA mit Restriktions-Endonukleasen wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Wenn dies nicht möglich war, wurden zwischen den Inkubationen durch Zugabe der entsprechenden Salze die neuen Pufferbedingungen eingestellt, nach Ethanol-Präzipitation (2.3.3.2) umgepuffert oder das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarosegel eluiert (2.3.4.1; 2.3.4.6).

Zum Schneiden wurden 1-5 U Enzym/ μg Plasmid-DNA eingesetzt. Das eingesetzte Enzymvolumen war stets kleiner als 10% des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA, die durch alkalische Mini-Präparation isoliert worden war, wurden zusätzlich mit RNase-Cocktail (Ambion) versetzt.

2.3.4.4 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarosegelen

Die auf einem Agarosegel aufgetragenen DNA-Mengen wurden durch den Vergleich mit dem Größen- und Mengenstandard (2.3.4.2) anhand der Fluoreszenzintensität der Banden abgeschätzt.

2.3.4.5 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die DNA in TE verdünnt und die Absorption bei 260 nm gegen TE gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht 50 µg DNA/ml oder 33 µg Oligonukleotiden/ml. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnten durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm beurteilt werden. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt der Wert zwischen 1,8 - 2,0.

2.3.4.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) wurde der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes entfernt, der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (7.000 UpM; 5 min; RT). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment. Die Reinigungsausbeute betrug zwischen 30% und 50%.

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden ("Primern") hybridisiert und diese mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986). Das PCR-Fragment kann über Schnittstellen oder nach Klenow-Reaktion (2.3.6.1) und Phosphorylierung (2.3.6.2) in einen Vektor kloniert werden (2.3.6.4).

2.3.5.1 Synthese und Reinigung von Oligonukleotid-Primern

Oligonukleotide (“Primer“) wurden mit dem “DNA-Synthesizer 391“(Applied Biosystems) hergestellt oder bei MWG-Biotech bestellt.

Die Abspaltung der selbst hergestellten Primer von der Säulenmatrix erfolgte in 32%iger Ammoniaklösung (15 h; 55°C). Nach der Lyophilisierung wurden die Primer in H₂O resuspendiert und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 4,8 sowie dem dreifachen Volumen Ethanol gefällt. Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.3.5.2 PCR-Bedingungen

Die Reaktionen wurden in einem “TRIO-Thermoblock“(Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde je 45 sek denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer. Sie wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = (G/C) \times 4^\circ\text{C} + (A/T) \times 2^\circ\text{C} - (\text{Basenfehlpaarung}) \times 4^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$$

Zur Strangverlängerung wurde bei 72°C inkubiert. Die Zeitspanne richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und betrug dabei ca. 1 sek/10 B. Es wurden 25-45 Zyklen durchgeführt. Sowohl die Taq-Polymerase (Roche Diagnostics) als auch das Thermoprime-Enzym (ABgene) wurde mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer benutzt. Ein 100 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1-20 ng Plasmid-DNA

10 ng/Base x µl spezifischer Primer (150-400 ng/µl)

1x PCR-Puffer für die jeweilige Polymerase

0,2 mM dNTP

1-2,5 U hitzestabile Polymerase

2.3.5.3 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden durch Phenol-/Chloroform-Extraktion (2.3.3.1) und Ethanol-Präzipitation (2.3.3.2) gereinigt. Waren Nebenprodukte vorhanden oder sollten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren subkloniert werden, wurde die DNA auf ein Gel aufgetragen und die

Fragmente der gewünschten Größe eluiert (2.3.4.6).

2.3.6 Subklonieren von PCR-Produkten in Plasmidvektoren

2.3.6.1 Glätten überhängender 5'-Enden (Klenow-Reaktion)

DNA-Produkte, die durch PCR-Reaktionen entstehen, erhalten überhängende 5'-Enden. Diese wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt (5'-3'-Polymeraseaktivität). Durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Der Reaktionsansatz (2 U Klenow-Enzym/ μg DNA, in einem beliebigen Restriktionspuffer, 200 μmol dNTP) wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5 bis 10 min bei 68°C inaktiviert.

2.3.6.2 Phosphorylierung

Da PCR-Fragmente (2.3.5) keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen besitzen, wurden sie vor der Ligation (2.3.6.4) in Vektoren phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase (PNK, Roche) im entsprechenden Puffer und 1 mM ATP 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 10 min Hitze-Inaktivierung der Kinase bei 68°C wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt. Im Falle einer zuvor durchgeführten Klenow-Reaktion mussten die Desoxynukleotide entweder durch Ethanol-Präzipitation (2.3.3.2) oder durch Agarosegel-Elektrophorese entfernt werden.

2.3.6.3 Dephosphorylierung

Um eine Religation geschnittener Plasmidvektoren zu vermeiden, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics) entfernt. Die geschnittene Vektor-DNA wurde mit 1 U des Enzyms in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl EGTA (250 mM) und 10 min Inkubation bei 68°C beendet. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.3.1) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.3.3.2) oder aus einem Agarosegel eluiert.

2.3.6.4 Ligation

Zur Ligation wurden ca. 50 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor und ein 3-10facher molarer Überschuss an Fragment in 1x Ligasepuffer und 0,1 mM ATP gemischt. Wiesen die Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrang-Enden (*“sticky ends“*) auf, wurde mit 1U T4-DNA-Ligase (Roche) 60 min bei RT ligiert. Waren die Fragmentenden glatt (*“blunt“*), wie z.B. bei aufgefüllten PCR-Produkten, wurde mit 1U T4-DNA-Ligase μ N bei 16°C ligiert. Das Reaktionsvolumen betrug 15 μ l.

2.3.6.5 Transformation von *E. coli* Zellen

7,5-15 μ l eines Ligationsansatzes (2.3.7.4) oder 0,5 μ l einer Plasmid-Präparation (2.3.2, *“Retransformation“* zur Amplifikation der DNA) wurden zu 50-100 μ l kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 20-60 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42°C (*“Hitzeimpuls“*) und weiteren 10-15 min auf Eis wurden die Zellen auf LB-Agar (100 μ g Ampicillin/ml) ausplattiert und μ N bei 37°C inkubiert.

Zur Farbidentifizierung von XL1-Blue-Bakterienkolonien mit rekombinanter DNA wurden 50 μ l X-Gal (250 mg/ml) und 10 μ l IPTG (120 mg/ml) kurz vor dem Ausstreichen direkt zum Transformationsansatz gegeben.

2.3.7 Nichtradioaktive Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte im *“LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200“* (MWG-Biotech, Ebersberg) und beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (2.3.5) mit IRD800-Fluorophor-markierten Primern. Zur Auswertung der Sequenzen wurden die Software des Geräteherstellers und die Programme PCGene und PCSupp (Dr. W. Bönigk, IBI-1/Forschungszentrum Jülich) verwendet.

2.3.7.1 Sequenzier-Reaktion

Es wurde das *“Thermo Sequenase Kit“* von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Pro Reaktion wurden 0,5 bis 2 μ g DNA eingesetzt, 1,6 pmol IRD800-Fluorophor-markierten Primers zugegeben und der

Ansatz mit Wasser auf 7 μl Endvolumen eingestellt. Je 1,5 μl des Ansatzes wurden in vier PCR-Reaktionsgefäße pipettiert, in denen je 1 μl der vier unterschiedlichen (A, G, C, T) Terminationsmische (Verdünnung 1:2) vorgelegt war. Die Ansätze wurden mit 20 μl Chill-out Wax/14 (MJ Research) überschichtet und zur Sequenzierung (2.3.7.2) eingesetzt.

2.3.7.2 PCR zur Sequenzierung

Die Reaktionen wurden in einem "TRIO-Thermoblock" (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde 40 s denaturiert. Die Hybridisierung der Primer erfolgte bei 50°C für 40 sek Zur Strangverlängerung wurde bei 70°C für 1 min inkubiert. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 μl Stopp-Puffer abgebrochen. Es wurde der Stopp-Puffer des Sequenzierkits (2.3.7.1) benutzt, dem Xylencyanol in einer Endkonzentration von 0,2% zugesetzt worden war. Zur Denaturierung wurden die Ansätze 2 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. 1,5 μl der Proben wurden auf ein Sequenziergel (2.3.7.3) aufgetragen.

2.3.7.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Sequenzierung

Die Sequenziergel-Lösung (4,6%ige Gel-Lösung: 21 g Harnstoff; 5 ml 10 x TBE (s.u.); 0,5 ml DMSO; 5,6 ml Rapid Gel XL (USB, Bad Homburg); 30,5 ml H₂O) wurde stets frisch angesetzt und im Ultraschallbad 3 min entgast. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels wurden 350 μl 10% APS (frisch angesetzt) und 50 μl TEMED zu der Gel-Lösung gegeben, die dann durch einen Sterilfilter luftblasenfrei zwischen zwei gründlich mit Wasser und Ethanol gereinigte Glasplatten appliziert wurde.

Die Polymerisation des Acrylamids war in 1 h abgeschlossen, so dass das Gel in die Kammer eingespannt werden konnte. Nach einem 45-minütigen Vorlauf wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde μN bei 45 °C mit 2200 V, 40 mA und 45 W durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TBE (10 x TBE: 1,34 M Tris Base; 0,45 M Borsäure; 25 mM EDTA; pH 8,3-8,7 (bei 50°C)). Die Leseweiten betragen zwischen 600 und 1100 Bp.

2.3.8 Synthese gewebespezifischer cDNA aus Rattengewebe und Odora-Zellen

Für den Nachweis von Genen in unterschiedlichen Geweben der Ratte mittels RT-PCR wurde cDNA hergestellt. Diese wurde durch reverse Transkription aus poly(A)⁺-RNA synthetisiert, die affinitätschromatographisch aus gewebsspezifischer Gesamt-RNA gereinigt wurde.

cDNA aus olfaktorischem Epithel wurde mir freundlicherweise von Dr. W. Bönigk, cDNA aus Hippokampus von Dr. A. Köngeter und cDNA der Ratten-Riechneuronzelllinie Odora von Frau A. Brühl (alle: IBI-1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

2.3.8.1 Herstellung von Erststrang-cDNA aus Ratten-Spinalganglien

Für die RNA-Isolierung aus Spinalganglien wurden ca. 100 Ganglien aus fünf Wochen alten Wistar-Ratten präpariert. Das Gewebe wurde in 2 ml TRIzol® (Gibco BRL) ca. 5 min bei RT mit einem elektrischen Homogenisator homogenisiert, mit 400 µl Chloroform gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (12.000 UpM; 4°C ; 15 min) wurde die RNA, die in der oberen, wässrigen Phase enthalten war, mit 1 ml Isopropanol präzipitiert und pelletiert (12.000 UpM; 4 °C ; 10 min). Das RNA-Pellet wurde zunächst in 5 ml 75%igem Ethanol gewaschen, dann in 500 µl reinem Ethanol, getrocknet und in 200 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Nach Konzentrationsbestimmung wurde die RNA-Lösung mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Umschreibung der RNA in Erststrang-cDNA mit Oligo-dT-Primern wurde 1 µg RNA eingesetzt. Dazu wurde die in RNase-freiem Wasser resuspendierte RNA mit 50 ng Q_T-Primer zunächst 10 min bei 68°C denaturiert und danach 2 h bei 42°C mit 25 µl Reverse Transkriptase-Mix (1 µl (400U) Reverse-Transkriptase (SuperScript™ II RNase H Reverse Transkriptase, Gibco BRL); 5 µl 0,1 M DTT; 2,5 µl 10 x RT-Puffer; 2,5 µl 10 mM dNTPs; 6,5 µl H₂O) inkubiert. Die Qualität der entstandenen cDNA wurde auf einem 0,75%igen Agarosegel überprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

2.3.8.2 Herstellung von Erststrang-cDNA aus Nieren-spezifischer RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Ratten-Nieren wurde mit Hilfe des Invitrogen Fast Track 2.0 - Kit durchgeführt.

Drei Ratten-Nieren (insgesamt ca. 4,3 g) wurden in 64 ml "Stock Buffer", der mit 1,28 ml "RNA Protein Degradier" versetzt worden war, mit einem elektrischen Homogenisator auf Eis homogenisiert und danach 1 h lang bei 45°C inkubiert. Nach Zentrifugation (4.000 x g; RT; 5 min) wurde der Überstand drei- bis viermal durch eine sterile Plastik-Spritze mit 20 G-Nadel aufgezogen, um genomische DNA zu scheren. Die Anreicherung polyadenylierter RNA erfolgte affinitätschromatographisch nach den Angaben des Herstellers (OligotexTM, Quiagen, Hilden). Die poly(A)⁺-RNA wurde mit Ethanol gefällt und bei -20°C gelagert. Die Umschreibung von poly(A)⁺-RNA in cDNA erfolgte für 2 h bei 37 °C . Es wurden Oligo-dT-Primer verwendet, die mit 2,5 µg poly(A)⁺-RNA zunächst 10 min bei 70°C vorinkubiert wurden. Der 50 µl Reaktionsansatz für die cDNA-Erstrangsynthese enthielt 10 µl cDNA-Synthese-Puffer (5x), 2,5 µl dNTPs (10 mM), 5 µl Dithiothreitol (DTT, 0,1 M), 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) und RNase-freies Wasser. Der Erfolg der Reaktion wurde auf einem 0,75%igen Agarosegel überprüft.

2.4 Zellkultur eukaryotischer Zellen

2.4.1 Verwendete Zelllinien

Für die heterologe Expression von cDNA-Konstrukten wurden folgende Zelllinien verwendet: HEK 293-Zellen sind menschliche, embryonale Nierenzellen (*human embryonal kidney*, Klon 293), die stabil mit einem Adenovirus transformiert sind.

tsA201-Zellen sind HEK293-Zellen, die zusätzlich das große T-Antigen des Rous-Sarcoma Virus (RSV) stabil in ihr Genom integriert haben. Diese Zelllinie wurde von Prof. C. Fahlke (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.

Neuro2a-Zellen (ATCC, Manassas, USA) stammen von einem murinen Neuroblastom.

SK-N-SH-Zellen (ATCC) sind menschliche Neuroblastom-Epithelzellen.

Odora ist eine Zelllinie immortalisierter Riechzellen (Murell und Hunter, 1999). Sie wurde uns freundlicherweise von D. Hunter zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Kulturbedingungen der Zelllinien

HEK 293, Neuro2a- und tsA-Zellen wurden in dem Nährmedium M10 kultiviert. M10 wird aus "Minimal Essential Medium" (MEM + GlutaMAX I, Life Technologies, Karlsruhe) hergestellt, das mit 10% fötalem Kälberserum (Life Technologies), 10 ml/l Antibiotika / Antimykotika-Lösung (100x, Life Technologies) sowie 10 ml/l nichtessenziellen Aminosäuren (100x, Life Technologies) angereichert wurde. SK-N-SH-Zellen wurden in DH10 kultiviert, das aus "Dulbecco's modified Eagles medium with 4,5g/l glucose", 10% fötalem Kälberserum, 10 ml/l Antibiotika/Antimykotika-Lösung und 10 ml/l L-Glutamin hergestellt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit auf Petrischalen mit 9 cm Durchmesser ("9-cm-Schale") kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Die Generationszeit der Zellen betrug etwa einen Tag (Teilungsraten: HEK293 und tsA201: 24 h; Neuro2a: 27 h; SK-N-SH: 28 h). Bei einer Dichte von 1 x 10⁷ Zellen/9-cm-Schale wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3-5 ml PBS (8g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na₂HPO₄; 0,2 g/l KH₂PO₄) gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA (PBS mit 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA; Life Technologies) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 9 ml M10 resuspendiert, in ein Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert (200 x g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 10 ml M10 resuspendiert und die Anzahl der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Zellerhaltung wurden 6-12 x 10⁵ Zellen auf 9-cm-Schalen ausgesät. Für transiente Transfektionen wurden 2-3x 10⁵ Zellen auf 5-cm-Schalen ausgesät.

Nach etwa 35 Splitting-Runden wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat vorbereitet. Für die Langzeitlagerung wurden Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60-70% Konfluenz) befanden, und zu 2 x 10⁶ Zellen/ml M10 (10% DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Aussäen der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt: sie wurden schnell bei 37°C aufgetaut und vorsichtig zu 10 ml M10 (vorgewärmt) pipettiert. Die Zellen wurden dann pelletiert (200 x g; 5 min; RT), in 3-5 ml M10 resuspendiert und zu 5 x 10⁵ Zellen auf 9-cm-Schalen ausgesät.

Odora-Zellen wurden in DMEM, das mit 10% fötalem Kälberserum (Life Technologies), 10 ml/l Antibiotika/Antimykotika-Lösung (100x, Life Technologies) sowie 10 ml/l nichtessenziellen Aminosäuren (100x, Life Technologies) angereichert wurde. Die Zellen wurden bei 35°C

und 5% CO₂ kultiviert und alle zwei bis drei Tage mit frischem Medium versorgt. Zweimal pro Woche wurden etwa 1/10 der Zellen auf eine frische 9-cm-Schale zur Erhaltung ausgesät.

2.4.3 Transiente Transfektion

Für Transfektionen in eukaryotische Zelllinien wurde die cDNA in den Plasmidvektor pcDNA 3.1 Amp (2.2.1) kloniert. Die Transfektion wurde nach der CaPO₄-Methode (Chen und Okayama, 1987) durchgeführt. Als Kontrolle wurde pcDNA 3.1 Amp ohne cDNA-Insertion oder ohne Zugabe von Plasmid-DNA transfiziert ("Mock-Transfektion"). Für immunzytochemische Untersuchungen wurden 2 x 10⁵ Zellen und für Zellpräparationen 4 x 10⁵ Zellen auf 5-cm-Schalen ausgesät.

Da die Transfektionsrate der Zellen von der Menge der eingesetzten DNA abhängig ist, wurden zunächst verschiedene Mengen (1-15 µg) eines Konstrukts zur Transfektion verwendet und die Transfektionsrate immunzytochemisch bestimmt. Die DNA-Menge, die jeweils die höchste Transfektionseffizienz erzielte, wurde dann für nachfolgende Transfektionen eingesetzt.

Für die Transfektion einer 5-cm-Schale wurde die optimale Menge der jeweiligen DNA mit Wasser auf 124 µl aufgefüllt. Zur DNA-Lösung wurden langsam 41 µl 1 M CaCl₂ pipettiert und der Ansatz vorsichtig durchmischt. Nach Zugabe von 165 µl 2x BBS (50 mM BES pH 6,95; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄) wurde der Ansatz 20 min bei RT inkubiert, bevor er tropfenweise zu der 5-cm-Schale gegeben und durch Schütteln der Schale gleichmäßig verteilt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 20-22 h bei 35°C, 3% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit (bei SK-N-SH-Zellen: 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) wurde das Kalziumphosphat DNA-Präzipitat durch Waschen mit 5 ml PBS und mit PBS/EDTA (2g EDTA/1 PBS, pH 7,3) entfernt. Die Zellen, die für Zellpräparationen vorgesehen waren, wurden anschließend mit 5 ml M10-Medium 20-22 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zellen für immunzytochemische Untersuchungen wurden nach Waschen mit PBS/EDTA mit 500 µl Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin, 0,2% EDTA) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 2,5 ml M10-Medium resuspendiert und jeweils 300 µl der Zellsuspension auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, Sigma) beschichtete Glasplättchen in Multiwell-Platten pipettiert und mit 100

μ l M10-Medium überschichtet. Die Zellen wurden 20-22 h bei 37°C , 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Steigerung der Expressionseffizienz wurden die Zellen teilweise nach dem Umsetzen in M10-Medium mit 5 mM Butyrat inkubiert.

2.5 Antikörper und Nachweis der Antikörperfärbungen

2.5.1 Erstantikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörper wurden bei den Firmen Alpha Diagnostics International (San Antonio, USA), Santa-Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA), Davids Biotechnologie (Regensburg) und Eurogentec (Seraing, Belgien) bestellt. Der monoklonale Maus-Antikörper gegen die A2-Untereinheit des zyklisch Nukleotid-gesteuerten (*cyclic nucleotide-gated*, CNG-) Kanals mit der Bezeichnung "3B10" stammt von Dr. E. Krenmer, Institut für molekulare Immunologie, GSF München. Die Herstellung der polyklonalen, rCLCA1-spezifischen Antikörper wurde bei den Firmen Davids und Eurogentec in Auftrag gegeben. Die Antikörperseren wurden zum Teil aufgereinigt geliefert.

2.5.1.1 Reinigung polyklonaler Erstantikörper durch Affinitätschromatographie

Polyklonale Antikörper wurden affinitätschromatographisch aus den Seren immunisierter Kaninchen in Anlehnung an Campbell et al. (Campbell et al., 1951) gereinigt. Die Reinigung erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden die Immunglobuline angereichert, indem das Serum über eine Protein A/G-Säule gegeben wurde. Danach wurden die spezifischen Antikörper durch eine Affinitätschromatographie aus der Immunglobulinfraction isoliert. Im letzten Schritt wurden die gereinigten spezifischen Antikörper in einer "CentriCon 30-Säule" konzentriert, um eine längere Lagerung möglich zu machen.

Zur Anreicherung der Immunglobuline aus dem Serum wurde eine "Protein A/G-Ultra-LinkTM-Säule" (Pierce) verwendet. Dazu wurden 2,5-5 ml Serum mit dem gleichen Volumen 20 mM Phosphatpuffer pH 8,0 verdünnt und dreimal über die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Unspezifisch gebundene Bestandteile des Serums wurden mit dem zehnfachen Säulenvolumen 20 mM Phosphatpuffer pH 8,0 von der Säule gewaschen. Die gebundenen Immunglobuline wurden mit dem fünffachen Säulenvolumen an 100 mM Glycin

pH 2,5 eluiert. Zum Schutz der Immunglobuline wurde die Elutionsfraktion direkt in BSA (Endkonzentration: 0,2%) aufgefangen und mit 1 M Tris/HCl pH 8,8 auf neutralen pH eingestellt.

Für die Affinitätsreinigung der spezifischen Antikörper über eine Sepharose-Säulenmatrix wurden die zur Immunisierung der Kaninchen verwendeten Peptide (Antigene) nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) an aktivierte "Thiol-Sepharose 4B" gekoppelt (äquimolares Verhältnis zwischen Cysteingruppen der Peptide und aktivierten Thiolgruppen der Säulenmatrix). Der Reaktionsansatz wurde in Minichromatographiesäulen (Biorad) pipettiert und mit dem zehnfachen Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 äquilibriert. Anschließend wurden die angereicherten Immunglobuline dreimal über die Säule gegeben. In zwei Waschschrritten mit je zehn Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 sowie 10 mM Tris/HCl pH 7,5/0,5 M NaCl wurden Antikörper entfernt, die nicht gegen das Antigen gerichtet waren. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem zehnfachen Säulenvolumen 100 mM Glycin pH 2,5. Auch nach diesem Reinigungsschritt wurden die Antikörper in 0,2% BSA aufgefangen und mit 1 M Tris/HCl pH 8,8 auf neutralen pH eingestellt. Die Konzentrierung der gereinigten Antikörper erfolgte über eine "CentriCon 30-Säule" (Amicon) nach Angaben des Herstellers. Die Antikörper wurden in PBS mit 50% Glycerin und 0,05% NaN₃ bei -20°C gelagert.

2.5.2 Zweitantikörper

Für immunzytochemische und immunhistochemische Versuche wurden vor allem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Zweitantikörper verwendet. Für immunzytochemische Versuche (2.6.1) mit Diaminobenzidin (DAB)-Färbung und für den Nachweis immobilisierter Proteine auf Westernblot-Membranen (2.6.8) wurden Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horse radish peroxidase*) gekoppelte Zweitantikörper (anti-ms und anti-rb: Amersham; anti-ch: Promega) verwendet. Sie wurden für die Immunzytochemie 1:250, für Westernblots 1:5000 verdünnt eingesetzt. Bei Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern entsteht im Gegensatz zu einer DAB-Färbung kein Farbniederschlag, der sich nach kurzer Zeit über die Zelle verteilt. Durch die spezifische Antigen-Erstantikörper-Zweitantikörper-Komplexbildung dagegen zeigt sich das Fluoreszenzsignal nur an den Stellen der Zelle, an denen sich tatsächlich

das Antigen befindet.

2.5.2.1 Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper

Es wurden folgende Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper verwendet:

Tabelle 2.1: Eigenschaften und verwendete Verdünnungen der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper

Bezeichnung	Absorption _{max} [nm]	Verdünnung	Hersteller
gt- α -rb-Alexa488	488	1:500	Molecular Probes
dk- α -ms-Alexa568	568	1:500	Molecular Probes
gt- α -ch-DTAF488	488	1:100	Dianova

Die Abkürzungen bedeuten: gt = *goat* (in Ziege hergestellt); dk = *donkey* (in Esel hergestellt); α = anti-; gerichtet gegen Erstantikörper aus: rb = *rabbit* (Kaninchen); ms = *mouse* (Maus); ch = *chicken yolk* (Hühnereigelb).

2.5.3 Nachweis der Proteinexpression transient transfizierter Zellen durch Immunzytochemie

2.5.3.1 Immunzytischer Antigen-Nachweis in transfizierten Zellen

Transient transfizierte Zellen, die mit Antikörpern gefärbt werden sollten, wurden nach der Transfektion auf Glasplättchen umgesetzt (2.4.3). Die Zellen wurden am 2. Tag nach der Transfektion mit PBS gewaschen und 10 min mit 4% Paraformaldehyd (PA) in PBS auf den Glasplättchen fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und entweder sofort gefärbt oder in PBS/0,05% NaN₃ bei 4°C bis zur Färbung gelagert.

Die Färbung der fixierten Zellen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen in einer Lösung aus 5% Chemiblocker (Chemicon), einem pflanzlichen Serum, vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (Erstantikörper) inkubiert. Im dritten Schritt erfolgte der Nachweis des spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes mit einem sekundären Antikörper (Zweitantikörper). Die Inkubationsschritte wurden 30-60 min bei RT durchgeführt (s.u.). Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen zweimal für

je 10 min bei RT gewaschen. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Die spezifischen Antigen-Erstantikörper-Zweitantikörper-Komplexe wurden entweder über die kovalent gekoppelte Meerrettich-Peroxidase des 2. Antikörpers detektiert (DAB-Färbung) oder über das an den Zweitantikörper gekoppelte Fluorophor. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,05% Diaminobenzidin (DAB)/0,01% H₂O₂ in PBS gestartet und nach 1-15 min durch PBS gestoppt. Die Zellen wurden mit Aqua/Polymount (Polysciences) eingedeckt und unter einem Phasenkontrast-Mikroskop (DAB-Färbungen) oder am konfokalen Mikroskop (Fluoreszenz-Färbungen) analysiert.

Tabelle 2.2: Arbeitsschritte für die permeabilisierende immunzytochemische Färbung transfizierter Zellen

Arbeitsschritt	Inkubationszeit	Inkubationslösung
Erstantikörper-Inkubation	60 min	Erstantikörper in PBS
Präinkubation	30 min	CT
Waschen	2 x 10 min	PBS
Erstantikörper-Inkubation	1 h	Erstantikörper in CTA
Waschen	2 x 10 min	PBS
Zweitantikörper-Inkubation	30 min	Zweitantikörper in 5% C
Waschen	2 x 10 min	PBS

2.5.3.2 Unterscheidung extra- und intrazellulär gelegener Proteinepitope

Um zu unterscheiden, ob ein Antikörper intra- oder extrazellulär gelegene Proteinepitope erkennt, wurden Färbungen parallel mit denselben Antikörpern in Inkubationslösungen mit und ohne Triton X-100 durchgeführt. Da Triton X-100 die zytoplasmatische Seite für Antikörper zugänglich macht, sollten bei Inkubation ohne Triton X-100 extrazelluläre Proteindomänen erkannt werden. Zudem wird bei Färbung nicht-permeabilisierter Zellen die Fixierung mit 4% PA erst nach der Erstantikörper-Inkubation durchgeführt, da auch Paraformaldehyd die Zellmembran für Antikörper permeabilisiert. Die Färbung nicht-permeabilisierter Zellen wurde ausschließlich mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern durch-

geführt. Das Protokoll für die Färbung nicht-permeabilisierter Zellen ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 2.3: Arbeitsschritte für die nicht-permeabilisierende immunzytochemische Färbung transfizierter Zellen.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit	Inkubationslösung
Erstantikörper-Inkubation	60 min	Erstantikörper in PBS
Waschen	2 x 10 min	PBS
Fixieren	5-10 min	4% PA/PBS
Waschen	2 x 10 min	PBS
Zweitantikörper-Inkubation	30 min	Zweitantikörper in PBS
Waschen	2 x 10 min	PBS

2.6 Präparation, Auftrennung und spezifischer Nachweis von Membranproteinen

2.6.1 Präparation von Membranproteinen aus transfizierten Zellen

Für Westernblot-Analysen wurden Membranproteine aus transfizierten Zellen isoliert. Die Zellen wurden am zweiten Tag nach der Transfektion zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einem Gummispatel in 1 ml PBS/5-cm-Schale abgeschabt. Die Zellen wurden pelletiert (2.000 UpM; 5 min; RT), in 200 μ l Puffer A⁺ (10 mM NaCl; 2 mM EDTA; 25 mM HEPES pH 7,5; 1:500 verd. mPIC (*mammalian protease inhibitor cocktail*, Sigma)) mit einem Handhomogenisator homogenisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Zell-Lysat zentrifugiert (15.300 UpM, 30 min, 4°C) und der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, abgenommen. Das Zellpellet wurde in je 30 μ l Puffer B⁺ aufgenommen, mit dem gleichen Volumen einer 2%igen (w/v) CHAPS-Lösung versetzt. Die Membranproteine wurden 10 min auf Eis solubilisiert und im folgenden Zentrifugationsschritt (10.100 UpM, 10 min, 4°C) von den unlöslichen Proteinen (entstehendes Pellet) getrennt.

2.6.2 Präparation von Membranproteinen aus nativem Gewebe

Membranproteine aus 1 g nativem Gewebe wurden in 3 ml Puffer A⁺ (hypotonisch; 20 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 1:500-verd. mPIC) mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators rasch auf Eis homogenisiert. Die Suspension wurde insgesamt dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Zellreste und Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt (200 x g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in 3 ml Puffer A⁺ resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit dem Überstand aus der vorhergehenden Zentrifugation vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden in einer Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert (TLA45-Rotor; 45.000 UpM; 15 min; 4°C). Das Pellet (Membranfraktion) wurde zum hypertonischen Waschen in 3 ml Puffer B⁺ (hypertonisch; wie Puffer A, jedoch 500 mM NaCl) resuspendiert, pelletiert und in 450 µl Puffer C⁺ (isotonisch; wie Puffer A, jedoch 500 mM NaCl) aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Protein-Konzentration wurde mit der Amidoschwarz-Methode (2.6.4) bestimmt. Die Ausbeuten betragen zwischen 5 und 20 mg Protein pro g eingesetztem Gewebe.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz

Die Konzentration von Proteinlösungen, die Detergenzien oder Lipide enthalten, wurden mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Es wurde der Amidoschwarz 10B-Farbstoff von Merck (Darmstadt) verwendet. Die Protein-Probe wurde mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt und mit 20 µl 10% SDS versetzt, um Proteine zu denaturieren. Danach wurden 30 µl 1% SDS/1 M Tris/HCl pH 7,5 zugegeben. Nach dem Mischen wurden 60 µl 104% (w/v) TCA zur Fällung der Proteine hinzugegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Die Proben wurden 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Porendurchmesser: 45 µm; Millipore, Eschborn) aufgetragen. Die Filter wurden mit 3 ml 6% TCA gewaschen und für 5 min in Färbelösung (0,5% Amidoschwarz B10; 45% Methanol; 10% Essigsäure) gefärbt. Danach wurden die Filter kurz mit H₂O gespült und mehrmals in Entfärber (90% Methanol/2% Essigsäure) gewaschen, bis der Hintergrund auf dem Filter wieder weiß war. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einem auf denselben

Filter aufgetragenen BSA-Standard (1-5 μg BSA) abgeschätzt.

2.6.4 Deglykosylierung von Proteinen

Die Deglykosylierung von Membranproteinen erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Proteine in 0,5% SDS/1% β -Mercaptoethanol für 10 min. bei RT denaturiert. Danach erfolgte die eigentliche Deglykosylierung in 50 mM PBS/1% Nonidet P-40. Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C mit 500 U der Peptid/N-Glykosidase F (PNGase F; NEB) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Reaktionsansatz ohne Enzym inkubiert.

2.6.5 Auftrennung von Proteinen durch denaturierende Gel-Elektrophorese

2.6.5.1 Protein-Größenstandard

Als Größenstandards bei der SDS-PAGE dienen die Proteine des “Low Molecular Weight Calibration Kit“(LMW-Größenstandard) und des “High Molecular Weight Calibration Kit“(HMW-Größenstandard) von Amersham Pharmacia Biotech.

Tabelle 2.4: Größenstandards für die Proteingel-Elektrophorese.

LMW-Größenstandard		HMW-Größenstandard	
Molekulargewicht (kDa)	Protein	Molekulargewicht (kDa)	Protein
97	Phosphorylase b	212	Myosin
64	Albumin	170	α_2 -Makroglobulin
45	Ovalbumin	116	β -Galaktosidase
30	Carbonanhydrase	76	Transferrin
20,1	Trypsin-Inhibitor	53	Glutamat-Dehydrogenase
14,4	α -Lactalbumin		

2.6.5.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach Laemmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in ei-

ner Minigel TwinKammer (Biometra; Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) durchgeführt. Es wurden 7,5-15%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer (Stocklösung: 4x SDS-Probenpuffer: 8% SDS; 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 50% (v/v) Glycerin; 4% (w/v) β -Mercaptoethanol; 0,04% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die elektrophoretische Trennung im Biometra-System erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 25 mA im Trenngel in 1x SDS-Laufpuffer (10x Stocklösung: 50 mM Tris; 1% (w/v) SDS; 1,92 M Glycin) und dauerte ca. 90 min.

2.6.5.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das Färben von SDS-Polyacrylamidgelen wurde in Anlehnung an Meyer und Lamberts, 1965 durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für 1-2 h oder ∞ in Färbelösung (0,2% (w/v) SERVA Blue R; 30% (v/v) Ethanol (vergällt); 10% (v/v) Essigsäure) gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung (30% (v/v) vergällter Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure) gelegt und auf Whatman-Papier im Vakuum bei 45°C getrocknet.

2.6.6 Transfer und Immobilisierung von Proteinen (“Westernblot“)

Die Proteine wurden in von SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (2.6.6.2) und in Anlehnung an Towbin et al. (Towbin et al., 1979) auf PVDF-Membranen (“Immobilon P“; Millipore; Eschborn) transferiert. Der Transfer (“Westernblot“) wurde in einem “Milliblot-Graphit Elektrobplot“-System (Millipore; Eschborn) im Halbtrockenverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transferzeit betrug 30 min bei 250 mA/800 cm² Gelfläche. Ein erfolgreicher Transfer wurde durch reversible Färbung mit 0,2% (w/v) Ponceau S (Sigma) in 2% (v/v) Essigsäure überprüft.

2.6.7 Immunologischer Protein-Nachweis auf Westernblot-Membranen

Der immunologische Nachweis immobilisierter Proteine erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Erstantikörper) inkubiert. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex wurde dann mit einem sekundären Antikörper (Zweitant-

tikörper) nachgewiesen, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden entweder 30-60 min bei RT oder bei 4°C üN durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran in PBS/0,05% (w/v) Tween-20 (PBT) gewaschen (je 5-10 min, RT). Alle Inkubations- und Waschschrirte erfolgten unter Schütteln auf einem ‘‘Taumler‘‘. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Die spezifischen Antigen/Erstantikörper/Zweitantikörper- Komplexe wurden mit dem ‘‘ECL Westernblot Detection Kit‘‘(Amersham Pharmacia Biotech) oder mit ‘‘SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate‘‘(Pierce) nach Herstellerangaben detektiert.

Tabelle 2.5: Arbeitsschritte für den Nachweis von immobilisierten Antigenen auf Westernblot-Membranen.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder üN (4°C)	Blockierungslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBT
Erstantikörper- Inkubation	1-4 h (RT)	Erstantikörper- Inkubationslsg. ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBT
Zweitantikörper -Inkubation	30 min (RT)	Zweitantikörper- Inkubationslsg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 5 min (RT)	PBT
Waschen	1 x 5 min (RT)	PBS

⁽¹⁾ PBT; 1-5% (w/v) Milchpulver

⁽²⁾ 1. Antikörper in PBT; 0,005% (w/v) NaN₃

⁽³⁾ 2. Antikörper in PBT; 0,1% (w/v) Milchpulver

2.7 Immunhistochemie an Ratten-Gewebeschnitten

2.7.1 Herstellung und Vorbereitung von Rattengewebe für Kryoschnitte

Um Kryoschnitte anzufertigen, wurden Spinalganglien sowie ganze Nasen aus Ratten (Wistar) präpariert. Das Alter der Tiere betrug zwischen zwei Wochen für die Nasenpräparation und bis zu sechs Wochen für die Spinalganglienpräparation. Die Gewebe wurden kryoprotectiert, eingefroren, an einem Kryomikrotom (Frigocut 2800-E, Reichert-Jung) 15-25 μm dünn geschnitten und auf gelatinisierte Objektträger aufgenommen. Die Gewebeschnitte wurden mindestens 20 min bei RT getrocknet und entweder direkt für immunzytochemische Versuche verwendet oder bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.1.1 Spinalganglien-Präparation

Die Präparation der Ratten-Spinalganglien wurde bereits ausführlich beschrieben (Putzier, 2000). Die Spinalganglien drei bis sechs Wochen alter Wistar-Ratten wurden nach Präparation 1 h in 4% (w/v) PA/PBS fixiert und danach 2 x 10 min in 1x PBS gewaschen. Zum Schutz vor Schäden beim Einfrieren wurde das Gewebe 3 h in 10% Saccharoselösung (PBS; 10% (w/v) Saccharose; 0,005% (w/v) NaN_3) inkubiert, bis es in der Lösung abgesunken war. Die Präparate wurden danach üN bei 4°C in 30%iger Saccharoselösung inkubiert. Das Gewebe wurde bei -20°C in Einbettmedium (Tissue-Tek, Organic Compound) eingefroren und entweder direkt zum Schneiden aufgeblickt oder bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die 15-25 μm dicken Schnitte wurden auf gelatinisierten Objektträgern (Super Frost, Menzel) aufgenommen. Zum Gelatinisieren wurden die Objektträger in Ethanol entfettet, in Wasser gespült und dann in die Gelatinelösung (1 g Gelatine in Wasser unter Rühren bei 40°C gelöst) getaucht. Die so behandelten Objektträger wurden gut abgetropft und bei 60°C getrocknet.

2.7.1.2 Präparation der Nase

Drei Wochen alte Wistar-Ratten wurden mit Isofluran narkotisiert und dekapitiert. Der vordere Teil des Schädels mit dem Riechepithel wurde freipräpariert und 1 h in 4% PA/PBS inkubiert. Während der Fixierung wurde der Schädel in einen Exsiccator gestellt, der meh-

rere Male evakuiert wurde, bis die Luft vollständig aus der Nasenhöhle entfernt war. Das Gewebe wurde 3 x 10 min in 1 x PBS gewaschen und danach wie in 2.7.1.1 beschrieben kryoprotectiert, eingebettet und eingefroren. In einem Kryotom wurden 20-30 μm dicke Koronalschnitte angefertigt und auf gelatinisierten Objektträgern aufgenommen. Zur Qualitätsprüfung wurden die Schnitte mit einer Nisselfärbung, Richardson-Blau (0,05% (w/v) Azur 2; 0,05% (w/v) Methylblau (in 0,05% (w/v) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)), angefärbt. Dazu wurden die gut angetrockneten Gewebeschnitte 1 min mit 4% (w/v) PA fixiert, 2 x kurz mit 1x PBS gewaschen und für etwa 10 s mit Richardson-Blau inkubiert. Die Färbelösung wurde mit 1 x PBS entfernt, die Schnitte mit einem Deckglas geschützt und an einem Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet.

2.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten

Um ein Protein im Gewebe zu lokalisieren, wurden Kryoschnitte mit entsprechenden Erstantikörpern inkubiert. Dazu wurden die Schnitte zunächst 5 min mit 4% (w/v) PA postfixiert und 2 x 10 min in 1x PBS gewaschen. Danach wurden durch 30-minütige Inkubation mit CT (5% (v/v) Chemiblocker/0,05% (w/v) Triton X-100) unspezifische Bindestellen abgesättigt und der Schnitt für die Antikörper permeabilisiert. Die Inkubation mit den Erstantikörpern erfolgte üN bei RT in CTA (CT mit 0,005% NaN_3) in einer feuchten, fest verschlossenen Kammer. Die Schnitte wurden danach 2 x 10 min in 1 x PBS gewaschen und dann 90 min mit dem in 5% (v/v) C verdünnten Zweitantikörper inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 2 x 10 min mit 1 x PBS gewaschen, in Aqua/Polymount (Polysciences) eingedeckelt, getrocknet und an einem konfokalen Mikroskop ausgewertet.

2.7.3 Konfokale Mikroskopie

Immunhistochemische und -zytochemische Versuche wurden an einem inversen, konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS SP, Leica) ausgewertet. Der Laser des Mikroskops war ein Ar/Kr-Laser, der drei Spektrallinien emittiert (488, 568, 647 nm). Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde mit verstellbaren Bandpassfiltern einem Photomultiplier zugeführt und zu einem digitalen Bild verarbeitet. Durch das konfokale Prinzip gewinnt man Bilder aus sehr dünnen Gewebeschnittebenen, die kaum durch Fluoreszenzlicht anderer Objektebenen

gestört werden. Durch Überlagerung mehrerer Schnittebenen eines Präparates im Computer konnte ein räumlicher Eindruck des untersuchten Gewebes erzeugt werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Durchlichtaufnahmen wurden ebenfalls mit dem konfokalen Mikroskop und einer differentiellen Interferenz-Kontrastoptik (DIC oder Nomarski-Optik) digital aus einer einzelnen Bildebene erzeugt. Zum Teil werden computergenerierte Überlagerungen aus Fluoreszenzbild und Durchlichtbild gezeigt.

2.8 Zwei-Photonen Fluoreszenz Lifetime Imaging (TP-FLIM)

2.8.1 Das Prinzip des Zwei-Photonen Fluoreszenz Lifetime Imaging

In dieser Arbeit wurde die $[Cl^-]_i$ in Zellen und Geweben durch Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebenszeit Imaging (*two-photon-fluorescence lifetime imaging*, TP-FLIM) bestimmt. Bei dieser Methode wird über die Fluoreszenzdauer eines angeregten, Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs die $[Cl^-]_i$ gemessen. Im Folgenden wird das Prinzip der Zwei-Photonen-Anregung und der Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung erklärt.

2.8.1.1 Zwei-Photonen-Anregung

Die Absorption eines Photons bewirkt, dass ein schwach gebundenes Elektron des absorbierenden Moleküls transient auf ein freies, energiereicheres Orbital (meist S_1) transferiert wird. Nach ca. 10 ns fällt das Elektron wieder in seinen Grundzustand zurück, was radiativ (Emission eines Fluoreszenzphotons) oder nicht-radiativ (Abgabe von Wärme) mit jeweils einer gewissen Rate k (k_f oder k_{nr}) geschieht (Abb. 2.1 auf der nächsten Seite).

Neben Fluoreszenz und Wärmeabgabe kann das Molekül im angeregten Zustand auch photochemische Umwandlungen erfahren, beispielsweise den Übergang in einen Triplettzustand, die Bildung eines Radikals oder die Ausbildung einer stabilen chemischen Bindung zu einem benachbarten Atom oder Molekül. Diese Prozesse werden im Folgenden vernachlässigt, da sie für Fluorophore im Allgemeinen sehr unwahrscheinlich sind. Die Absorption eines Photons geschieht dann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit, wenn die Energie des Photons ($h \cdot c / \lambda$) mit dem Energieabstand eines schwach gebundenen Elektrons zu einem freien, energiereicheren Orbital übereinstimmt. Mit anderen Worten: Die Wellenlänge des einfallenden Lichts (λ)

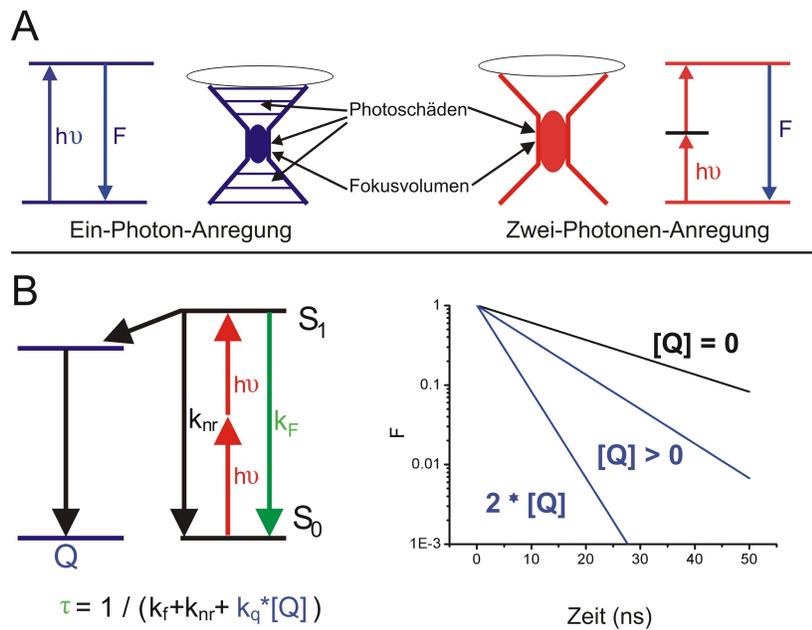


Abbildung 2.1: (A) Schematische Darstellung des Unterschieds zwischen Ein-Photon-Anregung (links) und Zwei-Photonen-Anregung (rechts) und Vergleich der Bereiche, in denen in der mikroskopischen Anwendung Schäden durch Licht an der Probe auftreten; (B) Molekulare Herkunft der Fluoreszenz-Lebenszeit τ in An- und Abwesenheit von physikalischem Quenching (links). Rechts: Einfluss der Quencher-Konzentration $[Q]$ auf die Lebenszeit τ .

sollte mit einem Maximum im (UV-vis) Absorptionsspektrum des Moleküls übereinstimmen. Die verfügbaren Cl⁻-sensitiven Farbstoffe haben Absorptionsmaxima zwischen 320 und 400 nm.

Trifft ein Photon der Wellenlänge 750 nm auf ein Molekül, so reicht die Energie nicht aus, um ein Elektron in ein höheres Orbital zu überführen. Es befindet sich dadurch vielmehr in einem "virtuell angeregten" Zustand, der ca. 10^{-16} s andauert. Absorbiert ein Molekül im "virtuell angeregten" Zustand in dieser Zeit ein weiteres 750 nm-Photon, so erhält das Elektron durch diese beiden Photonen insgesamt eine Energie, die der des einzelnen 375 nm-Photons entspricht. Das Elektron erreicht so den S₁-Zustand, der 1-100 ns (Fluoreszenz-Lebenszeit) andauert. Man spricht von Zwei-Photonen-Anregung. Dieser nicht-lineare optische Prozess (Piston, 1996) tritt nur bei extrem hoher zeitlicher und räumlicher Photonendichte auf, zum Beispiel bei Anregung durch einen fokussierten, gepulsten Laser. Die Ausdehnung des fokussierten Anregungslichts beträgt ca. $0,5 \mu\text{m}$ in x- und y-Richtung und $1,5 \mu\text{m}$ in z-Richtung.

Bei der Fluoreszenz-Messung an lebendem Gewebe oder lebenden Zellen hat die Zwei-Photonen-Anregung gegenüber der Anregung mit nur einem Photon der doppelten Energie entscheidende Vorteile: Es werden Schädigungen des Gewebes durch hochenergetisches Licht, das zur Anregung der für die Fluoreszenz-Mikroskopie verwendeten Farbstoffe benötigt wird, vermieden. Diese Farbstoffe absorbieren oft maximal im nahen UV, blauen und grünen Spektralbereich (z.B.: MQAE bei 350 nm). In diesem Spektralbereich absorbieren auch wichtige Proteine und Nukleinsäuren, die durch das Licht zerstört oder modifiziert werden können, was zu Zellschädigungen führt. Bei der Zwei-Photonen-Anregung des Farbstoffs werden zwei Photonen niedrigerer energetischen Lichts (750 nm) verwendet. In diesem Spektralbereich absorbieren Proteine und DNA kaum, so dass kein Photoschaden am Gewebe entsteht. Zwei-Photonen-Anregung kann zudem nur im Fokus des Anregungslichts stattfinden, also in einem stark begrenzten Volumen der Probe (im Femtoliter [fl]-Bereich). Dadurch werden Photoschäden des umliegenden Gewebes vermieden und die optische Auflösung durch die Vermeidung von Fluoreszenzlicht aus dem den Fokus umgebenden Gewebe verbessert. Ein weiteres Problem der Fluoreszenz-Mikroskopie ist der Umgang mit Lichtstreuung, die die räumliche Auflösung und Detektionseffizienz sowie die Penetrationstiefe des Lichts im Gewebe herabsetzt. Da die Lichtstreuung umgekehrt proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge (λ^{-4}) des verwendeten Lichts ist, ist Licht höherer Wellenlängen hier ebenfalls gegenüber dem kürzerwelligen Licht der konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie im Vorteil.

2.8.1.2 Fluoreszenz-Lebenszeit

Die Fluoreszenz-Lebenszeit eines Moleküls (hier eines Fluorophors) ist gleich dem Reziproken der Summe der beiden Ratenkonstanten der Deaktivierung ($\tau_0 = (k_{nr} + k_f)^{-1}$). Trifft der angeregte Fluorophor mit einem sogenannten Quencher (bei MQAE z.B. ein freies Chloridion) zusammen, bildet sich ein transienter Komplex aus Quencher und Fluorophor, der einen viel höheren k_{nr} -Wert besitzen kann, was somit zu einer stark verringerten Fluoreszenz führt ($\tau = (k_f + k_{nr} + k_q[Q])^{-1}$). Je höher die Konzentration des Quencher-Moleküls $[Q]$, desto geringer ist sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenz-Lebenszeit τ . Kennt man die Lebenszeit des Fluorophors in Abwesenheit des Quencher-Moleküls (τ_0), lässt sich $k_q \cdot [Q]$ leicht berechnen. Die Konzentration des Quenchers kann ausgerechnet werden, wenn k_q bekannt ist und ein Fluorophor verwendet wird, das für das Quencher-Molekül hochspezifisch

ist.

2.8.1.3 TP-FLIM Messung der freien Chloridkonzentration

Die Fluoreszenz-Lebenszeit eines Moleküls wird durch die Fluoreszenz-Abklingkurve (*“fluorescence-decay curve“*) bestimmt. Die Fluoreszenz-Abklingkurve stellt keine Echtzeitaufnahme dar, da die Detektoren des Messsystems die Geschwindigkeit dieses Prozesses nicht erfassen können. Deswegen werden sehr viele, schnell aufeinanderfolgende Anregungszyklen für die Erstellung einer Fluoreszenz-Abklingkurve verwendet (*“time-correlated single-photon-counting“*, TCSPC).

Die Daten für eine Fluoreszenz-Abklingkurve werden durch einen speziellen Start-Stoppmechanismus der Messapparatur erfasst. Jeder Lichtpuls aus der Anregungsquelle gibt einen elektrischen Startpuls, indem ein kleiner Teil des Lichts zu einer Photodiode geleitet und dadurch eine *“elektronische Stoppuhr“* gestartet wird. Der durch den Lichtpuls angeregte Fluorophor sendet Fluoreszenz-Photonen aus, die durch das Mikroskop gesammelt werden und von einem schnellen Photomultiplier (PMT 1, s. Abb. 2.2 auf der gegenüberliegenden Seite) erfasst werden. Erreicht das erste Photon PMT 1, wird die elektronische Stoppuhr angehalten. Die Zeit, die zwischen Start- und Stoppsignal vergangen ist, entspricht der Lebenszeit eines Elektrons und wird als Punkt in einem Histogramm eingetragen. Die Zeitachse wird dabei in 256 Kanäle eingeteilt, wobei ein Kanal ca. 60 ps repräsentiert. Mehrere Zehntausende bis Millionen Messungen dieser Art ergeben die Fluoreszenz-Abklingkurve.

Für jedes Pixel des ausgewerteten Bildes (128x128) wurden die Gesamtfluoreszenz-Intensität und die Fluoreszenz-Abklingkurve bestimmt. Die Fluoreszenz-Abklingkurve konnte mit einer monoexponentiellen Funktion ausgewertet werden. Pro aufgenommenes Bild wurden die Ereignisse 1-3 min lang akkumuliert, um 100-5.000 registrierte Photonen im Maximum der Abklingkurven zu erhalten. Insgesamt ergab das 30.000-1.500.000 registrierte Photonen im Histogramm.

2.8.1.4 Aufbau der TP-FLIM Apparatur

Abbildung 2.2 zeigt einen schematischen Aufbau der TP-FLIM Apparatur. Ein Nd:YAG Laser (Verdi 5.5W, Coherent) wurde zum Starten der eigentlichen Lichtquelle, einem Titan-Saphir-Laser (Mira 900, Coherent), verwendet. Der Titan-Saphir-Laser emittierte Wel-

lenlängen zwischen 700-1000 nm, hatte eine Pulsweite von 150 fs und eine Repetitionsrate von 75,6 MHz. Die erbrachte Laserleistung lag über 500 mW. Die Messungen wurden bei weniger als 1% (2-5 mW) der Maximal-Laserleistung durchgeführt.

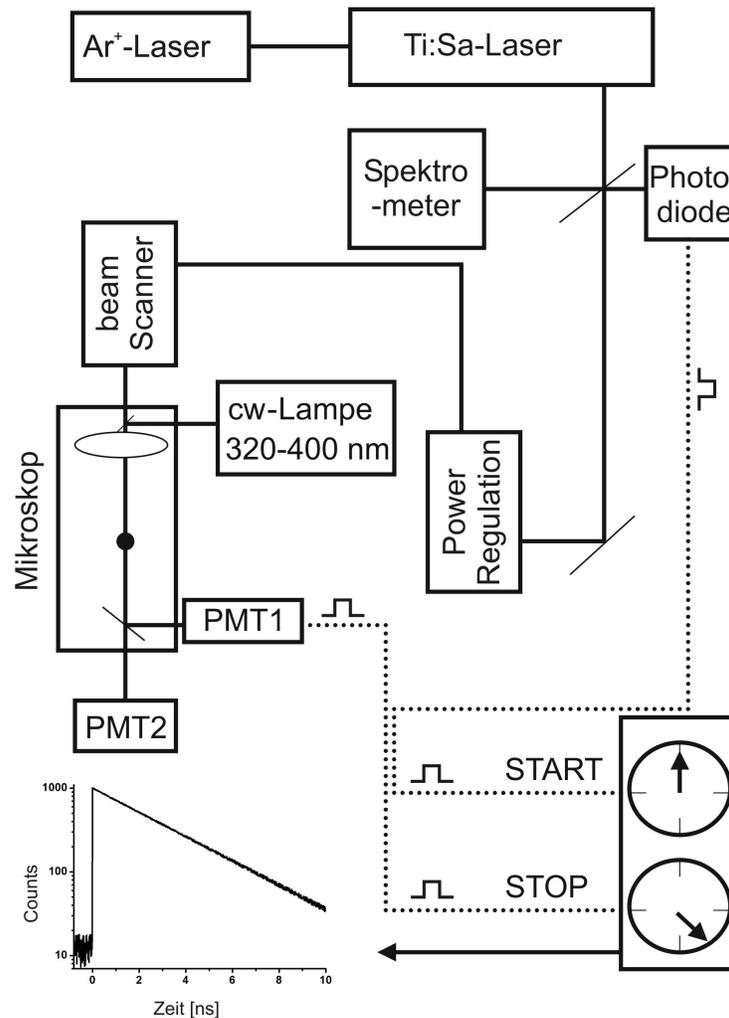


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Messapparatur für Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebeszeit Messungen und Darstellung des Prinzips des Start-Stopp-Mechanismus für die TCSPC-Messung.

Es wurde Laserlicht mit der Wellenlänge 750 nm eingesetzt. Ein kleiner Teil des Anregungslichts wurde auf eine schnelle Photodiode geleitet, um den Startpuls für die TCSPC-Messung zu geben. Das Anregungslicht ließ sich durch einen Strahlenscanner (T.I.L.L. Photonics, München) in x- und y- Ebene des Objektes bewegen. Zur Betrachtung des Objekts wurde ein aufrechtes Fluoreszenz-Mikroskop (BX50 WI, Olympus) mit einem Wasser-Immersions-Objektiv mit hohem Arbeitsabstand ($d = 2,5 \text{ mm}$; $NA = 0,9$) verwendet. Die Auflösung

betrug somit mehr als $0,5 \mu\text{m}$ in x- und y- Ebene und mehr als $1,5 \mu\text{m}$ in z-Ebene. Bei Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen wurde das Fluoreszenzlicht mit PMT 1 detektiert. PMT2 wurde für andere Zwei-Photonen-Anwendungen verwendet.

Die Elektronik (SPC730) und Software für TCSPC und die Fluoreszenz-Lebenszeit-Apparatur stammen von Becker & Hickl (Berlin). Die Messapparatur wurde unter Leitung von Dr. T. Gensch (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) in Zusammenarbeit mit T.I.L.L. Photonics entworfen.

2.8.2 Cl^- -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Cl^- -Farbstoffe für die Fluoreszenz-Mikroskopie an lebenden Geweben und Zellen müssen viele Kriterien erfüllen: (1) Sie dürfen nicht toxisch sein; (2) sie müssen schnell und gleichmäßig in das Gewebe diffundieren; (3) sie müssen gegen endogene Enzyme resistent sein; (4) sie dürfen nicht aus der Zelle diffundieren; (5) sie dürfen nicht stark von intrazellulären Komponenten "gequencht" werden; (6) ihr Fluoreszenz-Signal sollte im physiologischen Bereich pH-Wert unabhängig sein; (7) ihre Absorption und Quantenausbeute müssen hoch genug sein, damit auch kleine Kompartimente vermessen werden können; (8) sie müssen Konzentrationsänderungen von wenigen Millimolar detektieren können; (9) sie dürfen nicht von Substanzen, die für die Messungen verwendet werden, beeinflusst werden. Bei Untersuchungen der Chloridhomöostase sind solche Substanzen z.B. Nifluminsäure, Furosemid oder Bumetanid.

In dieser Arbeit wurde der Cl^- -sensitive Fluoreszenzfarbstoff N(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium Bromid (MQAE, Molecular Probes), ein sogenannter "Collision-Quencher" (Lakowicz, 1999), verwendet. Seine Strukturformel ist in Abb. 2.3 auf der nächsten Seite gezeigt.

Die Vorteile dieses Farbstoffs sind, dass MQAE nicht toxisch ist und dass es gut in Gewebe und Zellen diffundiert. In den Zellen wird MQAE rasch durch endogene Esterasen in eine Zellmembran-impermeable Form gespalten. Ansonsten wird der Farbstoff nur sehr langsam abgebaut und erhält seine Fluoreszenzeigenschaften über eine lange Zeit. Cl^- -Ionen werden von MQAE nicht gebunden, sondern gehen eine sehr kurze Interaktion mit dem angeregten Zustand des Fluoreszenzfarbstoffs ein. Dabei wird die Energie angeregter Moleküle ohne

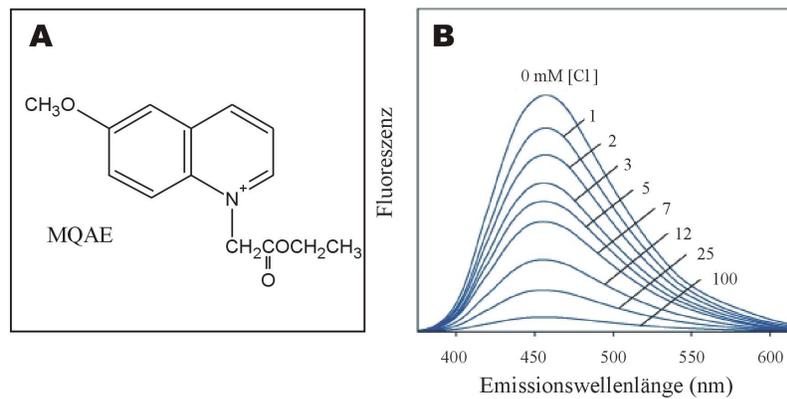


Abbildung 2.3: (A) Strukturformel des Cl⁻-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs MQAE; (B) MQAE-Fluoreszenzspektrum. Die MQAE-Fluoreszenzemission bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 350 nm ist in Abhängigkeit von der freien [Cl⁻] (in mM) dargestellt. (Quelle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 7. Ed., Molecular Probes.)

Emission von Photonen auf das Cl⁻-Ion übertragen, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes mit steigender [Cl⁻] abnimmt.

Die Steigung dieser über einen weiten Konzentrationsbereich linearen Funktion, die durch die Stern-Volmer-Funktion beschrieben wird, bezeichnet man als Stern-Volmer- oder auch Quenching-Konstante K_{SV} ($\tau_0/\tau = 1 + K_{SV}[Cl^-]$). τ_0/τ bezeichnet das Verhältnis der Lebenszeit in chloridfreier Lösung, τ_0 , zur gemessenen Fluoreszenz-Lebenszeit bei einer beliebigen freien Chloridkonzentration, τ . Somit berechnet sich K_{SV} als Produkt $k_q \cdot \tau_0$.

Das Absorptionsspektrum (Abb. 2.3 B) zeigt, dass MQAE bei einer Wellenlänge von 350 nm maximal angeregt wird und sein Emissionsmaximum bei 460 nm liegt. Im Unterschied zu dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fura-2, der aufgrund der Verschiebung seiner Emissionsmaxima bei verschiedenen [Ca²⁺] die absolute [Ca²⁺] anzeigt, ermöglicht MQAE nur die Messung der relativen [Cl⁻]-Änderung. Somit muss die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit für bestimmte Chloridkonzentrationen in der Zelle kalibriert werden. Der Vorteil von Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen gegenüber Fluoreszenz- Intensitäts-Messungen ist, dass sie unabhängig vom Zellvolumen und der intrazellulären MQAE-Konzentration sind, und dass eine einmal in einem Zelltyp ermittelte Stern-Volmer-Konstante übertragbar auf folgende Präparationen ist. K_{SV} muss also nicht vor jeder Messung einer Zellart neu bestimmt werden, und Vergleiche zwischen Zellen sind ohne Kalibrierung möglich.

2.8.3 Vorbereitung der Spinalganglienzellen für FLIM-Versuche

Für FLIM-Messungen der intrazellulären Cl^- -Konzentration wurden Ratten-Spinalganglien-Zellen mechanisch und mit Hilfe von Enzymen vereinzelt und auf Concanavalin A-beschichteten (s.u.) Glasplättchen ausgesät.

Dazu wurden ca. 30 Spinalganglien einer drei bis sechs Wochen alten Wistar-Ratte in kalter Ringer-Lösung (ES-1: 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,5 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 10 mM HEPES; 10 mM D-Glucose; pH 7,4; 340 mmol/kg) gesammelt, mit einer Rasierklinge zerteilt und in 2 ml 0,3% Collagenaselösung [0,3% Collagenase (C-9891; Sigma) in DMEM] 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (200 x g, 5 min) wurde diese Lösung durch 2 ml 0,25%ige Trypsinlösung [0,25% Trypsin (T-1426, Sigma) in MEM] ersetzt und das Zellpellet darin mit einer Feuer-polierten Pasteurpipette mit großer Öffnung vorsichtig trituriert. Nach weiterer Inkubationszeit (30 min, 37°C) wurde erneut trituriert, bis eine Einzelzell-Suspension vorlag. Die Zellen wurden pelletiert (200 x g, 5 min), das Pellet zweimal mit 2 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gewaschen und die Zellen dann auf mit Concanavalin A beschichtete Glasplättchen in einer Multiwellschale (Greiner) ausgesät (50 - 100 μl Zellsuspension pro Plättchen). Pro Plättchen wurden 400 μl 37°C warmes DMEM zugegeben. Die Zellen wurden bis zu 8 h bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Haereus) kultiviert, bis sie zur Messung eingesetzt wurden.

Die DRG-Neurone wurden auf Concanavalin A-beschichteten Deckgläsern ausgesät, da sie nicht an Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern haften. Dazu wurden die in Ethanol gelagerten 12-cm-Deckgläser abgeflammt, in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen gegeben und mit 5 ml Carbodiimid-Lösung [75 mg/ml 1-Ethyl-3(3Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (E-7750, Sigma) in ES-1] 15 min bei 4°C rotiert. Carbodiimid dient hier als Crosslinker zwischen Glas und Concanavalin A. Die Lösung wurde durch 5 ml Concanavalin A-Lösung [10 mg/ml Concanavalin A (C-7275, Sigma) in ES-1] ersetzt und die Plättchen 1 h weiter rotiert. Die Plättchen wurden in Petrischalen staubsicher bei 4°C bis zu 6 Monate verwahrt. Vor der Verwendung in der Zellkultur wurden die Plättchen zweimal mit sterilem PBS gewaschen.

2.8.4 TP-FLIM-Messung an DRG-Neuronen

Für Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen wurden die dissoziierten, auf Plättchen ausgesäten DRG-Zellen 30 min bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit in einer 5 mM MQAE/ES-1-Lösung beladen. Danach wurden sie 2 x mit ES-1 gewaschen und das Plättchen in die Messkammer mit ES-1 oder in Cl⁻-freie Lösung (*“low-chloride-solution“*, 100 mM KNO₃, 10 mM Phosphatpuffer, 5 mM Glucose, 1 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM Mg(NO₃)₂, pH 7,3) überführt. MQAE blieb über die Dauer der Messungen in der Zelle, da es von endogenen Esterasen anscheinend nahezu vollständig in seine Membran-undurchgängige Form gespalten wurde (Kaneko et al., 2002). Die Zwei-Photonen-Anregung des MQAEs geschah mit 150 fs-Pulsen mit Licht der Wellenlänge 750 nm.

Die Badlösungen unterschiedlicher [Cl⁻] (0-100 mM) wurden aus einer Ringerlösung mit 100 mM Cl⁻ (*“high-chloride solution“*: 100 mM KCl; 10 mM Phosphatpuffer; 5 mM Glukose; 1 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; pH 7,3) und *“low-chloride-solution“* (s.o.), durch Mischen hergestellt. Da gezeigt wurde, dass HEPES-gepufferte Lösungen die MQAE-Fluoreszenz verstärkt *“quenchen“* (Kaneko et al. 2002), wurden die Lösungen durch Phosphat (Na₂HPO₄ und NaH₂HPO₄) gepuffert, das auf die MQAE-Fluoreszenzintensität und -Lebenszeit keinen Einfluss hat (Kaneko et al., 2002). Um Fluoreszenz-Lebenszeit und [Cl⁻]_i in Relation zu bringen, musste das beschriebene System geeicht werden, also τ₀ und K_{SV} bestimmt werden. Die Eichung erfolgte in Badlösungen unterschiedlicher [Cl⁻]. Wurden die Zellen lediglich Badlösungen ausgesetzt, die einen Konzentrationsbereich von 0-100 mM [Cl⁻] abdeckten, änderte sich die Fluoreszenz-Lebenszeit nicht, da die Zellmembran nicht durchlässig für Cl⁻ war. Um die [Cl⁻]-Konzentration auf beiden Seiten der Zellmembran zu klemmen, wurde eine Doppel-Ionophor-Strategie (Chao et al., 1989) benutzt. Dazu wurden die Zellen nach Beladen mit MQAE 30 min in einer Cl⁻-freien Ionophor-Lösung (wie ES-1; aber Cl⁻ durch NO₃⁻ ersetzt; 40 μM Tributylzinn; 10 μM Nigericin; 10 μM Valinomycin) inkubiert. Tributylzinn (TBT) ist ein Cl⁻/OH⁻-Austauscher, während Nigericin, ein K⁺/H⁻-Austauscher, dafür sorgte, dass der pH-Wert, der durch TBT verschoben wird, stabilisiert wurde. Valinomycin wurde zusätzlich eingesetzt, um das Membranpotenzial V_M auf 0 mV zu klemmen. Es wurden die Werte von 8-13 Zellen für die Bestimmung der Zeitkonstante τ und von K_{SV} gemittelt. K_{SV} wurde durch lineare Regression über die erhaltenen Messpunkte bestimmt.

3 Ergebnisse

Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Ströme lassen sich in den Zellen nahezu aller erregbarer und nicht-erregbarer Gewebe nachweisen (Übersicht: Scott, 1995; Frings et al., 2000). In Neuronen vermitteln sie je nach Chloridverteilung über der Zellmembran eine Depolarisation oder Hyperpolarisation des Membranpotenzials. In Riechzellen und Neuronen der DRGs (*dorsal root ganglion*, DRG) ist die Chloridkonzentration höher als in anderen Neuronentypen (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Gallagher et al., 1978; Nakamura et al., 1997; Reuter et al., 1998). Hier sind Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle Teil der depolarisierenden Stromkomponente (Kleene und Gesteland, 1991; Reuter et al., 1998; Mayer, 1985; Scott, 1995; Kurahashi und Yau, 1993; Lowe und Gold, 1993; Hallani et al., 1998). So hat der Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Strom in Riechzellen zu mehr als 90% Anteil am Rezeptorstrom (Reisert et al., 2003).

Welches Gen für den Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanal kodiert, ist nicht bekannt. Es wurde bislang eine Proteinfamilie entdeckt, deren Mitglieder die Eigenschaften Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanäle aufweisen: die CLCA-(*chloride channel, calcium activated*) Proteine (Übersicht: Gruber et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe wurde aus Ratten-Riechepithel das erste neuronale clca-Homolog *rclca1* kloniert (Dr. J. Bradley). Die Expression des *rclca1*-Gens im Riechepithel wurde durch *in situ*-Hybridisierung überprüft (Dr. J. Bradley). Das *rclca1*-Gen war das erste Gen der CLCA-Familie, das nur in den Riechzellen, nicht aber in nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen werden konnte. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher das *rclca1*-Gen und sein Protein rCLCA1 als möglichen Kandidaten für den Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanal zu untersuchen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des *rclca1*-Gens und seines Proteins rCLCA1 als möglicher Kandidat für den Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanal der Riechsignalkaskade der Ratte. Zudem sollte die Expression von Cl⁻-Transportproteinen in Riechzellen und somatosensorischen Neuronen untersucht werden, da sie maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Chloridhomöostase in Zellen beteiligt sind.

Der Ergebnisteil ist in sechs Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil wird das heterolog exprimierte rCLCA1-Protein biochemisch und immunzytochemisch untersucht. Für diese Ver-

suche werden verschiedene Antikörper gegen rCLCA1 hergestellt, die auch im zweiten Teil dieser Arbeit verwendet werden, um das Protein biochemisch zu charakterisieren und immunzytochemisch im Riechepithel zu lokalisieren. Der dritte Teil beschäftigt sich mit funktionellen Charakterisierung des heterolog exprimierten rCLCA1-Proteins in HEK293-Zellen. Im vierten Teil der Arbeit wird untersucht, ob rCLCA1 proteolytisch gespalten wird, und ob dies eine Bedeutung für die Proteinfunktion hat. Für viele Proteine der CLCA-Familie wird eine solche Prozessierung nachgewiesen (Ji et al., 1998; Cunningham et al., 1995; Zhu et al., 1991; Elble et al., 1997; Gandhi et al., 1998; Gruber et al., 1998; Gruber und Pauli, 1999b). Der fünfte Teil der Arbeit betrachtet ein im Gegensatz zum Riechepithel sehr einfaches System für die Untersuchung der Riechsignalkaskaden-Komponenten: die Odora-Zelllinie (Murell und Hunter, 1999). Mit Hilfe dieser Riechzelllinie kann die Frage, ob rCLCA1 den Ca^{2+} -aktivierten Cl^{-} -Kanal der Riechsignalkaskade kodiert, geklärt werden.

Der sechste Teil dieser Arbeit befasst sich mit weiteren Komponenten der Chloridhomöostase in Riechzellen und somatosensorischen Neuronen. Durch RT-PCR und immunhistochemische Methoden wird untersucht, welche der bisher bekannten Kationen/ Cl^{-} -Kotransporter-Proteine exprimiert werden, um Rückschlüsse auf die Regulation des Chloridhaushaltes der Zellen ziehen zu können. Außerdem wird die Cl^{-} -Konzentration der somatosensorischen Neurone durch Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lebenszeit Analyse (*two photon fluorescence underlinelifetime underlineimaging*, TP-FLIM) bestimmt.

3.1 rCLCA1-Expression in tsA-Zellen

3.1.1 Herstellung rCLCA1-spezifischer Antikörper

Um rCLCA1 biochemisch charakterisieren zu können, wurden verschiedene Antikörper in Kaninchen, Huhn oder Meerschweinchen in Zusammenarbeit mit den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien) und Davids Biotechnologie (Regensburg) hergestellt. Es wurden fünf verschiedene, 14-20 Aminosäuren lange Epitope des Proteins ausgewählt, die sich aufgrund ihrer Primärstruktur für die Herstellung von Peptidantikörpern eignen sollten. Die Epitope befinden sich in unterschiedlichen Bereichen der rCLCA1-Sequenz. Zusätzlich wurde ein C-terminales Fusionsprotein aus dem Maltose-Bindeprotein (MBP) und rCLCA1 hergestellt

(Das Fusionsprotein stellte freundlicherweise Dr. J. Bradley zur Verfügung). Mit dem Fusionsprotein wurden ein Huhn und ein Kaninchen immunisiert. In Tabelle 3.1 sind die Laborbezeichnungen der Antikörper, die Position des Antigens im Protein, die beauftragte Firma und die Spezies genannt, in der die Antikörper hergestellt wurden.

Tabelle 3.1: Antikörper gegen rCLCA1: Laborbezeichnung, rCLCA1-Antigen, Spezies und mit der Herstellung beauftragte Firma.

Laborbezeichnung des Antikörpers	rCLCA1-Antigen	Spezies	Firma
301.P1	“P1“: AS 85-99	Kaninchen	Eurogentec
302.P1	“P1“: AS 85-99	Kaninchen	Eurogentec
P2a	“P2“: AS 153-169	Meerschweinchen	Eurogentec
P2b	“P2“: AS 146-169	Kaninchen	Eurogentec
301.P3	“P3“: AS 538-552	Kaninchen	Eurogentec
302.P3	“P3“: AS 538-552	Kaninchen	Eurogentec
P4	“P4“: AS 651-665	Kaninchen	Eurogentec
P5	“P5“: AS 765-785	Kaninchen	Eurogentec
DchB	C-terminales MBP-Fusionsprotein; AS 656-870	Huhn	Davids
DrbB	C-terminales MBP-Fusionsprotein; AS 656-870	Kaninchen	Davids

Abb. 3.1 zeigt schematisch die Lage der Antigene (P1 - P5), die für die Antikörperherstellung verwendet wurden. Im Anhang werden die Sequenzen der einzelnen Epitope anhand der rCLCA1-Sequenz dargestellt.

Die Antikörper mit den Bezeichnungen 301.P1 und 301.P3 wurden in demselben Kaninchen (mit der Bezeichnung “Eurogentec #301“) durch Doppelimmunisierung mit den Peptiden 1 und 3 (“P1“ und “P3“) hergestellt. Dasselbe Prinzip gilt für die Antikörper 302.P1 und 302.P3. Die Antikörper gegen die zwei zur Immunisierung verwendeten Peptide P1 und P3 wurden nachträglich über Peptid-gekoppelte Thiol-Sepharose-Säulen gereinigt (2.5.1.1), so dass insgesamt vier gereinigte Antikörperaliquots vorhanden waren. Die Doppelimmunisie-

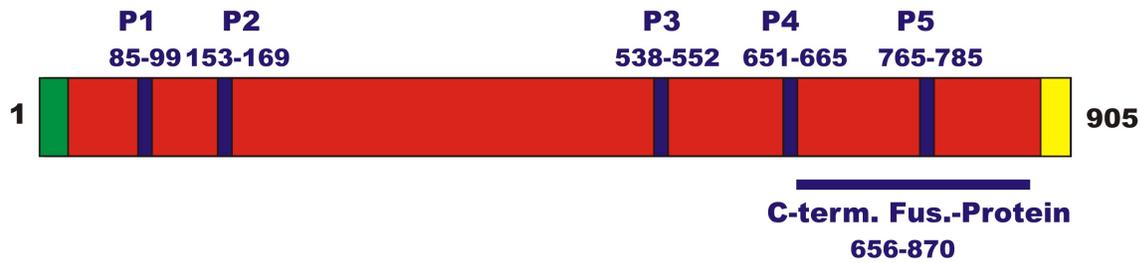


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des rCLCA1-Proteins. Das Protein (Balken) ist aus 905 Aminosäuren aufgebaut. Es besitzt ein N-terminales Signalpeptid (grün). Der C-Terminus der CLCA-Proteine ist hypervariabel, was hier mit einem gelben Balken angedeutet wird. Die Lage der Peptide, die für die Antikörperherstellung gegen rCLCA1 verwendet wurden, sind mit blauen Balken dargestellt (P1 bis P5). Blaue Zahlen bezeichnen die Aminosäuren der Peptide. Der Bereich, der für die Herstellung des C-terminalen Fusionsproteins verwendet wurde, ist mit einem blauen Längsbalken gekennzeichnet (C-term. Fus.-Prot.). Im Anhang befinden sich die rCLCA1-Aminosäuresequenz und ein Sequenzvergleich aller CLCA-Proteine.

Die Immunisierung wurde vorgenommen, da diese Methode eine größere Immunantwort der Kaninchen versprach als die Immunisierung mit nur einem Peptid.

Das für den Antikörper P2 verwendete Antigen ist in allen Mitgliedern der CLCA-Familie konserviert (s. Sequenzvergleich im Anhang). Dieser Antikörper sollte daher alle CLCA-Isoformen erkennen.

Die Antikörper sollten verwendet werden, um die rCLCA1-Expression in Riechzellen mit Hilfe der Westernblot-Technik und immunhistochemischer Methoden zu untersuchen. Die Antikörper wurden zunächst anhand *rclca1*-transfizierter tsA-Zellen getestet.

3.1.2 Heterologe rCLCA1-Expression und Charakterisierung der Antikörper

Zunächst wurde die Transfektion der tsA-Zellen mit *rclca1* (Klon pcDNA3.1 Amp-rCLCA1) mit Hilfe der unterschiedlichen rCLCA1-Antikörpern immunzytochemisch überprüft. Für die Negativkontrolle wurden tsA-Zellen nur mit Plasmid-DNA (pcDNA3.1 Amp) oder ohne DNA ("mock"-Kontrolle) transfiziert.

Abb. 3.2 zeigt ein Beispiel für eine Antikörperfärbung *rclca1*-transfizierter und mock-transfizierter tsA-Zellen mit dem P3-Antikörper 302.P3. Mock-transfizierte Zellen (3.2 (A)) werden nicht durch rCLCA1-Antikörper gefärbt, während *rclca1*-transfizierte Zellen zu einem bestimmten Prozentsatz gefärbt wurden (3.2 B).

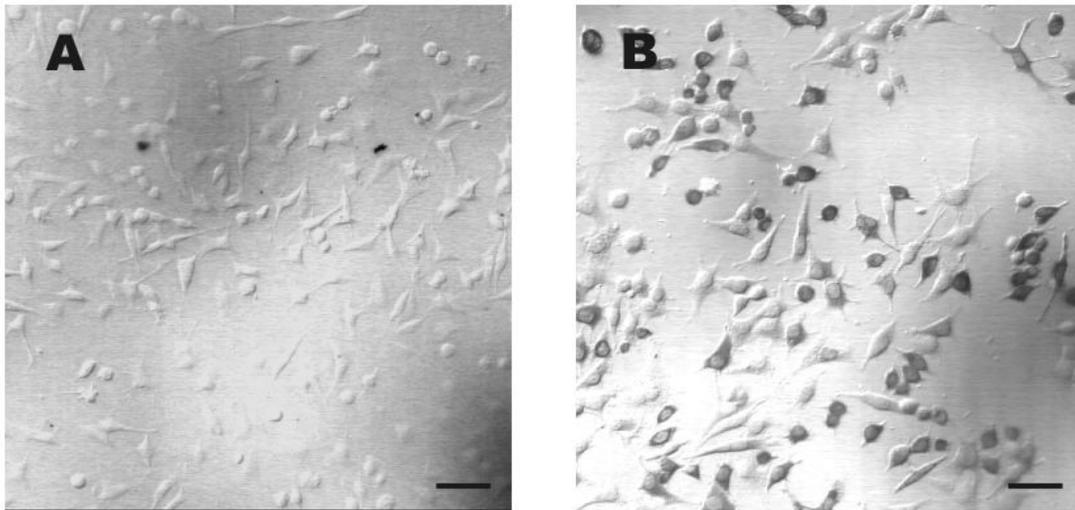


Abbildung 3.2: Test der transienten *rclca1*-Transfektion in tsA-Zellen am Beispiel des Antikörpers 302.P3 (Nachweis: DAB-Färbung) (A) untransfizierte tsA-Zellen; (B) Zellen, die mit 4 µg pcDNA 3.1 Amp rCLCA1 transfiziert wurden. Die Transfektionseffizienz betrug 20 - 60%. (Balken: 50 µm.)

Die Transfektionseffizienz betrug 20% - 60%. Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse der immunzytochemischen Experimente aller rCLCA1-Antikörper zusammen.

Die Antikörper P2a und P2b, die gegen die konservierte Domäne der CLCA-Proteinfamilie gerichtet waren, ergaben keine spezifische Färbung *rclca1*-transfizierter Zellen. Das Gleiche gilt für den Antikörper gegen P4. Der Antikörper DrbB produzierte einen sehr hohen Hintergrund, von dem sich spezifisch gefärbte Zellen nicht abhoben.

3.1.3 Westernblot-Analysen *rclca1*-transfizierter Zellen

Membranproteine *rclca1*-transfizierter tsA-Zellen wurden mit der Westernblot-Technik untersucht. Dazu wurden tsA-Zellen mit dem Klon pcDNA3.1 Amp-rCLCA1 transfiziert oder, zur Kontrolle, ohne DNA mock-transfiziert. Die Membranproteine der Zellen wurden präpariert (2.6.2), durch SDS-PAGE aufgetrennt (2.6.6.1) und auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.6.7). Der immunologische Nachweis der Membranproteine erfolgte wie unter 2.6.8 beschrieben. In Abbildung 3.3 sind die Westernblot-Analysen der verschiedenen Antikörper gezeigt.

Antikörper gegen P1 (301.P1 und 302.P1; AS 85-99)

Die Antikörper, die gegen P1 gerichtet sind, erkennen in *rclca1*-transfizierten tsA-Zellen ein

Tabelle 3.2: Test der unterschiedlichen rCLCA1-Antikörper auf transfizierten tsA-Zellen. Die jeweils verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind in der letzten Spalte angegeben.

Antikörper	spezifische Färbung auf <i>rclca1</i> -transfizierten tsA-Zellen	Verdünnung
301.P1	ja	1:150
302.P1	ja	1:150
P2a	nein	1:25
P2b	nein	1:25
301.P3	ja	1:150
302.P3	ja	1:200
P4	nein	1:25
P5	ja	1:40
DchB	ja	1:500
DrbB	nein	1:500

125 kDa großes Protein und zusätzlich eine schwächere Bande bei 97 kDa. Abb. 3.3 zeigt dies am Beispiel für den Antikörper 301.P1. Antikörper 302.P1 (hier nicht gezeigt) liefert das gleiche Bandenmuster.

Antikörper gegen P2 (P2a: AS 153-169 und P2b: AS 146-169)

Sowohl die aufgereinigten P2-Antikörper aus Kaninchen (P2b; s. Abb. 3.3) als auch die Antikörper aus Meerschweinchen (P2a; nicht gezeigt) detektieren kein Protein in den Membranproteinen *rclca1*-transfizierter tsA-Zellen. Auch unverdünnt eingesetzt geben diese Antikörper kein spezifisches Signal.

Antikörper gegen P3 (301.P3 und 302.P3; AS 538-552)

Die Antikörper gegen P3 detektieren, wie auch die Antikörper gegen P1, in den Membranproteinen *rclca1*-transfizierter Zellen ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 125 kDa. Außerdem erkennen die Antikörper eine schwache Bande in Höhe von 97 kDa. Als Beispiel für dieses Signal wird in Abb. 3.3 der Nachweis mit dem Antikörper

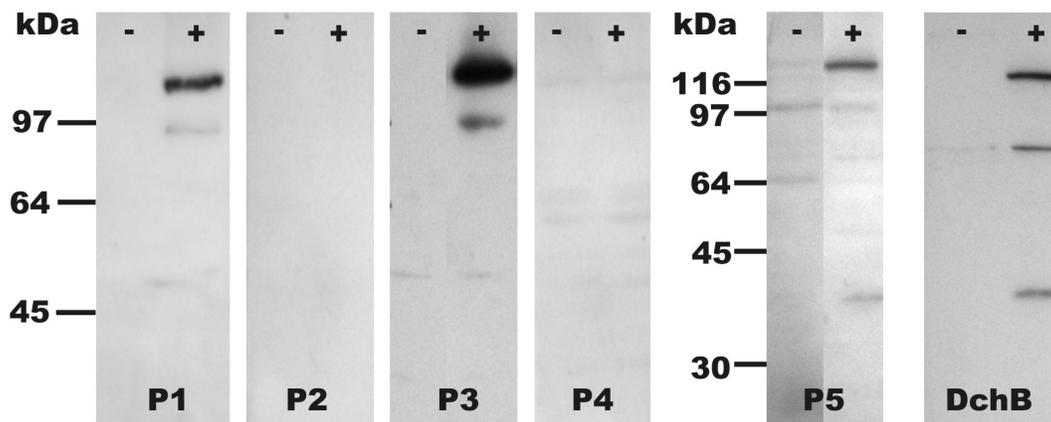


Abbildung 3.3: Westernblot-Analysen der Membranproteine *rclca1*-transfizierter tsA-Zellen mit den Antikörpern gegen die sechs ausgewählten rCLCA1-Epitope. Es wurden jeweils 15 μ g Membranproteine mock-transfizierter (-) und rCLCA1-transfizierter (+) tsA-Zellen nebeneinander mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit rCLCA1-Antikörpern gegen die Epitope P1-P5 und das C-terminale Fusionsprotein nachgewiesen. (P1: hier 301.P1, P2: hier P2b; P3 hier: 301.P3, DchB: Hühnerantiserum gegen das C-terminale Fusionsprotein.)

301.P1 zeigt, 302.P3 (hier nicht gezeigt) liefert dasselbe Bandenmuster. 301.P1 zeigt zusätzlich zu den Banden, die sowohl von P1- und P3-Antikörpern erkannt werden, eine weitere Bande bei 48 kDa, die allerdings auch stets in mock-transfizierten Zellen detektiert wird.

Antikörper gegen P4 (AS 651-665)

Die Antikörper gegen P4 geben, auch wenn sie unverdünnt eingesetzt werden, kein spezifisches Signal auf Westernblots mit den Membranproteinen *rclca1*-transfizierter tsA-Zellen.

Antikörper gegen P5 (AS 765-785)

Der Antikörper gegen P5 zeigt eine Bande in Höhe von ca. 125 kDa in transfizierten Zellen, die nicht in der mock-Kontrolle erscheint. Zusätzlich wird eine schwächere Bande bei 35 kDa erkannt. Daneben werden weitere Banden bei 97 kDa und 66 kDa detektiert, die jedoch auch in nicht-transfizierten Zellen auftreten.

Antikörper gegen das C-terminale MBP-Fusionsprotein (AS 656-870)

Die beiden Antikörper, die gegen den C-Terminus des rCLCA1-Proteins gerichtet sind, erkennen sowohl ein ca. 125 kDa großes Protein als auch ein kleineres Protein bei 35 kDa.

Zusätzlich wird eine Bande bei 70 kDa detektiert, die auch in nicht-transfizierten Zellen auftritt. In Abbildung 3.3 wird der immunologische Nachweis mit dem Huhn-Antiserum (DchB) gezeigt; das Serum aus Kaninchen (DrbB; hier nicht gezeigt), gibt die gleichen Signale, aber einen stärkeren Hintergrund als DchB.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Antikörper gegen P1 und P3 jeweils ein 125 kDa und ein 97 kDa großes Protein erkennen. Das 125 kDa große Protein wird auch von den Antikörpern gegen P5 und das C-terminale Fusionsprotein erkannt. Anstelle des 97 kDa großen Proteins detektieren diese Antikörper jedoch ein 35 kDa großes Protein. In anderen Arbeitsgruppen lieferten Antikörper gegen andere CLCA-Isoformen ähnliche Ergebnisse. Allgemein wird angenommen, dass CLCA-Proteine proteolytisch gespalten werden. Drei der gegen rCLCA1 hergestellten Antikörper sind nicht für Westernblot-Analysen geeignet: die Antikörper P2a und P2b gegen die konservierte Domäne der CLCA-Proteine und der Antikörper gegen das vierte Peptid, P4. In Tabelle 3.3 werden die im Text beschriebenen Ergebnisse zusammengefasst und die optimalen Verdünnungen der verschiedenen Antikörper für Westernblot-Analysen aufgelistet.

3.1.4 Deglykosylierung der rCLCA1-Proteine

Das errechnete Molekulargewicht des rCLCA1-Proteins liegt bei 100,07 kDa. Die oben charakterisierten Antikörper detektieren jedoch Proteine mit 125 kDa, 97 kDa und 35 kDa. Das errechnete Molekulargewicht von ca. 100 kDa entspricht am ehesten dem 97 kDa-Protein. Dieses wird allerdings nicht, wie das 125 kDa-Protein, von allen verwendeten Antikörpern erkannt. Membranproteine liegen oft glykosyliert vor, wodurch ihr apparentes Molekulargewicht im SDS-Gel erhöht wird. In der rCLCA1-Primärstruktur finden sich neun potenzielle N-Glykosylierungsstellen (Sequenz s. Anhang). Es wäre möglich, dass das 125 kDa-Protein, das von allen rCLCA1-Antikörpern erkannt wird, die glykosylierte Form des rCLCA1-Proteins darstellt. Um das zu untersuchen, wurden Membranproteine transfizierter tsA-Zellen mit PNGaseF (2.6.5; spaltet nur N-glykosydische Bindungen) behandelt, durch SDS-PAGE neben unbehandelten Membranproteinen aufgetrennt und mittels Westernblot-Technik analysiert. Abb. 3.4 zeigt die Ergebnisse der Deglykosylierungsstudie am Beispiel

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Westernblot-Analyse der rCLCA1-Antikörper mit Membranproteinen *rclca1*-transfizierter tsA-Zellen.

Antikörper	apparentes Molekulargewicht der spezifischen Banden	Antikörper-Verdünnung
301.P1	125 kDa + 97 kDa	1:150
302.P1	125 kDa + 97 kDa	1:150
P2a	keine spezifische Bande	1:1 - 1:25
P2b	keine spezifische Bande	1:1 - 1:25
301.P3	125 kDa + 97 kDa	1:150
302.P3	125 kDa + 97 kDa	1:200
P4	keine spezifische Bande	1:1 - 1:25
P5	125 kDa + 35 kDa	1:25
DchB	125 kDa + 35 kDa	1:1000
DrbB	125 kDa + 35 kDa	1:1000

der Antikörper 302.P1 und DchB. Die 125 kDa-Bande, die von den Antikörpern gegen P1, P3, P5, DchB und DrbB erkannt wurde, weist nach Behandlung mit PNGaseF nun ein apparentes Molekulargewicht von 107 kDa auf. Die schwächere 97 kDa-Bande wird auf 80 kDa reduziert, die 35 kDa-Bande, die von den Antikörpern P5, DchB und DrbB erkannt wurde, lag nun bei 32 kDa. Die Hintergrundbande bei 70 kDa (s. Abb. 3.4, DchB), die auch in nicht-transfizierten Zellen erkannt wird, ändert ihre Größe nach Deglykosylierung nicht. Diese Beobachtung wurde mit beiden P1-Antikörpern, beiden P3-Antikörpern, P5 und DchB überprüft und führte in jedem Fall zu den gleichen, oben beschriebenen Änderungen des Bandenmusters nach Deglykosylierung.

Das heterolog exprimierte rCLCA1-Protein liegt als glykosyliertes Membranprotein vor. Neben einem Hauptprodukt (125 kDa) sind zwei Fragmente (97 kDa und 35 kDa) nachzuweisen, die vermutlich Produkte einer posttranslationalen, proteolytischen Prozessierung sind (s. Abschnitt 3.4).

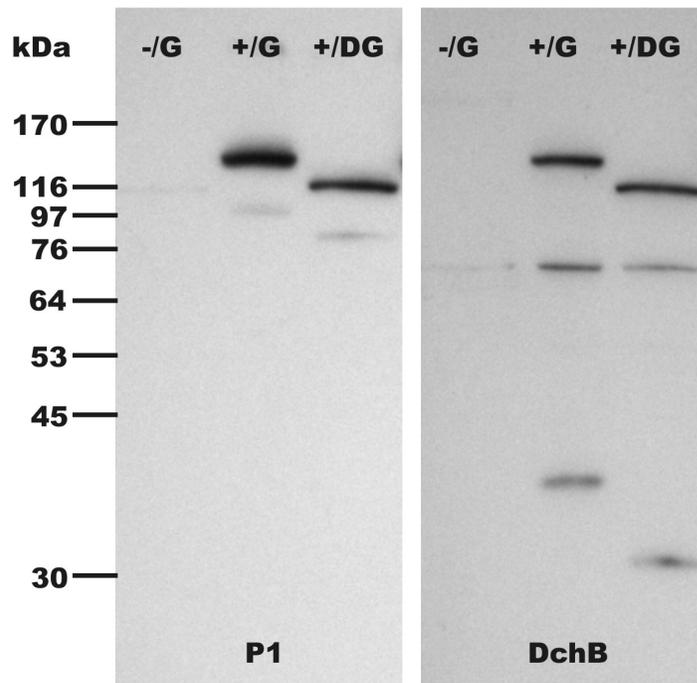


Abbildung 3.4: Deglykosylierung der Membranproteine *rclca1*-transfizierter tsA-Zellen mit PNGaseF. Es wurden jeweils 15 μg glykosylierte Proteine mock-transfizierter Zellen (-/G) neben denselben Mengen glykosylierter (+/G) und deglykosylierter (+/DG) Proteine *rclca1*-transfizierter Zellen auf einem 5-12,5%igen SDS-Gradientengel aufgetrennt. (P1: hier 302.P1, DchB: C-terminaler Fusionsprotein-Antikörper aus Huhn.)

3.1.5 Untersuchungen zur rCLCA1-Membrantopologie in tsA-Zellen

Die Westernblot-Analysen weisen darauf hin, dass es sich bei rCLCA1 um ein Membranprotein handelt, da es sich sowohl in der Membranprotein-Fraktion transfizierter Zellen befindet als auch glykosyliert vorliegt. Die transmembranale Topologie der CLCA-Proteine ist bislang nicht hinreichend geklärt. Es gibt nur Modelle zur Sekundärstruktur der CLCA-Proteine (Gruber et al., 1998; Gruber und Pauli, 1999a). Aufbauend auf Hydropathie-Analysen der Primärstruktur der unterschiedlichen CLCA-Proteine werden 0 - 6 α -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt.

Mit Hilfe der oben charakterisierten, rCLCA1-spezifischen Antikörper, die gegen vier unterschiedliche Bereiche des Proteins gerichtet sind (gegen P1, P3, P5 und das C-terminale Fusionsprotein), konnten rCLCA1-Topologiestudien an transfizierten Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden tsA-Zellen transfiziert und so mit den unterschiedlichen rCLCA1-

Antikörpern inkubiert, dass in einem Fall der Erstantikörper ins Innere der Zelle vordringen konnte (bei permeabilisierten Zellen), im anderen Fall der Erstantikörper nur an extrazelluläre Proteinbereiche binden konnte (bei nicht-permeabilisierten Zellen). Die Permeabilisierung der Zellen wurde durch Triton-haltige Lösungen bei der Prä- und Erstantikörper-Inkubation erreicht (2.6.1.1).

Abb. 3.5 zeigt die Ergebnisse der Permeabilisierungs-Studien an *rclca1*-transfizierten tsA-Zellen. Permeabilisierte Zellen ((A) und (B)) und nicht-permeabilisierte Zellen ((C) und (D)) wurden mit Antikörpern gegen P1 ((A) und (C)) oder P3 ((B) und (D)) inkubiert. Bei permeabilisierten Zellen erkennt man eine Färbung der gesamten Zelle, mit Ausnahme des Zellkerns. Nicht-permeabilisierte Zellen, die mit dem P1-Antikörper 301.P1 (C) und P3-Antikörper 301.P3 (D) inkubiert wurden, zeigen nur eine Membranfärbung. Im Gegensatz zu den P1- und P3-Antikörpern färben Antikörper gegen das C-terminale Fusionsprotein (nicht gezeigt) und Antikörper gegen P5 (nicht gezeigt) nur permeabilisierte Zellen. Die Permeabilisierungstudien an *rclca1*-transfizierten tsA-Zellen lassen unter Betrachtung der Hydropathie-Analyse ("Kyte-Doolittle-Plot" (Kyte und Doolittle, 1982), Abb. 3.5 (F) vier Transmembrandomänen zu. P1-Antikörper erkennen ein extrazelluläres Antigen, also liegt der N-Terminus von rCLCA1 wahrscheinlich extrazellulär. Das lässt auch die Vielzahl der am N-Terminus vorhandenen Glykosylierungsstellen vermuten. P3 erkennt ebenfalls eine extrazelluläre Domäne. Zwischen P1 und P3 dürfen somit keine oder nur eine gerade Anzahl Transmembrandomänen liegen, zum Beispiel zwei, so wie es für hCLCA2 postuliert wurde (Gruber et al., 1999). Die Hydropathie-Analyse der rCLCA1-Sequenz lässt zwischen P1- und P3-Sequenz maximal zwei Transmembrandomänen zu (Analysefenster: 19 AS), eine die bei AS 250 liegt und eine andere bei AS 350. Die Westernblot-Analyse hat gezeigt, dass rCLCA1 wahrscheinlich proteolytisch prozessiert wird. Die Prozessierungsstelle liegt vermutlich bei AS 670 und sollte intrazellulär liegen, um zugänglich für endogene Proteasen zu sein. Zwischen dem extrazellulär gelegenen Epitop P3 (AS 538-552) und der Prozessierungsstelle muss somit ein weiterer Membrandurchgang des Proteins stattfinden. Der Kyte-Doolittle-Plot zeigt, dass eine solche Transmembrandomäne um AS 630 liegen könnte. Ein weiterer möglicher Membrandurchgang wäre anhand des Kyte-Doolittle-Plots am C-Terminus des rCLCA1-Proteins möglich. Dieser könnte als Membrananker für den vom restlichen Protein abgespaltenen C-Terminus dienen. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass das 35

kDa große rCLCA-Fragment bei der Westernblot-Analyse in der Membranprotein-Fraktion nachgewiesen werden konnte. Der Teil des rCLCA1-C-Terminus, der nach der putativen Schnittstelle liegt, befindet sich intrazellulär, da DchB und P5 nicht-permeabilisierte, *rclca1*-transfizierte *tsA*-Zellen nicht färben. Das anhand dieser Ergebnisse erstellte rCLCA1-Topologie-Modell ist in Abb. 3.5 E dargestellt.

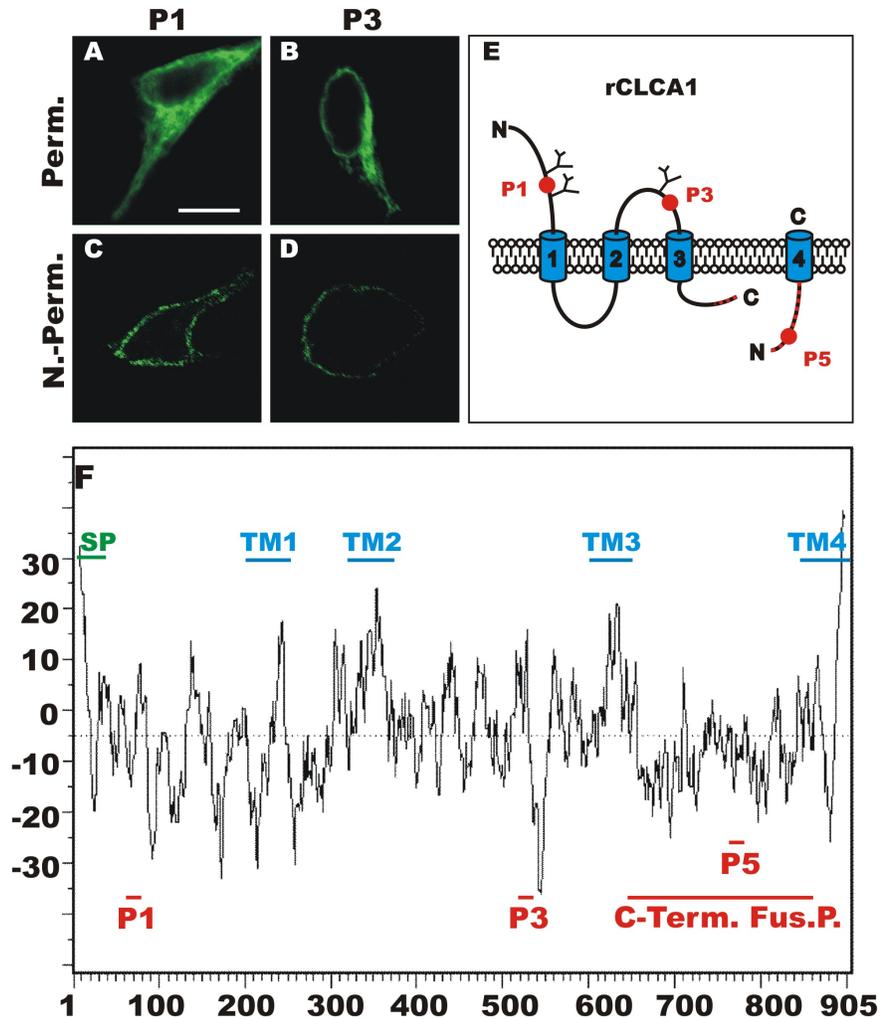


Abbildung 3.5: Permeabilisierungs-Studien an *rclca1*-transfizierten *tsA*-Zellen. (A) und (B): permeabilisierte Zellen, (C) und (D): nicht-permeabilisierte Zellen (Balken: 20 μm).

(E) rCLCA1-Topologiemodell; die Lage der rCLCA1-Antigene wurde durch rote Punkte (P1-P5) und eine rotgestrichelte Linie (C-terminales Fusionsprotein) eingezeichnet. (F) Hydropathieanalyse der rCLCA1-Sequenz (Analysefenster: 19 AS). Auf der x-Achse ist die fortlaufende Aminosäuresequenz angegeben, auf der y-Achse die relative Hydropathie; SP: Signalpeptid, TM1-TM4: angenommene Transmembrandomänen (vgl. (E)). Die Lage der Antigene ist mit roten Balken gekennzeichnet.

3.2 rCLCA1-Expression in olfaktorischem Gewebe

3.2.1 rCLCA1-Nachweis in den Membranproteinen von Riechzilien

Im Abschnitt 3.1 konnte das heterolog exprimierte rCLCA1-Protein mit insgesamt sieben unterschiedlichen, rCLCA1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Es wurden drei Produkte unterschiedlicher Größe auf dem Westernblot nachgewiesen. Jedes rCLCA1-Produkt ist ein glykosyliertes Membranprotein. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob sich das rCLCA1-Protein auch in den Zilien der Riechzellen befindet, wo die Komponenten der Riechsignalkaskade exprimiert werden.

Dazu wurden die Membranproteine von Ratten-Riechzilien präpariert, z.T. deglykosyliert, die glykosylierten und deglykosylierten Membranproteine nebeneinander durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Westernblot analysiert. Abb. 3.6 zeigt das Ergebnis des Versuchs mit dem P3-Antikörper 301.P3 und mit dem Antiserum gegen das C-terminale Fusionsprotein DchB.

Die Antikörper erkennen Proteine unterschiedlicher Größe: der rCLCA1-Antikörper 301.P3

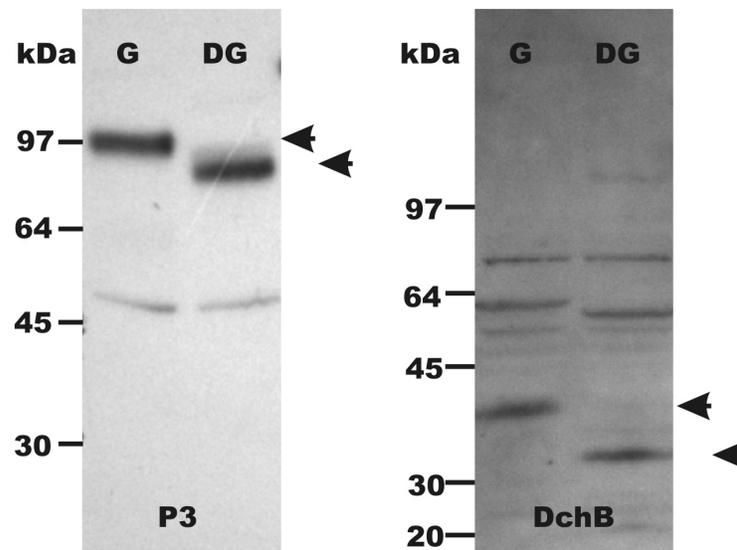


Abbildung 3.6: rCLCA1 in Zilien-Membranproteinen: je 30 μg glykosylierte (G) und deglykosylierte (DG) Membranproteine wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis auf dem Westernblot erfolgte mit dem P3-Antikörper 301.P3 (links) und dem Hühnerserum, das gegen das C-terminale Fusionsprotein DchB gerichtet ist (rechts). Die Pfeile zeigen auf die wahrscheinlichen rCLCA1-Produkte.

detektiert eine Bande bei 97 kDa, die sich nach Deglykosylierung auf 80 kDa verschiebt. Zusätzlich erkennt der Antikörper eine Bande bei 48 kDa, deren Größe sich jedoch nach Deglykosylierung nicht verändert. Eine Bande auf dieser Höhe wurde auch in nicht-transfizierten tsA-Zellen detektiert. Der C-terminale Antikörper DchB erkennt eine Bande, die bei ca. 35 kDa liegt und nach Deglykosylierung bei 32 kDa liegt. Zusätzlich erkennt DchB Banden bei 70 kDa und 62 kDa, die nicht deglykosyliert werden. Die 97 kDa-Bande wird ebenso von P3-Antikörper 302.P3 und von den P1-Antikörpern erkannt, nicht von den Antikörpern gegen P5 und gegen das C-terminale Fusionsprotein. Diese Antikörper erkennen nur das 35 kDa-Protein. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Wie man durch Vergleich des Proteins aus tsA-Zellen und Zilien erkennt (Abb. 3.7), ist das größere, glykosylierte Zilienprotein 28 kDa kleiner als das größte Produkt des heterolog exprimierten rCLCA1-Proteins.

Das 97 kDa große Protein transfizierter tsA-Zellen entspricht in seiner Größe der des Zilienproteins und auch das kleinere 35 kDa-Protein liegt bei Zilien und transfizierten

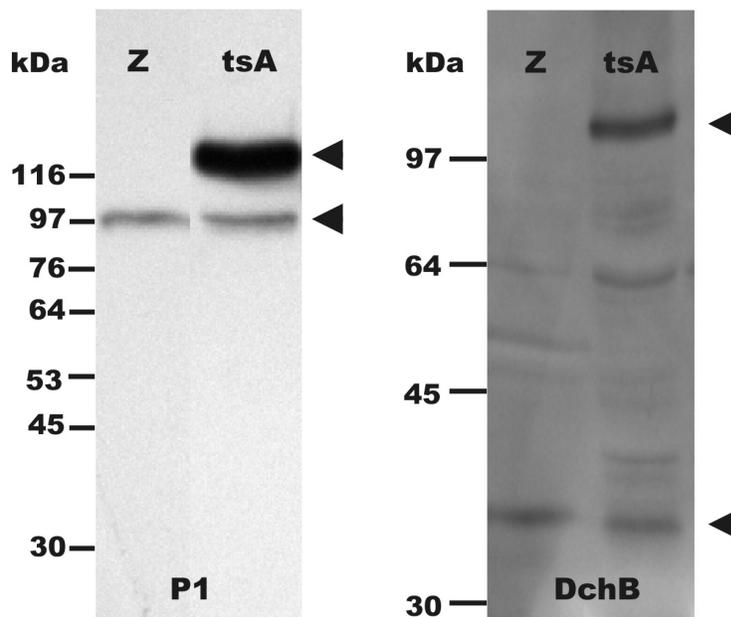


Abbildung 3.7: Vergleich der rCLCA1-Proteine aus Zilien (Z) und rCLCA1-transfizierten tsA-Zellen (tsA), die auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt wurden. Es wurden 30 μ g Zilienproteine und 15 μ g Membranproteine *rclca1*-transfizierter Zellen aufgetragen. Inkubation des Westernblots mit dem P1-Antikörper 301.P1 (links) und dem Fusionsprotein-Antikörper DchB (rechts). Die Pfeile weisen auf rCLCA1-spezifische Banden.

tsA-Zellen auf vergleichbarer Höhe.

Tabelle 3.4: Größe der Banden im Westernblot, die von den rCLCA1-Antikörpern in Membranproteinen von Riechzilien und *rlca1*-transfizierten Zellen erkannt werden.

Antikörper	Größe der detektierten Bande in Zilien	Größe der detektierten Banden in transfizierten tsA-Zellen
301.P1	97 kDa	125 kDa + 97 kDa
302.P1	97 kDa	125 kDa + 97 kDa
301.P3	97 kDa	125 kDa + 97 kDa
302.P3	97 kDa	125 kDa + 97 kDa
P5	35 kDa	125 kDa + 35 kDa
DchB	35 kDa	125 kDa + 35 kDa
DrbB	35 kDa	125 kDa + 35 kDa

Dieses Ergebnis zeigt, dass das 125 kDa in Zilien nicht vorkommt. Möglicherweise ist das 125 kDa-Protein der transfizierten Zellen ein rCLCA1-Vorläuferprotein, das in Zilien nicht mehr auftritt. Hier scheint es vollständig in die beiden 97 kDa und 35 kDa großen rCLCA1-Fragmente prozessiert zu werden. Diese Hypothese wird später (Abschnitt 3.4) genauer untersucht.

3.2.2 Anreicherung des rCLCA1-Proteins in den Zilien

In der Literatur wird beschrieben, dass Ca^{2+} -aktivierte Cl^{-} -Kanäle fast ausschließlich in den Zilien exprimiert werden (Kleene, 1997; Eberius und Schild, 2001) und nicht in Soma oder Dendrit der Riechzelle. Das gilt vermutlich für alle an der Riechsignalkaskade beteiligten Proteine. Falls rCLCA1 ein Teil der Riechsignalkaskade ist, erwartete man, dass auch dieses Protein in Zilien gegenüber dem gesamten olfaktorischen Epithel angereichert ist. Der Nachweis von Proteinanreicherung in Zilien wurde zunächst mit der A2-Untereinheit des olfaktorischen CNG-Kanals (nach Bönigk et al., 1999) in einer Westernblot-Analyse getestet. Dazu wurden gleiche Mengen (30 μg) Membranprotein aus einer Zilienpräparation und

aus einer Präparation des gesamten olfaktorischen Epithels durch SDS-Page nebeneinander aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und mit dem gegen CNG-A2 gerichteten Antikörper 3B10 (Dr. E. Kremmer, München) inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.8 gezeigt.

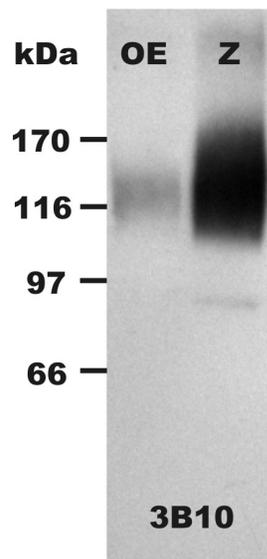


Abbildung 3.8: Anreicherung der CNGA2-Untereinheit in Zilien. Je 30 μg Membranprotein aus olfaktorischem Epithel (OE) und Zilien (Z) wurden durch SDS-PAGE (Gradientengel: 5-12,5%ige Gelmatrix) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit dem Antikörper 3B10 (1:1000) inkubiert.

Man erkennt, dass die vielfach glykosylierte CNG-A2 im Vergleich zum olfaktorischen Epithel in Zilien stark angereichert ist. Der gleiche Versuch wurde mit Antikörpern gegen rCLCA1 durchgeführt. Wie Abb. 3.9 zeigt, ist sowohl die 97 kDa-Bande, die von den P1 und P3-Antikörpern erkannt wird, als auch die 37 kDa-Bande, die von P5 und den Antiseren DchB und DrbB erkannt wird, in Zilien angereichert; allerdings nicht so deutlich, wie es für die CNG-A2-Untereinheit gezeigt werden konnte. Die Anreicherung von rCLCA1 in den Zilien kann als Hinweis auf eine Beteiligung des Proteins an der Riechsignalkaskade gewertet werden.

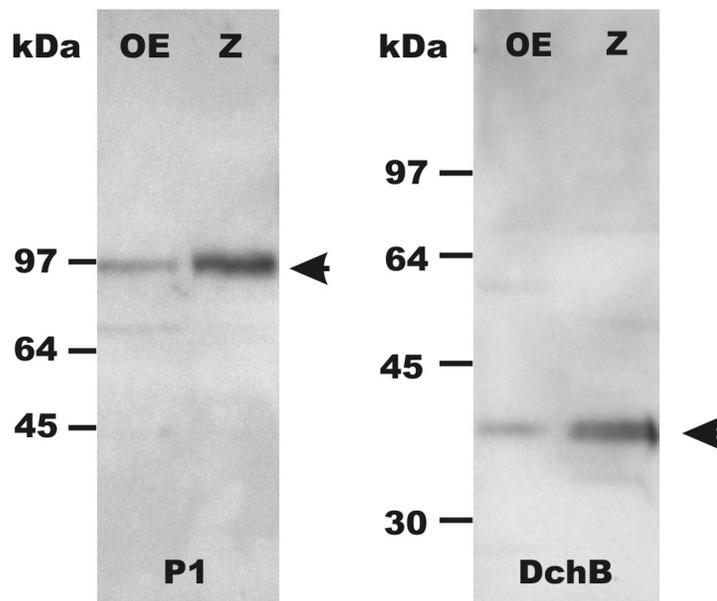


Abbildung 3.9: Anreicherung des rCLCA1-Proteins in Zilien. Jeweils 30 μg Membranprotein aus olfaktorischem Epithel (OE) und Zilien (Z) wurden in einem SDS-Gradientengel (5-12,5%ig) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Links: Nachweis der Proteine mit dem Antikörper 301.P1 als Beispiel für alle P1 und P3-Antikörper; Rechts: Nachweis der Proteine mit dem Antikörper DchB als Beispiel für die Antikörper gegen das C-terminale Fusionsprotein und gegen P5.

3.2.3 Immunhistochemische Analyse der rCLCA1-Expression im olfaktorischen Epithel der Ratte

Die Westernblot-Analysen haben die Anreicherung des rCLCA1-Proteins in den Zilien gezeigt. Um die genaue Lokalisation des Proteins zu untersuchen, wurden Kryoschnitte der Rattennase mit den verschiedenen rCLCA1-Antikörpern inkubiert. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt. Der Aufbau des olfaktorischen Epithels der Ratte wurde bereits in der Einleitung erklärt. Dort wurde auch die Morphologie der Riechzellen und die Lage der Zilien an der apikalen Seite des Epithels beschrieben.

Zur Positivkontrolle für eine Zilienfärbung wurde der monoklonale Maus-Antikörper 3B10 gegen die A2-Untereinheit des olfaktorischen CNG-Kanals verwendet.

Dazu wurde ein 25 μm dicker, koronarer Schnitt durch die Nase einer drei Wochen alten Wistar-Ratte mit dem rCLCA1-Antikörper 302.P1 und mit dem CNG-A2-3B10-Antikörper doppelgefärbt und konfokal gescannt.

Abbildung 3.10 zeigt das Durchlichtbild (A) des Schnitts in Nomarski-Optik. Am Rand des Bildes sind die verschiedenen Zonen des Riechepithels gekennzeichnet, die sich unterhalb des Ziliensaums (Pfeil) befinden (SZ: Stützzellschicht; N: Neuronenzellschicht). 3.10 (B) zeigt die Färbung, die 302.P1 auf dem Riechepithel ergibt. 302.P1 färbt schwach die Zellkörper der Riechneuronen und gibt eine diffuse Färbung im oberen Bereich der Stützzellschicht. Der Ziliensaum wird nicht gefärbt. Das erkennt man besonders deutlich, wenn man neben der rCLCA1-Antikörperfärbung das Fluoreszenz-Signal des CNG-A2-Antikörpers betrachtet (C). Die Abbildung zeigt die Übereinanderlagerung der 302.P1-Färbung (grün) mit der CNG-A2-Färbung (rot) desselben Schnittes. Man erkennt deutlich, dass der Ziliensaum, der durch CNG-A2 angefärbt wird, von 302.1 nicht detektiert wird, sondern sich weiter apikal befindet.

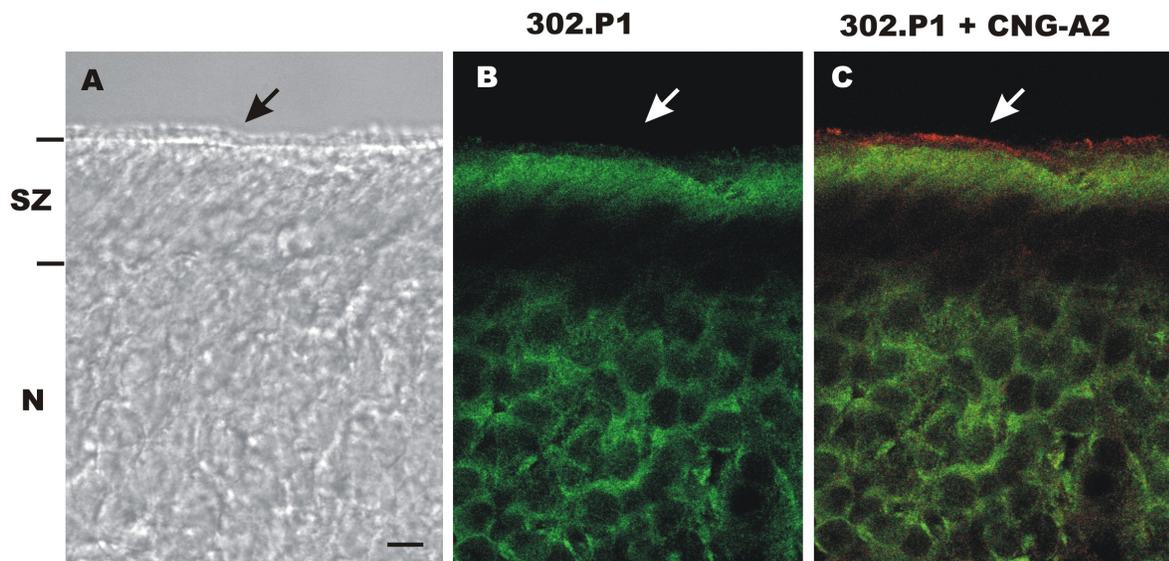


Abbildung 3.10: Immunhistochemische Lokalisierung von rCLCA1 im Riechepithel der Ratte. (A) Durchlichtbild eines 25 μm dicken, koronaren Ratten-Nasenschnitts, aufgenommen mit Nomarski-Optik. Die Lage des Ziliensaums wird mit einem Pfeil angedeutet (Pfeilspitze von der apikalen Seite auf den Ziliensaum). (SZ) Stützzellschicht; (N) Neuronenzellschicht. (B) Färbung desselben Schnitts mit 302.P1. (C) Übereinanderlagerung der in (B) gezeigten rCLCA1-Färbung mit einer CNG-A2-Färbung desselben Schnitts. Rot wird die CNG-A2-Fluoreszenz dargestellt, grün die rCLCA1-Färbung. Eine Kolokalisation wird gelb dargestellt. (Balken: 50 μm)

Im Folgenden wurden Schnitte des olfaktorischen Epithels mit den P1- und P3-Antikörpern gegen rCLCA1 inkubiert und am konfokalen Laserscanning-Mikroskop ausgewertet. Die

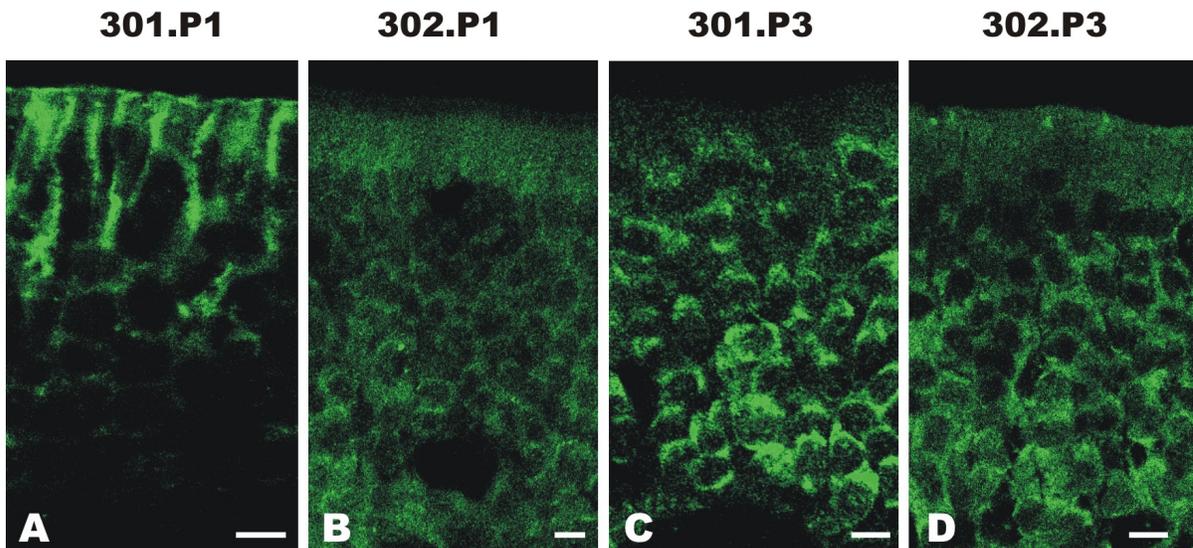


Abbildung 3.11: Unterschiedliche Färbemuster der rCLCA1-Antikörper gegen P1 und P3 auf Rattennasenschnitten. (A) 301.P1; (B) 302.P1; (C) 301.P2; (D) 302.P2. (Balken: 50 μm)

Färbungen sind in Abb. 3.11 gezeigt. Abb. 3.11 (A) zeigt einen koronaren Schnitt der Rattennase, der mit dem P1-Antikörper 301.P1 inkubiert wurde. Im Gegensatz zur CNG-A2-Färbung tritt auch die 301.P1-Immunfluoreszenz nicht im Ziliensaum des Riechepithels auf. Die Färbung liegt vielmehr knapp unterhalb der Riechzellknöpfe. Zusätzlich werden Zellzwischenräume gefärbt, vor allem in der Stützzellschicht, aber auch in der Neuronenzellschicht. Bei Inkubation mit dem zweiten P1-Antikörper, 302.P1, findet man ein starkes Fluoreszenz-Signal in den Zellkörpern der Riechneuronen (s. 3.11 (B)). Hier tritt keine Färbung in Höhe der Stützzellschicht oder unterhalb der Zilienknöpfe auf. Es werden keine Zellzwischenräume gefärbt. Die beiden P1-Antikörper zeigen also sehr unterschiedliche Färbemuster.

In Abbildung 3.11 (C) und 3.11 (D) sind Färbungen des Riechepithels mit den P3-Antikörpern 301.P3 und 302.P3 gezeigt. Während 301.P3 nur einen schmalen Saum unterhalb der Zilien färbt, ist das Fluoreszenz-Signal mit 302.P3 über das gesamte Epithel verteilt. Es befindet sich sowohl in den Zwischenräumen der Riechzellneurone als auch in punktförmigen Strukturen, die in Nähe der Riechzellknöpfe auftreten.

Betrachtet man die Fluoreszenz-Signale der Antikörper 301.P1, 301.P3 und 302.P3, die einen schmalen Saum unterhalb der Zilien färben, in einer höheren Vergrößerung und in räumlicher Auflösung, so erkennt man, dass die angefärbten Strukturen eine Art Kringel bilden, der das untere Ende der Zilienknöpfe umfasst (s. Abb. 3.12 (A), entnommen aus Jülich, 2002).

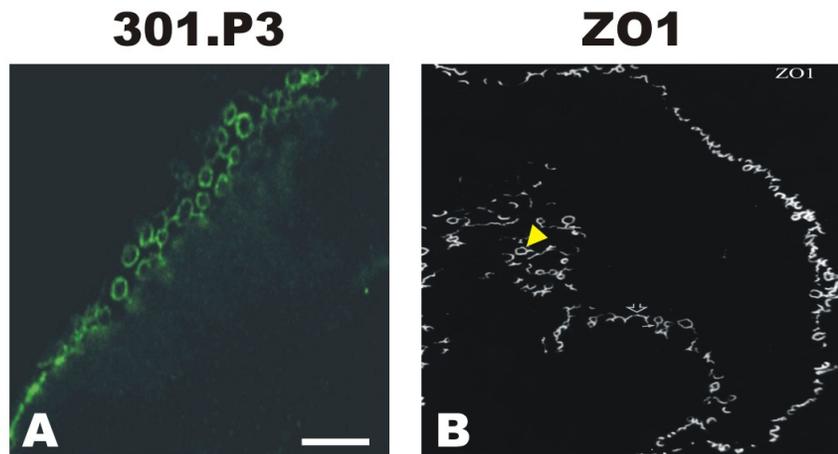


Abbildung 3.12: Analyse der kringelartigen Färbungen von rCLCA1-Antikörpern im Riechepithel. Vergleich der Strukturen, die der rCLCA1-Antikörper 301.P3 färbt (A), mit der Färbung, die der Antikörper gegen das Zonula occludens-Protein 1 (ZO1) ergibt (B). Die Kringel (z.B. gelber Pfeil in B) sind sichtbar, wenn das Riechepithel leicht schräg angeschnitten wurde. [(A) entnommen aus Jülich, 2002; (B) wurde freundlicherweise von Dr. E. Asan zur Verfügung gestellt]

Eine Diplomarbeit, die in unserer Arbeitsgruppe angefertigt wurde (Jülich, 2002; IBI-1; Forschungszentrum Jülich), befasst sich ausführlich dieser Fluoreszenz-Färbung. Die Untersuchungen ergaben, dass die drei rCLCA1-Antikörper Tight-Junctions detektieren. In Abb. 3.12 (B) wird die Färbung eines Riechepithelschnitts mit einem Antikörper gegen das Tight-Junction-Protein ZO1 (zonula occludens protein 1) gezeigt (Foto zur Verfügung gestellt von Dr. E. Asan, Universität Würzburg). Der Vergleich der beiden in 3.12 dargestellten Färbemuster zeigt deutlich, dass rCLCA1 tatsächlich Tight-Junction-Strukturen detektiert.

Im Tabelle 3.5 werden die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den rCLCA1-Antikörpern auf olfaktorischem Epithel zusammengefasst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Antikörper unterschiedliche Färbemuster auf olfaktorischem Epithel zeigen. Die immunhistochemischen Untersuchungen sind somit nicht interpretierbar, da man davon ausgehen muss, dass mehrere Antikörper gegen unterschiedliche Bereiche desselben Proteins ein identisches Färbemuster ergeben. Dieses Kriterium ist hier nicht erfüllt, deshalb muss die Spezifität der Antikörper für immunhistochemische Anwendungen angezweifelt werden. Es muss betont werden, dass keiner der rCLCA1-Antikörper olfaktorische Zilien färbt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Westernblot-Analyse.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse olfaktorischen Epithels mit rCLCA1-Antikörpern.

Antikörper	Immunhistochemische Färbungen auf Riechepithelschnitten
301.P1	keine Zilien; Tight-Junctions; Zellzwischenräume
302.P1	keine Zilien; Neuronenzellkörper
301.P3	keine Zilien; Tight-Junctions
302.P3	keine Zilien; Tight-Junctions; Neuronenzellkörper

3.3 Funktioneller rCLCA1-Nachweis in transfizierten Zellen

Obwohl die rCLCA1-Antikörper in der Immunhistochemie keine Zilienfärbung ergaben, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass rCLCA1 den Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal der Riechzellen bildet, oder ein Teil des Proteins ist. Es gibt ein prominentes Beispiel dafür, dass ein Protein wohl im Westernblot, aber nicht immunhistochemisch nachweisbar ist: die CNG-A4-Untereinheit (persönliche Mitteilung von Dr. F. Müller, IBI-1, Forschungszentrum Jülich). Die Westernblot-Analysen zeigen im Gegensatz zur Immunhistochemie, dass rCLCA1 in den Membranproteinen von Ratten-Riechzilien exprimiert wird und in den Zilien gegenüber olfaktorischem Epithel angereichert ist. Beides spricht dafür, dass rCLCA1 Teil der Riechsignalkaskade sein könnte.

Im folgenden Abschnitt soll die Funktion von rCLCA1 in transfizierten Zellen untersucht werden. Besitzt rCLCA1 die Eigenschaften eines Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanals, wie das für andere Mitglieder der CLCA-Familie postuliert wurde (Gruber et al., 2000; Fuller und Benos, 2000)?

Die folgenden Versuche zur Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Leitfähigkeit *rclca1*-transfizierter Zellen, wurden im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe angefertigt (Strünker, 2002). In dieser Arbeit wurde ein Messprotokoll entwickelt, bei dem die Methoden des Patch-Clampings und des Ca^{2+} -Imagings mit Caged- Ca^{2+} -Verbindungen kombiniert werden, um Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme aus dem Gesamtstrom der untersuchten Zelle zu isolieren. Das Interessante an dieser Methode ist, dass durch Verwendung der Caged- Ca^{2+} -Verbindungen

die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle in weniger als 1 ms auf über 10 μM angehoben werden kann. Gleichzeitig wird die Ca^{2+} -Freisetzung durch einen Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff nachgewiesen und der Strom über die Zellmembran mit einer Patch-Pipette gemessen. Für solche Messungen wurden HEK293-Zellen mit einer Kombination aus 0,4 μg ECFP und 4 μg pCis-rCLCA1#3 DNA transfiziert. Zur Transfektionskontrolle wurden HEK293-Zellen mit 0,4 μg eines ECFP (*enhanced cyano-fluorescent protein*)-Expressionsplasmids transfiziert.

Zunächst wurde das Expressionssystem HEK293 auf endogene Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Leitfähigkeit getestet. Dazu wurden ECFP-transfizierte HEK293-Zellen über die Pipettenlösung mit 5 mM caged- Ca^{2+} und 10 μM des Ca^{2+} -Farbstoffs Fluo-5F 10 min beladen und dann das Ca^{2+} aus seiner Caged-Verbindung durch einen UV-Blitz freigesetzt. Die Freigabe des Ca^{2+} und der daraus resultierende Cl^- -Strom wurden simultan aufgezeichnet.

In Abb. 3.13 ist ein solches Kontrollexperiment dargestellt.

Die untere Spur zeigt die Fluoreszenzänderung des Fluo-5F nach Ca^{2+} -Freisetzung. Der Zeitpunkt der UV-Blitze ist durch Pfeile gekennzeichnet. Man sieht, dass die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle sprunghaft ansteigt und langsam wieder abnimmt. Diese Freisetzung kann mehrfach hintereinander mit gleichbleibender Quantität ausgelöst werden. In der oberen Spur ist die Stromantwort der Zelle wiedergegeben. Das Haltepotenzial (+30 mV) und die Zusammensetzung der Pipetten- und Badlösung wurde so gewählt, dass Cl^- bei Öffnung eines Cl^- -Kanals einen Auswärtsstrom erzeugt. Da ein Cl^- -Strom unter diesen Bedingungen nicht von einem K^+ -Strom zu unterscheiden wäre, wurde in den verwendeten Lösungen K^+ vollständig durch impermeables Cs^+ ersetzt. Bei einigen ECFP-transfizierten HEK293-Zellen wurde ein Auswärtsstrom von wenigen Picoampere (pA) gemessen. Diese Kontrolle wurde an 18 ECFP-positiven Zellen durchgeführt. Bei keiner Zelle war dieser Strom größer als 15 pA.

Unter identischen Bedingungen wurden *rclca1*-und ECFP-kotransfizierte HEK293-Zellen gemessen. Für die Ableitungen wurden ausschließlich ECFP-positive Zellen verwendet. Die Stromantwort auf die Ca^{2+} -Freisetzung unterscheidet sich deutlich von den Kontrollmessungen. Wie in Abb. 3.14 zu erkennen ist, entsteht durch die Transfektion mit *rclca1* eine neue Leitfähigkeit. Durch wiederholte Ca^{2+} -Freisetzung konnte mehrmals ein Auswärtsstrom von 50-75 pA aktiviert werden. Der Strom wurde jedoch nicht bei jeder Ca^{2+} -Freisetzung gemessen. Bei einigen Zellen ließ sich nur bei der ersten Ca^{2+} -Freisetzung ein Cl^- -Strom erzeugen.

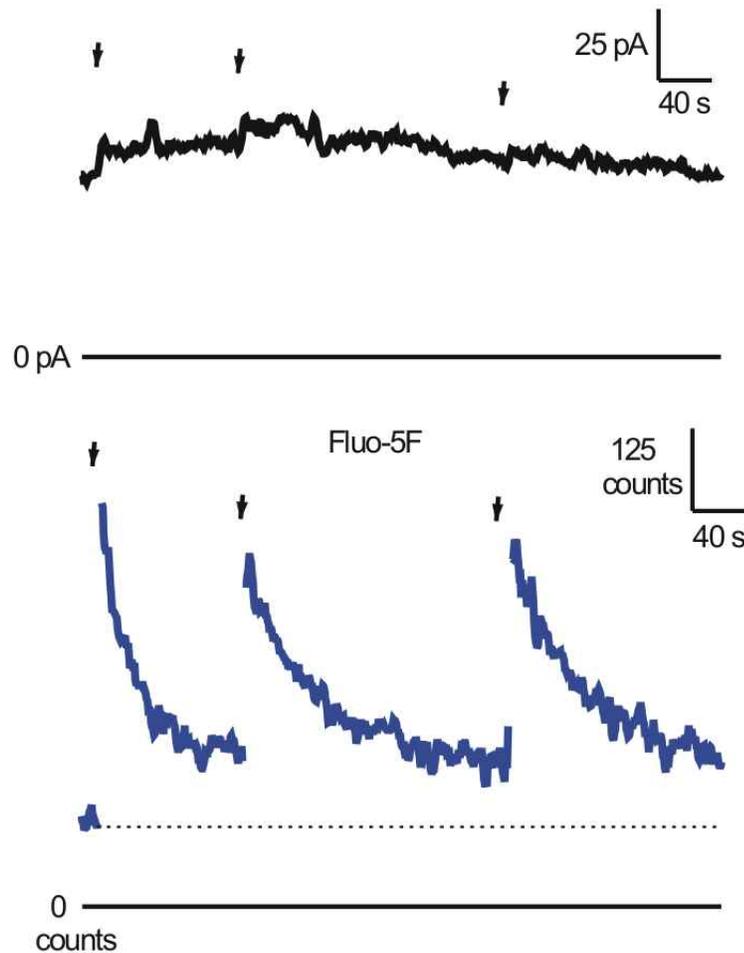


Abbildung 3.13: Test auf endogene Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme im verwendeten Expressionssystem. HEK293-Zellen wurden mit $0,4 \mu\text{g}$ ECFP transfiziert und zwei Tage später durch Patch-Clamping in der Whole-Cell-Konfiguration vermessen. (Badlsg.: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES und 10 mM EDTA; pH 7,4 (NaOH); Pip.lsg.: 100 mM CsCl; 20 mM TEA-Cl; 20 mM HEPES; 5 mM Na_2ATP ; 0,3 mM Na_3GTP ; 30 mM Glucose; 5 mM Caged- Ca^{2+} ; pH 7,2 (CsOH). Die Zellen waren vorher 10 min mit dem Ca^{2+} -Farbstoff Fluo-5F beladen worden. Durch 100 ms lange UV-Blitze (Pfeile) wurden bis zu $30 \mu\text{M}$ Ca^{2+} der Caged-Verbindung freigesetzt (untere Spur). Die obere Spur zeigt die Stromantwort der Zelle bei $V_M = +30 \text{ mV}$ (Abbildung zur Verfügung gestellt von T. Strünker, Strünker, 2002).

Obwohl die Ca^{2+} -Signale in ihrer Größe konstant blieben, ließ sich kein weiterer Cl^- -Ausstrom erzeugen. Vergleicht man die Dauer der Ca^{2+} -Signale mit der Dauer der durch sie induzierten Ströme, fällt auf, dass die Cl^- -Antworten kürzer waren als das auslösende

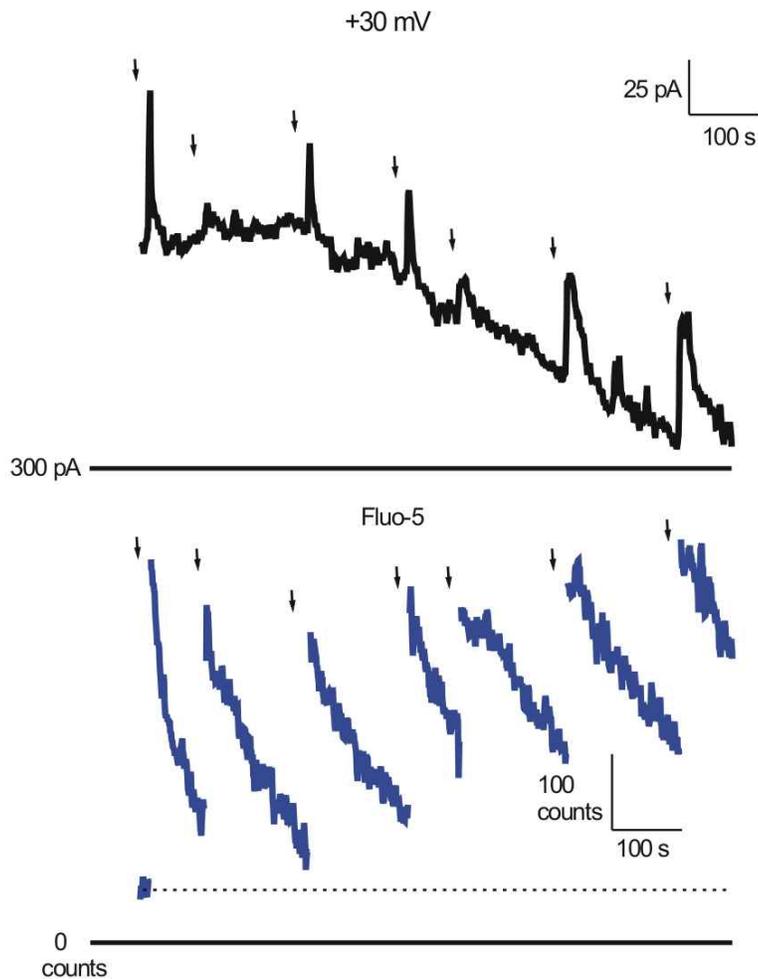


Abbildung 3.14: Ca^{2+} -aktivierte Ströme in einer *rclca1*- und ECFP-kotransfizierten HEK293-Zelle. HEK293-Zellen wurden mit $2 \mu\text{g rclca1} + 0,4 \mu\text{g ECFP}$ kotransfiziert und zwei Tage später durch Patch-Clamping in der Whole-Cell-Konfiguration vermessen. (Badlsg.: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES und 10 mM EDTA; pH 7,4 (NaOH); Pip.lsg.: 100 mM CsCl; 20 mM TEA-Cl; 20 mM HEPES; 5 mM Na_2ATP ; 0,3 mM Na_3GTP ; 30 mM Glucose; 5 mM Caged- Ca^{2+} ; 10 μM Fluo-5F; pH 7,2 (CsOH). Die Zellen waren 10 min vor der Messung mit dem Ca^{2+} -Farbstoff Fluo-5F beladen worden. Durch 100 ms lange UV-Blitze (Pfeile) wurden bis zu 30 μM Ca^{2+} der Caged-Verbindung freigesetzt (untere Spur). Die obere Spur zeigt die Stromantwort der Zelle bei $V_M = +30 \text{ mV}$ (Abbildung zur Verfügung gestellt von T. Strünker, Strünker, 2002).

Ca^{2+} -Signal. Bei der in Abb. 3.14 gezeigten Messung fällt zum Beispiel das Stromsignal nach Ca^{2+} -Freisetzung innerhalb von 3 s auf die Hälfte des Maximalwertes ab, das Ca^{2+} -Signal selbst dagegen erst nach 30 s.

Die Amplituden des durch Ca^{2+} ausgelösten Cl^- -Stroms lagen zwischen 40 und 175 pA.

Insgesamt wurden nur in 8 von 47 untersuchten, ECFP-positiven Zellen Ca^{2+} -aktivierte Ströme gemessen. Es wurde davon ausgegangen, dass die untersuchten Zellen, die keinen Ca^{2+} -aktivierten Strom zeigten, dennoch rCLCA1 exprimierten, da nur ECFP-positive Zellen untersucht wurden. Es wurde vor Beginn der Messungen in einer immunhistochemischen Studie gezeigt, dass Zellen, die ECFP-positiv waren, auch rCLCA1 exprimierten.

Einige *rclca1*-transfizierte Zellen erhalten also eine zusätzliche Cl^- -Leitfähigkeit, die durch Ca^{2+} induziert wird. Die Eigenschaften des durch rCLCA1 induzierten Stroms unterscheiden sich wesentlich von denen des nativen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanals. Die durch die UV-Blitze freigesetzte Ca^{2+} -Menge (ca. $30 \mu\text{M}$) scheint nicht für die normale Funktion des Proteins auszureichen, wohingegen der native Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal durch einen $K_{1/2}$ -Wert von $2 \mu\text{M}$ charakterisiert wird (Reisert et al., 2003). Es ist möglich, dass zur funktionellen Expression des Kanals weitere Untereinheiten vonnöten sind, welche die Ca^{2+} -Sensitivität des Proteins steuern. Ein solches Prinzip heterooligomerer Kanalproteine ist eher die Regel als eine Ausnahme (z.B. HCN- und CNG-Kanäle: Kaupp und Seifert, 2002; Kaupp und Seifert, 2001). Koexpressionen von rCLCA1 mit anderen bislang klonierten CLCA-Proteinuntereinheiten aus der Maus (mCLCA1, mCLCA2, mCLCA3) brachte allerdings keinen, dem nativen Kanal ähnlicheren Cl^- -Strom in HEK293-Zellen (persönliche Mitteilung von Dr. H. Kaneko).

Es wird angenommen, dass CLCA-Proteine proteolytisch in zwei Fragmente geschnitten werden (Ji et al., 1998; Cunningham et al., 1995; Zhu et al., 1991; Elble et al., 1997; Gandhi et al., 1998; Gruber et al., 1998; Gruber und Pauli, 1999b). Die in 3.2.1 gezeigten Westernblot-Analysen sprechen dafür, dass rCLCA1 im Vergleich zu Riechzilien im artifizialen Expressionssystem nicht vollständig prozessiert vorliegt. Es besteht folglich die Möglichkeit, dass die elektrophysiologische Eigenschaften von rCLCA1 durch eine unvollständige Trennung im heterologen Expressionssystem verändert wird.

3.4 Proteolytische Prozessierung

3.4.1 Wird rCLCA1 proteolytisch prozessiert?

Der Vergleich der rCLCA1-Proteine aus transfizierten tsA-Zellen und aus Riechzilien impliziert, dass zunächst ein ca. 125 kDa großes Vorläuferprotein gebildet wird, das posttranslational in zwei Fragmente von ca. 97 kDa und ca. 35 kDa gespalten wird. In Zilien findet man dieses Vorläuferprotein nicht, was darauf hindeutet, dass die vollständige Trennung des Proteins für seine Eigenschaften wichtig sein könnte. In transfizierten tsA-Zellen liegt das rCLCA1-Protein fast ausschließlich in der 125 kDa-Form vor. Proteolytische Prozessierung findet hier also nur in geringem Ausmaß statt. Es wäre möglich, dass dem heterologen Expressionssystem eine spezifische Protease-Ausstattung fehlt, die für diesen Schritt nötig ist, oder aber, dass das Protein dermaßen überexprimiert wird, dass die Gesamt-rCLCA1-Menge von der vorhandenen Protease nur zu einem geringen Prozentsatz gespalten wird.

Wird das rCLCA1-Protein in anderen Zelllinien effektiver in die 97 kDa und 35 kDa Fragmente gespalten? Um diese Frage zu klären, wurde die Westernblot-Analyse mit folgenden *rclca1*-transfizierten Ammenzelllinien wiederholt: Neuro2a, eine Maus-Neuroblastom Zelllinie; SK-N-SH-Zellen, eine menschliche Neuroblastom Zelllinie; HEK293 Zellen, eine menschliche embryonale Nieren-Krebszelllinie. Abb. 3.15 zeigt am Beispiel des P1-Antikörpers 301.P1, welche rCLCA1-Produkte bei Transfektion von (in dieser Reihenfolge) HEK293-, tsA-, Neuro2a- und SK-N-SH-Zellen entstehen. Es wurden jeweils links Membranproteine des Wildtyps der jeweiligen Zelllinie und rechts die Membranproteine der transfizierten Zellen aufgetragen. In jeder Spur wurden 15 μg der Membranproteinfraktionen aufgetragen, die vorher mit derselben Menge des Transfektionsplasmids pCDNA 3.1 Amp-rCLCA1 transfiziert wurden.

HEK293-Zellen zeigten nur ein einziges spezifisches Produkt bei 125 kDa, während das Protein in der Maus-Neuroblastom-Zelllinie Neuro2a anscheinend wie in tsA-Zellen prozessiert wurde. Hier war neben der 125 kDa-Bande zusätzlich eine schwächere Doppelbande bei ca. 97 kDa zu sehen. Zusätzlich gaben Neuro2a- Wildtyp-Proteine mehrere Hintergrundbanden, die bei tsA- und HEK293-Zellen nicht auftraten. SK-N-SH-Zellen exprimieren rCLCA1 gar nicht.

Scheinbar findet die Prozessierung des rCLCA1-Vorläuferproteins nicht in jeder der un-

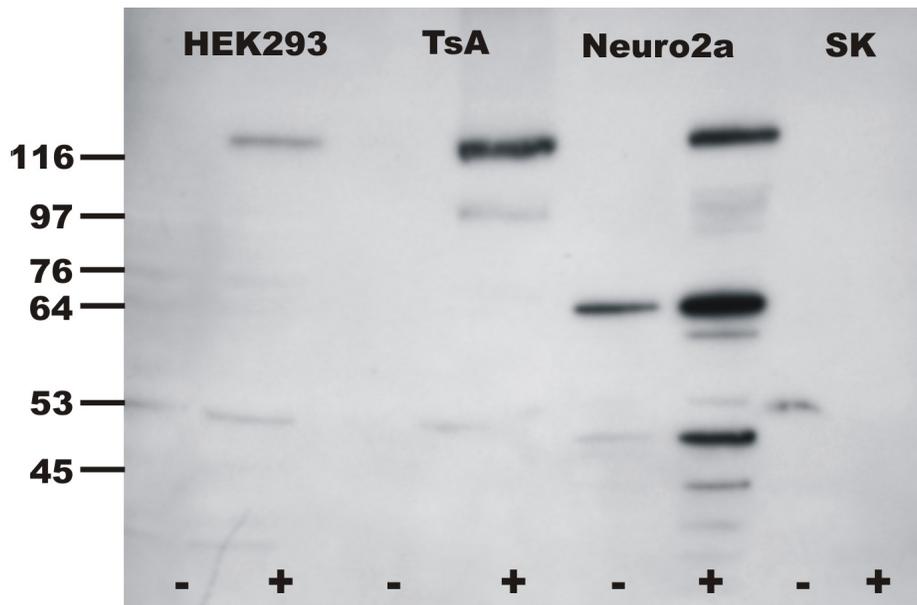


Abbildung 3.15: Untersuchung der rCLCA1-Expression in unterschiedlichen Zelllinien. Je 15 μg Membranproteine von HEK293-, tsA-, Neuro2a- und SK-Zellen, die entweder mock-transfiziert wurden (-) oder mit je 4 μg pCDNA 3.1 rCLCA1 transfiziert wurden (+), wurden durch SDS-PAGE auf einem Gradientengel (5-12,5%) aufgetrennt. Der Westernblot wurde mit dem rCLCA1-Antikörper 301.P1 inkubiert.

tersuchten Zelllinien statt. TsA- und Neuro2a-Zellen schienen geeigneter für die rCLCA1-Expression als HEK293- und vor allem als SK-N-SH-Zellen. Sowohl tsA- als auch Neuro2a-Zellen stellten ein rCLCA1-Produkt her, das der Größe des in Zilien auftretenden Proteins entsprach. Im Vergleich gaben Neuro2a-Wildtyp-Proteine jedoch mehr Hintergrund mit dem verwendeten Antikörper als tsA-Wildtypzellen und waren somit auch weniger gut für weitere immunhistochemische Versuche geeignet. TsA-Zellen exprimierten die durch die unterschiedlichen rCLCA1-Antikörper charakterisierten Proteine nicht nur in großer Menge, sondern gaben zudem wenig Hintergrund mit den verwendeten Antikörpern. Keine der getesteten Zelllinien zeigte jedoch das gleiche Bild wie in Riechzilien: die vollständige Prozessierung des rCLCA1-Proteins.

3.4.2 Wird die unter CLCA-Proteinen konservierte Protease-Erkennungsstelle verwendet?

Für hCLCA1, hCLCA2 und pCLCA1 wird nach der Vorhersage von Devi (1991), basierend auf den Regeln für das Prozessieren von Proteinen an monobasischen Stellen, eine mögliche Schnittstelle postuliert (Gruber et al., 1998; Gruber und Pauli, 1999b; Gaspar et al., 2000). Bei hCLCA1 soll diese Schnittstelle nach Arginin (R) 660 (bei hCLCA2: R663; pCLCA1: R662) liegen. Legt man die bekannten Sequenzen aller CLCA-Proteine übereinander (s. Anhang), so erkennt man, dass diese Stelle hoch-konserviert ist. Jede dieser Sequenzen besitzt das betreffende Arginin, außer dem trunkierten Protein hCLCA3, dessen Sequenz vorher abbricht.

Um zu überprüfen, ob rCLCA1 möglicherweise an dieser konservierten, potenziellen Schnittstelle prozessiert wird, wurden über einen molekularbiologischen Ansatz die angenommenen Produkte artifiziell hergestellt, in Expressionsvektoren kloniert und für die Transfektion von tsA-Zellen verwendet. Die angewendete Klonierungsstrategie wird in Abb. 3.16 gezeigt.

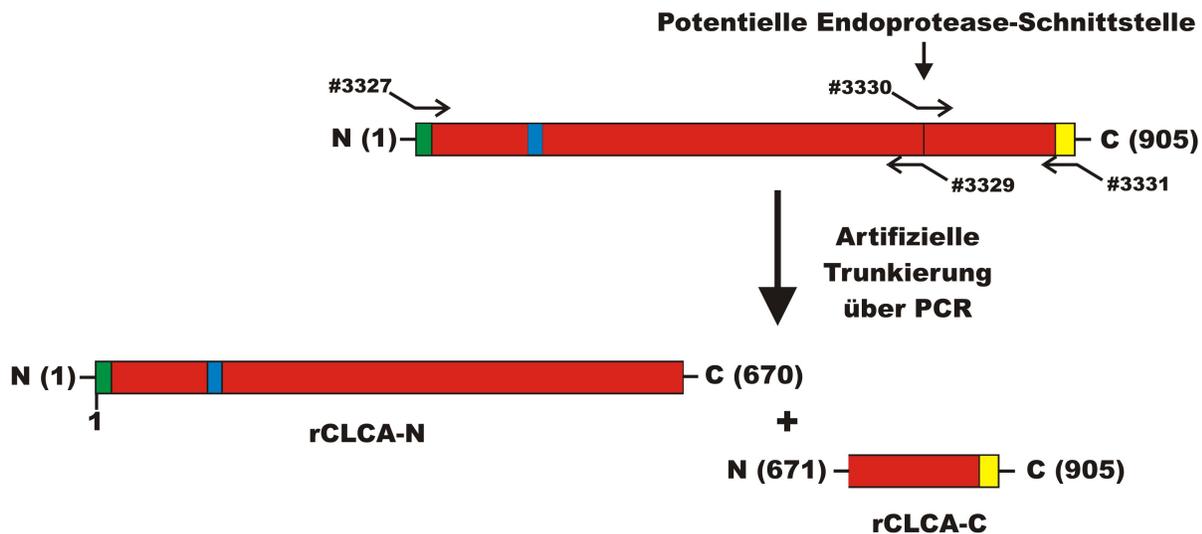


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der rCLCA1-Trunkierungsstrategie. Über PCR wurden anhand des rCLCA1-Expressionsplasmids pCDNA 3.1 Amp-rCLCA1 mit den Primerpaaren #3327/3329 und #3330/3331 die postulierten rCLCA1-Teilkline rCLCA1-N und rCLCA1-C hergestellt. Jeder Primer wird durch einen geknickten Pfeil angedeutet. Dafür wurde die in CLCA-Proteinen konservierte potenzielle Endonuklease-Schnittstelle (Pfeil) nach Arginin 670 ausgewählt.

Bei rCLCA1 könnte die Prozessierung nach Arginin 670 stattfinden. Das rCLCA1-Konstrukt, das den N-Terminus kodiert (rCLCA1-N), wurde über PCR mit dem Primerpaar #3327/3329 (s. Anhang) auf dem Expressionsklon pcDNA3.1 Amp-rCLCA1 hergestellt. Über den 3'-Primer wurde dem N-terminalen Fragment das Stopp-Codon TAA angefügt. Das C-terminale Fragment (rCLCA1-C) wurde mit dem Primerpaar #3330/3331 (s. Anhang) hergestellt. Hier wurden über den 5'-Primer eine künstliche Kozak-Sequenz (CCACC) für die Bindung der Ribosomen und das Start-Codon ATG angefügt. Eine Signalsequenz, wie sie der Protein-Primärsequenz nach am N-Terminus des rCLCA1-Proteins vorkommt, wurde dem C-terminalen Fragment nicht angefügt. Die errechneten Molekulargewichte der Fragmente betragen 74 kDa (N-Terminus) und 26 kDa (C-Terminus).

Die so hergestellten Teilkclone wurden durch Westernblot-Analyse mit den nachgewiesenen rCLCA1-Produkten verglichen. Die Membranproteine *rclca1-n*- und *rclca1-c*-transfizierter tsA-Zellen wurden präpariert, durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran immobilisiert und mit den Antikörpern gegen rCLCA1 untersucht. Für den in Abb. 3.17 gezeigten Westernblot wurden nebeneinander Zilien-Membranproteine und Membranproteine *rclca1-n*-transfizierter Zellen auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und die PVDF-Membran mit dem P3-Antikörper 301.P3 inkubiert.

Man erkennt, dass das artifiziell trunkierte rCLCA1-Spaltprodukt kleiner als das Protein aus Zilien war. Untersucht man auf dieselbe Weise das künstlich trunkierte C-terminale Fragment mit einem Antikörper gegen das C-terminale Fusionsprotein, z.B. DchB, erkennt man, dass der C-Terminus dagegen ein wenig größer als das Zilienprotein war (Abb. 3.17).

3.4.3 Funktionelle Untersuchung des trunkierten rCLCA1-Klons

Wenn das heterolog exprimierte rCLCA1-Protein sich vom nativen Ca^{2+} -aktivierten Cl^{-} -Kanal nur dadurch unterscheidet, dass es in tsA-Zellen nicht prozessiert wird, dann müsste es möglich sein, mit den artifiziell prozessierten Fragmenten rCLCA1-N und rCLCA1-C einen funktionellen Cl^{-} -Kanal in tsA-Zellen zu rekonstituieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden tsA-Zellen sowohl mit den beiden rCLCA1-Teilklonen rCLCA1-N und rCLCA1-C als auch zur Transfektionskontrolle mit einem CFP-Expressionsplasmid kotransfiziert. Die so

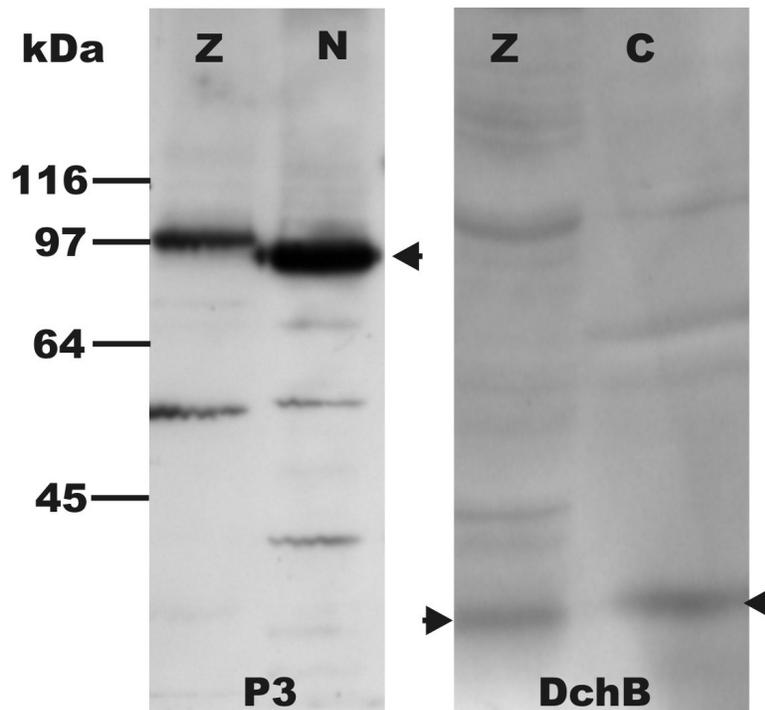


Abbildung 3.17: Vergleich der artifiziell hergestellten rCLCA1-Teilklone (rCLCA1-N und - C) mit dem rCLCA1-Protein aus Zilien. tsA-Zellen wurden mit 4 μg pCDNA3.1 Amp-rCLCA1-C oder 8 μg pCNDNA3.1 Amp-rCLCA1-N transfiziert. Je 15 μg ihrer Membranproteine wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und der Westernblot mit dem P3-Antikörper 301.P3 (links) und DchB (rechts) inkubiert.

transfizierten Zellen wurden von Dr. H. Kaneko (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) mit dem in 3.4 beschriebenen Protokoll untersucht. Ca^{2+} wurde in der Zelle durch einen UV-Blitz aus seiner Caged-Verbindung DM-Nitrophen in weniger als 1 ms freigesetzt. Dadurch wurde in tsA-Zellen, die mit beiden rCLCA1-Fragmenten kotransfiziert waren, ein Cl^- -Efflux induziert. In den Kontrollzellen, die lediglich mit CFP transfiziert waren, wurde kein zusätzlicher Cl^- -Efflux gemessen. In Abb. 3.18 ist eine solche Messung gezeigt. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nach dem UV-Blitz (Pfeil), der durch den Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-5F gemessen wurde, ist in der oberen Spur dargestellt, der dadurch induzierte Cl^- -Strom in der unteren Spur. Ähnlich wie bei *rclca1*-transfizierten Zellen ist die Amplitude des Stroms, der durch Kotransfektion der artifiziell prozessierten Fragmente rCLCA1-N und rCLCA1-C in tsA-Zellen entsteht, zehnfach kleiner als die des nativen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms der Riechzellen. Zudem zeigen nur 30% der untersuchten, CFP-positiven Zellen einen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strom. Somit unterscheiden sich die durch Ca^{2+} -induzierten

Cl^- -Leitfähigkeiten in Zellen, die mit dem vollständigen rCLCA1-Konstrukt transfiziert wurden, nicht von denen, die durch Kotransfektion mit den künstlich trunkierten rCLCA-Konstrukten entstanden. Die Funktion des rCLCA1-Proteins hängt scheinbar nicht - oder nicht nur - mit seiner Prozessierung zusammen. Vielleicht ist aber auch die in 3.4.2 beschriebene Schnittstelle nicht diejenige, die für die proteolytische Prozessierung des nativen Proteins verwendet wird, was die Westernblot-Analyse der artifiziell trunkierten rCLCA1-Konstrukte nahelegt. Andererseits wird in der Literatur Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme auch bei extrem trunkierten CLCA-Proteinen beschrieben (Ji et al., 1998).

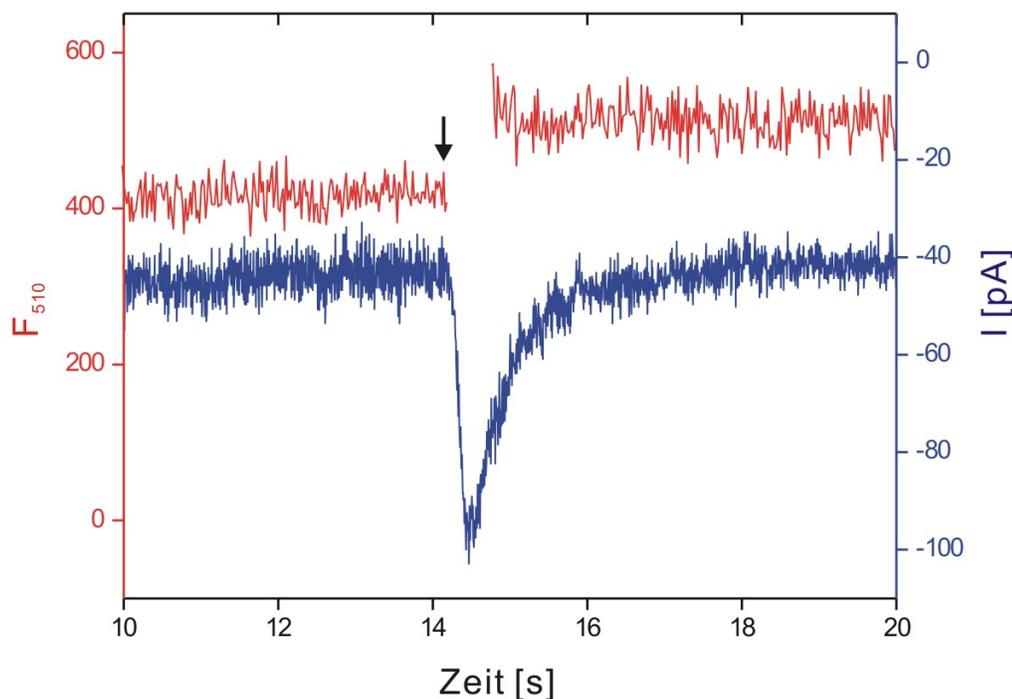


Abbildung 3.18: Funktionelle Untersuchung der artifiziell prozessierten rCLCA1-Klone. *rclca1-n-*, *rclca1-c-* und ECFP-kotransfizierte Zellen wurden in der Whole-Cell-Konfiguration vermessen. Badlsg.: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES und 10 mM EDTA; pH 7,4 (NaOH); Pip.lsg.: 100 mM CsCl; 20 mM TEA-Cl; 20 mM HEPES; 5 mM Na_2ATP ; 0,3 mM Na_3GTP ; 30 mM Glucose; 5 mM Caged- Ca^{2+} ; pH 7,2 (CsOH) Beladezeit mit dem Farbstoff: 10 min; $V_M = +30$ mV; Stromsignal (unten) und Ca^{2+} -Signal (oben) wurden simultan aufgenommen. Die obere Spur gibt die gemessene Fluo-5F-Fluoreszenz an. Der Anstieg ist bei Belichtung mit einem UV-Blitz nicht sehr hoch, da hier zum Teil auch die CFP-Fluoreszenz mit aufgezeichnet wurde. Der sprunghafte Anstieg der Fluoreszenz kann nicht mit der absoluten Menge des freigesetzten Ca^{2+} in Verbindung gebracht werden, sondern kann hier lediglich als Marker für den Zeitpunkt der Ca^{2+} -Freisetzung dienen. (Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. H. Kaneko.)

3.5 Untersuchung eines einfachen Riechzellsystems: die Odora-Zell-linie

Die Frage, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollte, war: Ist rCLCA1 ein Teil des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanals, der den depolarisierenden Rezeptorstrom der Riechzelle bewirkt? Obwohl einige der bisher gezeigten Daten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von rCLCA1 an der Riechsignalkaskade lieferten, führten die Untersuchungen am olfaktorischen Epithel und an den rCLCA1-transfizierten Zellen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Es ist möglich, dass rCLCA1 Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme in Riechzellen bewirkt, jedoch weitere Untereinheiten oder akzessorische Proteine wie z.B. Calmodulin oder spezifische Kinasen benötigt werden, um seine volle Funktion zu entwickeln. Diese Fragen können nicht in dem relativ komplizierten System des Riechepithels oder mit Hilfe von transfizierten Zellen beantwortet werden, die sich stark von Riechneuronen unterscheiden. Es wird vielmehr ein zelluläres System benötigt, das in hoher Quantität erhältlich ist, frei von jeglichem nicht-neuronalem Gewebe, und das jedoch das Milieu der Riechzellen besitzt, also zum Beispiel die Komponenten der Riechsignalkaskade enthält.

Ein solches System stellen Riechneuronen-Zelllinien, z.B. die Odora-Zelllinie (Murell und Hunter, 1999), dar. Odora-Zellen sind konditional immortalisierte Riechzellen der Ratte, die in ihrem Phänotyp Riechneuron-Vorläuferzellen (Basalzellen) ähneln. Sie besitzen viele Komponenten, die eine Riechzelle auszeichnen: Odora-Zellen sind z.B. immunpositiv für die Adenylzyklase (AC) III und das Markerprotein der Riechneuronen, "OMP" (olfactory marker protein). Durch Zugabe von Dopamin und Insulin zum Medium lassen sich Odora-Zellen weiter differenzieren. Sie exprimieren dann erst zum Beispiel den Riechzell-spezifischen CNG-Kanal und olfaktorische Rezeptorproteine (Murell und Hunter, 1999).

Falls Odora-Zellen Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme besitzen, wären sie ein einfaches System, um die Korrelation von rCLCA1 und dem Cl^- -Strom zu überprüfen.

3.5.1 Funktioneller Nachweis des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms in Odora-Zellen

Die Untersuchung des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms in Odora-Zellen erfolgte mit dem in 3.3 beschriebenen Patch-Clamp-Protokoll. Undifferenzierte Odora-Zellen wurden vor der Messung über die Pipettenlösung mit der Caged- Ca^{2+} -Verbindung 5 mM DM-Nitrophen und mit 20 μM des Ca^{2+} -Farbstoffs Fluo-5F beladen. Nach 10 min wurde Ca^{2+} durch einen 500 ms langen UV-Blitz aus der Caged-Verbindung freigesetzt. Das Haltepotenzial betrug während der Messung -40 mV. In Abb. 3.19 ist ein Beispiel für die Messung an einer Zelle gezeigt. Die rote Spur zeigt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung der Zelle, gemessen an der Fluo-5F-Fluoreszenz. Bei Freisetzung von Ca^{2+} (Pfeilspitze) steigt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ schlagartig an. Damit einhergehend wird ein Einwärtsstrom mit einer Amplitude um 0,75 nA gemessen. Der Strom fällt erst nach ca. 10 s wieder auf das Grundniveau ab und unterscheidet sich dadurch deutlich von dem stark transienten Strom, der in *rclca1*-transfizierten Zellen gemessen wurde. Der Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Strom der Odora-Zellen wird in über 80% der Zellen gemessen und entspricht in seinen Eigenschaften (Ca^{2+} -Empfindlichkeit, Pharmakologie, Leitfähigkeit für unterschiedliche Halidionen) dem nativen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strom der Ratten-Riechzellen (persönliche Mitteilung von Dr. H. Kaneko).

3.5.2 rCLCA1-Expression in Odora-Zellen

Abschnitt 3.5.1 hat gezeigt, dass Odora-Zellen im nicht-induzierten Zustand Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme exprimieren, deren Eigenschaften denen des nativen Riechzellstroms entsprechen. Es wurde nun überprüft, ob Odora-Zellen das rCLCA1-Protein exprimieren, und ob es im Zusammenhang mit dem Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strom der Zellen steht. Dazu standen zunächst die verschiedenen, am Anfang der Arbeit auf transfizierten Zellen charakterisierten Antikörper für immunzytochemische Versuche und Westernblot-Analysen zur Verfügung. Da Murell und Hunter beschreiben, dass die AC III bereits in nicht-induzierten Odora-Zellen exprimiert wird, wurden die Zellen zunächst mit einem Antikörper gegen AC III gefärbt (Santa Cruz Biotechnologies). Abb. 3.20 (A) zeigt, dass jede Zelle AC III immunpositiv ist. Dass die Färbung der Zellen nicht vom Zweitantikörper (gt-anit-rb Alexa 488, Molecular

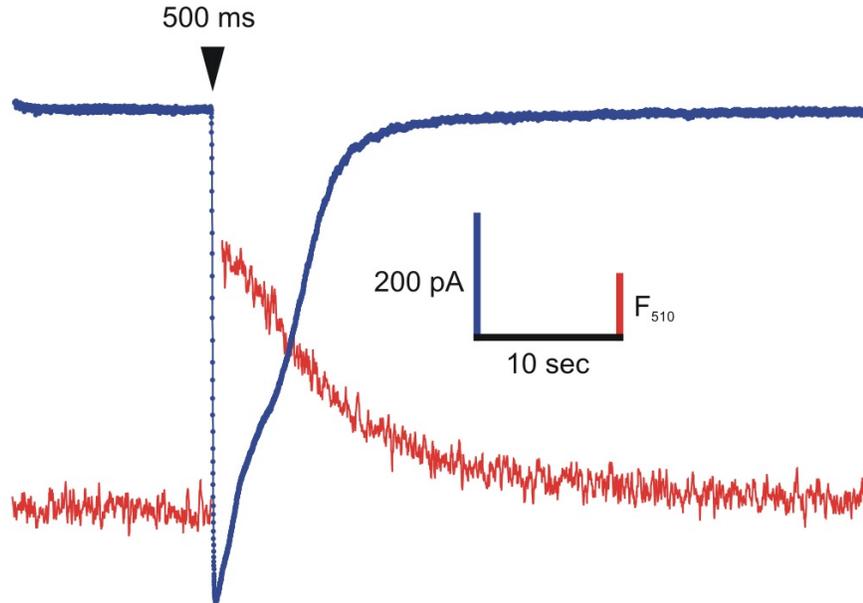


Abbildung 3.19: Funktionelle Untersuchung des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms in Odora-Zellen in der Whole-cell-Konfiguration. Badlsg.: 47 mM NaCl, 93 mM Na-Glutamat, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES; Pip.lsg.: 140 mM CsCl, 2,5 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0,25 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM DM-Nitrophen, 20 μM Fluo-5F. Beladung: 10 min. Das Stromsignal wird oben (blau) dargestellt, das Fluoreszenzsignal unten (rot). Der Zeitpunkt der Ca^{2+} -Freisetzung ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Probes) stammte, wurde durch eine lediglich mit dem Zweitantikörper durchgeführte Inkubation ausgeschlossen (nicht gezeigt). Inkubiert man nicht-induzierte Odora-Zellen mit rCLCA1-spezifischen Antikörpern (der Versuch wurde mit den Antikörpern gegen P1, P3 und DchB durchgeführt), sind ebenfalls alle Zellen immunpositiv (Abb. 3.20 (B)-(D)).

Um die Größe der von den rCLCA1-Antikörpern detektierten Proteine zu untersuchen, wurden Membranproteine aus Odora-Zellen isoliert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der Westernblot wurde mit dem P1-Antikörper 301.P1 und dem Antikörper DchB gegen das C-terminale Fusionsprotein inkubiert. Abb. 3.21 zeigt eine Aufnahme des Westernblots. 301.P1 detektiert eine stärkere Bande bei 64 kDa und eine schwächere Doppelbande bei 49 kDa. 302.P3 erkennt ebenfalls eine stärkere Bande bei 64 kDa und zwei schwächere Banden bei 46 kDa und 41 kDa. DchB, der Antikörper gegen das C-terminale Fusionsprotein, detektiert fünf Hauptbanden der Größen 68 kDa, 63 kDa, 53 kDa, 44 kDa und 32 kDa und daneben

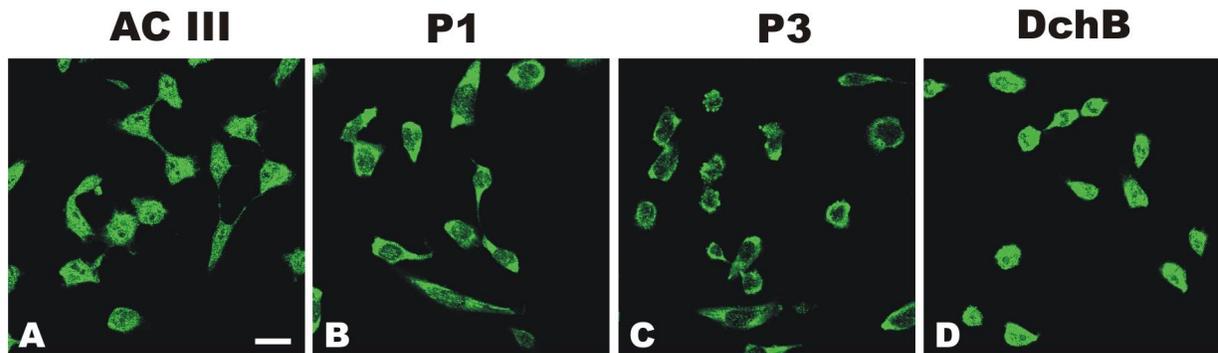


Abbildung 3.20: Immunzytochemische Untersuchungen an Odora-Zellen. Undifferenzierte Odora-Zellen wurden zur Kontrolle mit dem 3B10-Antikörper gegen AC III gefärbt (A). Färbungen mit verschiedenen rCLCA1-Antikörpern sind in (B) (P1-Antikörper 301.P1), (C) (P3-Antikörper 301.P3) und (D) (Antikörper gegen das C-terminale Fusionsprotein DchB) gezeigt (Balken: 20 μm).

viele schwächere Hintergrundbanden. Banden der Größen 97 kDa oder 35 kDa werden nicht detektiert.

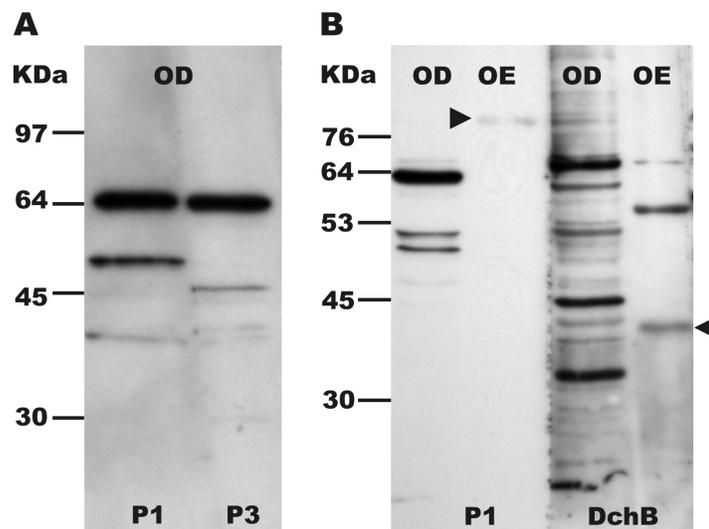


Abbildung 3.21: Untersuchung des rCLCA1-Proteins in Odora-Membranproteinen. (A) Je 20 μg Odora-Membranproteine auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membran immobilisiert und mit 301.P1 (links) bzw. 302.P3 (rechts) inkubiert. (B) Je 20 μg Odora-Membranproteinpräparation (OD) und 30 μg Membranproteine aus olfaktorischem Epithel (OE) wurden nebeneinander auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Westernblot wurde mit 301.P1 (links) und dem Fusionsprotein-Antikörper DchB inkubiert (rechts).

Anhand der prominenten Bande, die 301.P1 in Odora-Membranproteinen detektiert (Abb.

3.21 (A) und (B) links), könnte interpretiert werden, dass in Odora-Zellen eine weitere, trunkierte rCLCA1-Form existiert, die 64 kDa groß ist. Die im Gegensatz zur 64 kDa-Bande schwächere 49 kDa-Doppelbande könnte eine Kreuzreaktion des Antikörpers sein. Das wird dadurch impliziert, dass der P3-Antikörper 303.P3 ebenfalls eine Bande bei 64 kDa erkennt, aber zusätzlich zwei schwächere Banden bei 46 kDa und 41 kD (Abb. 3.21 (A) rechts). Die Vielzahl der Banden, die DchB detektiert, ist jedoch nicht zu interpretieren (Abb. 3.32 (B) rechts). Die Untersuchung der Proteine mit einer Westernblot-Analyse bringt somit kein eindeutiges Ergebnis, da Banden verschiedener Größen auftreten, die vorher nicht detektiert wurden. Es wäre möglich, die einzelnen Proteine, die im Westernblot erkannt werden, zu sequenzieren und mit der rCLCA1-Sequenz zu vergleichen. Eine einfachere Möglichkeit war jedoch, die rCLCA1-Expression in Odora auf Nukleinsäure-Ebene zu untersuchen.

Deshalb wurden RT-PCR-Experimente mit Odora-cDNA (zur Verfügung gestellt von A. Brühl, IBI-1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Dazu wurden rCLCA1-spezifische Primer gegen einen Bereich des Gens hergestellt. In Tabelle 3.6 sind die Primer-Nummern, die Bereiche, gegen die sie gerichtet waren und die Größe des erwarteten PCR-Fragments aufgelistet. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktionen wurde einerseits der rCLCA1-Expressionsklon pCDNA 3.1 Amp-rCLCA1 mit den in Tab. 3.6 aufgelisteten Primern verwendet. Andererseits wurden Primer für das ubiquitäre Protein Calmodulin als Positivkontrolle für die cDNA verwendet.

Tabelle 3.6: Primer für den molekularbiologischen Nachweis von rCLCA1 in Odora-Zellen.

Primer	Genprodukt	Genbereich	Fragmentgröße
#2830/2831	rCLCA1	900-1427	527 Bp
#3090/3091	Calmodulin	1-450	450 Bp

Abbildung 3.22 zeigt ein Foto des Agarosegels, auf dem 10% des PCR-Ansatzes aufgetragen wurden. Während auf dem rCLCA1-Expressionsklon mit den rCLCA1-spezifischen Primern #2830/2831 ein Fragment der richtigen Größe amplifiziert werden konnte, ergibt die PCR auf Odora-cDNA kein Amplifikat. Dagegen ergibt die PCR mit Calmodulin-spezifischen Primern ein Fragment der erwarteten Größe.

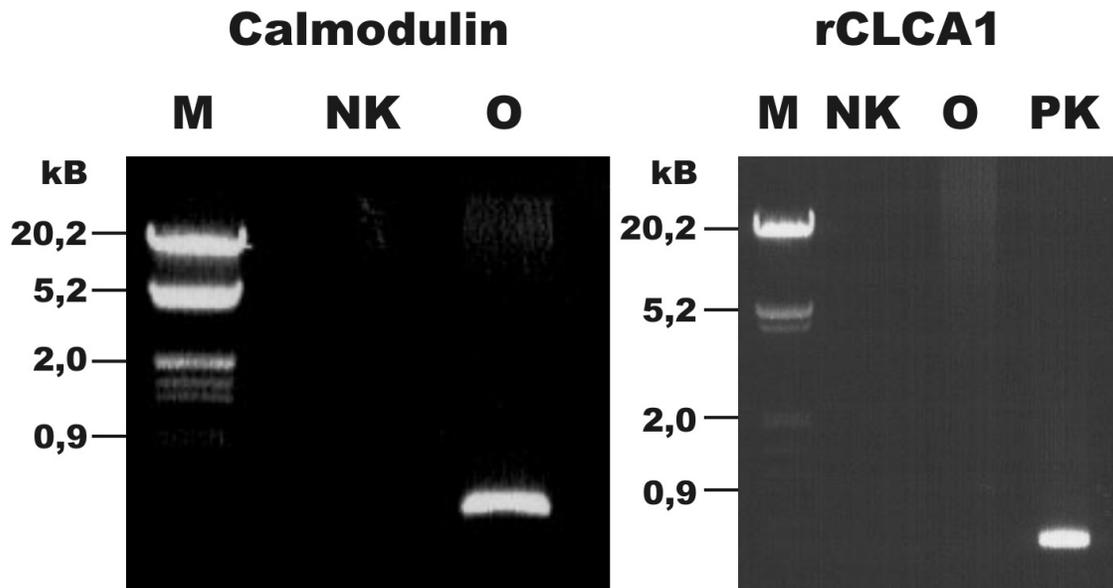


Abbildung 3.22: RT-PCR-Nachweis von *rclca1* in Odora-Zellen. Links: Positivkontrolle für die Odora-cDNA: Nachweis des ubiquitären Calmodulins in Odora-Zellen (O) neben der Kontrolle für den PCR-Ansatz ohne Matrizen-DNA (NK). Es wurden pro PCR-Ansatz 5 ng cDNA verwendet. 10% der RT-PCR-Ansätze wurden auf ein 0,75%iges Agarosegel aufgetragen. Rechts: RT-PCR mit rCLCA1-spezifischen Primern auf Odora-cDNA (O). (NK): Negativkontrolle ohne Matrizen-DNA (PK): Positivkontrolle mit den rCLCA1-spezifischen Primern auf 2,5 ng des rCLCA1-Expressionsklons pCDNA 3.1 Amp-rCLCA1.

Dieses Experiment zeigt, dass - im Gegensatz zum olfaktorischen Epithel, aus dem *rclca1* kloniert wurde - Odora-Zellen das *rclca1*-Gen nicht exprimieren. Trotzdem zeigen Odora-Zellen Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme, die mit dem nativen Strom der Riechzellen identisch zu sein scheinen. Dieses Ergebnis lässt allein den Schluss zu, dass das rCLCA1-Protein nicht im Zusammenhang mit dem Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal stehen kann.

3.6 Untersuchung des Chlorid-Haushalts in Riechzellen und in somatosensorischen Neuronen

Die Neuronen des olfaktorischen Epithels und der DRGs weisen eine sehr hohe intrazelluläre Chloridkonzentration ($[\text{Cl}^-]_i$) auf (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Gallagher et al., 1978). Damit unterscheiden sie sich deutlich von Neuronen anderer Gewebe. In somatosensori-

schen Neuronen führt man die erhöhte $[\text{Cl}^-]_i$ auf die verminderte Expression des K^+/Cl^- -Kotransporters KCC2 im adulten Organismus zurück (Rivera et al., 1999). KCC2 ist in den Neuronen des ZNS dafür verantwortlich, die physiologischen $[\text{K}^+]_i$ und $[\text{Cl}^-]_i$ der Zellen aufrechtzuerhalten (DeFazio et al., 2000). In den Riechzellen ist der Grund für die geringe $[\text{Cl}^-]_i$ nicht bekannt. Die Expression der unterschiedlichen Kationen/ Cl^- -Kotransporter-Proteine wurde in diesen Zellen bislang nicht untersucht. Im folgenden Abschnitt werden einzelne Komponenten der Chloridhomöostase in Riechzellen und somatosensorischen Neuronen näher untersucht. Außerdem wird die $[\text{Cl}^-]_i$ der somatosensorischen Neurone mit einer neuartigen fluoreszenzoptischen Methode, der Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse (*fluorescence lifetime imaging*, FLIM), gemessen. In unserer Arbeitsgruppe wurde diese Methode zum ersten Mal dazu verwendet, die $[\text{Cl}^-]_i$ in Riechzellen zu messen.

3.6.1 Komponenten der Cl^- -Homöostase in Riechzellen

Die bisherigen Abschnitte meiner Arbeit behandelten die Untersuchung eines möglichen Kandidaten für den Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal der Riechzellen. Dieser Kanal ist interessant, da er aufgrund der besonders hohen intrazellulären Cl^- -Konzentration der Riechzellen eine Depolarisierung und damit die Aktivierung dieser Zellen bewirkt. Die $[\text{Cl}^-]_i$ in Riechzellen wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen untersucht. Die Methoden, die dazu verwendet wurden waren jedoch z.T. indirekt und aufwändig, oder invasiv, so dass man anzweifeln muß, ob die Zellen ihre native $[\text{Cl}^-]_i$ auch während der Messung halten konnten. Reuter et al. (1998) untersuchten die $[\text{Cl}^-]_i$ der Zilienknöpfe mit der Energie-dispersiven Röntgen-Mikroanalyse (*energy-dispersive x-ray microanalysis*, EDXA). Die Messungen ergaben, dass die $[\text{Cl}^-]_i$ in den Zilienknöpfen im Mittel 69 mM beträgt, die $[\text{Cl}^-]$ des Mukus hingegen 55 mM. Das Gleichgewichtspotenzial von Cl^- (E_{Cl}) beträgt somit +6 mV. Messungen mit der EDXA-Methode sind sehr genau und nicht invasiv, da die $[\text{Cl}^-]_i$ *in situ* an sehr dünnen Schnitten gemessen werden kann. Diese Methode ist jedoch zeitintensiv, sehr aufwändig und kann nur an Kryoschnitten durchgeführt werden. $[\text{Cl}^-]_i$ -Änderungen in den verschiedenen Kompartimenten können hier nicht direkt verfolgt und nachträglich beeinflusst werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde zum ersten Mal die $[\text{Cl}^-]_i$ des Riechepithels über die Fluoreszenz-Lebenszeit Cl^- -sensitiver Farbstoffe gemessen (Kaneko et al., in Vorberei-

tung). Diese Methode ermöglicht es, die $[\text{Cl}^-]$ des intakten Riechepithels über einen längeren Zeitraum zu messen und Änderungen direkt zu beobachten (s. auch 2.8 und 3.6.3). Kaneko et al. erhalten einen mittleren Wert von 69 mM für die $[\text{Cl}^-]_i$. Das Ergebnis entspricht in etwa dem Wert, den Reuter et al. erhalten (im Mittel 60 mM) und liegt somit deutlich höher als der Wert, den Nakamura et al. (40 mM; Nakamura et al., 1997) mit einem Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff an isolierten Riechneuronen erhalten.

Für die $[\text{Cl}^-]_i$ -Regulation einer Zelle und damit die Aufrechterhaltung ihrer elektrischen Erregbarkeit sind unterschiedliche Cl^- -Transport-Proteine verantwortlich. Dazu gehört die Familie der Kationen/ Cl^- -Kotransporter. Bisher sind sieben Mitglieder kloniert: vier K^+/Cl^- -Kotransporter (KCC1, KCC2, KCC3 und KCC4; Gillen et al., 1996; Payne et al., 1996; Mount et al., 1999), zwei $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC1 und NKCC2; Gamba et al., 1994; Xu et al., 1994) und ein Na^+/Cl^- -Kotransporter (*thiazide sensitive sodium chloride cotransporter*, TSC; Gamba et al., 1993). Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wird anhand von RT-PCR-Experimenten untersucht, ob einige der bislang bekannten Kationen/ Cl^- -Kotransporter im Rattenriechepithel exprimiert werden. Im Abschnitt 3.6.2 werden die Ergebnisse der RT-PCR-Studien immunhistochemisch überprüft.

Für RT-PCR-Experimente mit cDNA aus olfaktorischem Epithel (zur Verfügung gestellt von Dr. W. Bönigk, IBI-1, Forschungszentrum Jülich) wurden spezifische Primer für die Kationen/ Cl^- -Kotransporter KCC1, KCC2, NKCC1, NKCC2 und TSC synthetisiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer gegen konservierte Bereiche (transmembranale Domänen) der Proteine gerichtet waren, die jedoch spezifisch für die einzelnen Transporter-Subtypen waren und zudem mehrere Exone der Gene überspannten (Moore-Hoon und Turner, 1998). Die fünf Primerpaare sind in Tabelle 3.7 aufgelistet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang gezeigt. Als Positivkontrollen wurden die PCR-Reaktionen parallel mit cDNAs aus Geweben durchgeführt, in denen die nachzuweisenden Kationen/ Cl^- -Kotransporter bereits beschrieben wurden. So wurde als Positivkontrolle für NKCC1 (Lytle et al., 1995), NKCC2 und TSC Nieren-cDNA verwendet (Gamba et al., 1994), für KCC1 Cerebellum-cDNA (Kanaka et al., 2001) und für KCC2 Hippokampus-cDNA (Kanaka et al., 2001) (die cDNAs aus Hippokampus und Cerebellum wurden von Dr. A. Köngeter, IBI-1, Forschungszentrum Jülich zur Verfügung gestellt). Die entstehenden PCR-Fragmente wurden in pBlueskript SK⁻ (Stratagene) kloniert und sequenziert (2.3.6).

Tabelle 3.7: Primer für den Nachweis von Kationen/ Cl^- -Kotransporter in cDNA aus Olfaktorischem Epithel der Ratte. Primer-Nummern, Bereich der Gene, der durch die verwendeten Primer vervielfältigt wird und Größen der entstehenden Fragmente.

Kotransporter-Subtyp	Primerpaar (5'/3')	Genbereich (Fragmentgröße)
KCC1	#3259/3260	1245-1964 (719 Bp)
KCC2	#3283/3310	1286-1931 (645 Bp)
NKCC1	#3309/3288	1676-2361 (682 Bp)
NKCC2	#3279/3308	1222-1940 (718 Bp)
TSC	#3281/3311	1373-2086 (713 Bp)

Abbildung 3.23 zeigt ein Agarosegel, auf dem je 10% des PCR-Ansatzes nebeneinander aufgetragen wurden.

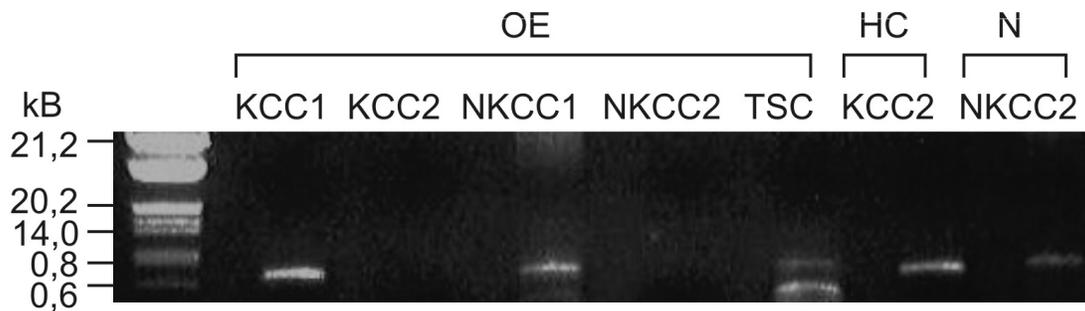


Abbildung 3.23: RT-PCR-Nachweis von Kationen/ Cl^- -Kotransportern im olfaktorischen Epithel. Mit Primern gegen die unterschiedlichen Isoformen wurde die Expression von Kationen/ Cl^- -Kotransportern auf 2,5 ng olfaktorischer cDNA (OE) untersucht. Für RT-PCR-Versuche, die kein Signal auf olfaktorischer cDNA ergaben, wurde je eine Positivkontrolle mit cDNA aus einem Gewebe durchgeführt, in dem die Kotransportersubtypen bereits beschrieben wurden: Hippokampus (HK)-cDNA für KCC2 und Nieren (N) -cDNA für NKCC2. 10% der PCR-Ansätze wurden jeweils auf ein ca. 1,25%iges Agarosegel aufgetragen.

Die Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Während der K^+/Cl^- -Transporter KCC1 in olfaktorischem Epithel nachgewiesen werden konnte, war KCC2 nicht vorhanden, so wie es auch für somatosensorische Neurone beschrieben wurde. Die Untersuchung der Expression der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter ergab, dass das NKCC1-Gen, nicht aber das NKCC2-Gen in der cDNA des olfaktorischen Epithels vorhanden war. Neben KCC1

und NKCC1 konnte auch das Gen des Na^+/Cl^- -Kotransporters TSC amplifiziert werden. In Abb. 3.23 ist gezeigt, dass die Fragmente für NKCC2 und KCC2 zwar nicht im olfaktorischen Epithel, dafür aber in Kontroll-cDNAs (Niere bzw. Hippokampus) nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 3.8: Kationen/ Cl^- -Kotransporter-Gene in cDNA des olfaktorischen Epithels und Gewebe, deren cDNA für die Positivkontrollen verwendet wurden. ⁽¹⁾ Kanaka et al., 2001; ⁽²⁾ Lytle et al., 1995; ⁽³⁾ Gamba et al., 1994

Kotransporter-Subtyp	Positivkontrolle für RT-PCR	Gen in OE-cDNA vorhanden?
KCC1	Cerebellum ⁽¹⁾	ja
KCC2	Hippokampus ⁽¹⁾	nein
NKCC1	Niere ⁽²⁾	ja
NKCC2	Niere ⁽³⁾	nein
TSC	Niere ⁽³⁾	ja

3.6.2 Immunhistochemische Lokalisation der Kationen/ Cl^- -Kotransporter im olfaktorischen Epithel

In 3.6.1 wurde gezeigt, dass mit der cDNA von olfaktorischem Epithel Fragmente der Kationen/ Cl^- -Kotransporter KCC1, NKCC1 und TSC amplifiziert werden konnten. Diese Versuche geben jedoch nur einen Anhaltspunkt für die mögliche Expression der entsprechenden Proteine im Riechepithel. Dadurch wird nicht gezeigt, dass KCC1-, NKCC1- und TSC-Proteine gebildet werden und in welchen Zellen des Riechepithels sie lokalisiert sind. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Antikörper gegen die verschiedenen Kotransporter-Proteine bestellt (Alpha Diagnostics International, Texas, U.S.A.). Zunächst wurden die unterschiedlichen Antikörper für die Verwendung in der Immunhistochemie auf Geweben getestet, in denen die Kotransporter-Proteine beschrieben wurden (Kanaka et al., 2001; Lytle et al., 1995; Gamba et al., 1994). Dazu wurden 25 μm dicke Längsschnitte der Rattenniere mit den Antikörpern gegen KCC1, NKCC1, NKCC2 und TSC inkubiert. Für KCC2 wurden 20 μm dicke Koronarschnitte des Gehirns mit dem entsprechenden An-

tikörper inkubiert. Die Antikörper gegen NKCC1, NKCC2 und TSC ergeben in der Nieren-Positivkontrolle Färbemuster, wie sie in der Literatur beschrieben werden (Abb. 3.24).

NKCC1 ist die sekretorische Isoform der NKCC-Proteine und wird in der basolateralen Membran der Sammelrohr-Epithelzellen des äußeren Nierenmarks exprimiert (Abb. 3.24 (A));

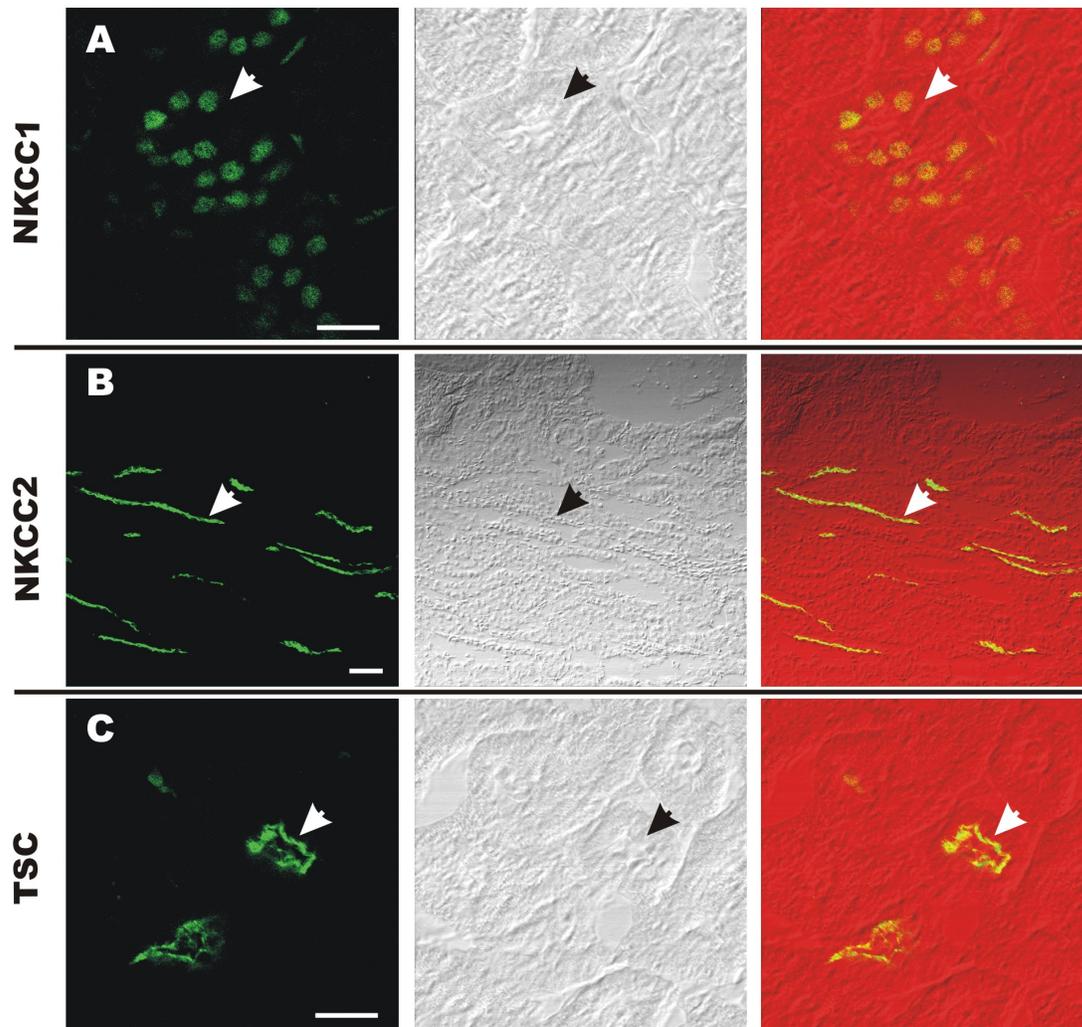


Abbildung 3.24: Test der gekauften Antikörper gegen unterschiedliche Kationen/ Cl^- -Kotransporter auf Nierenschnitten. Für jede Färbung wird jeweils das Fluoreszenz-Bild (links), das Durchlichtbild (Mitte) und die Überlagerung beider Bilder (rechts) gezeigt. (A) NKCC1 ist in der basolateralen Membran der Sammelrohr-Epithelzellen des äußeren Nierenmarks lokalisiert (Pfeil); (B) NKCC2 ist in der apikalen Membran der Epithelzellen des dicken, aufsteigenden Asts der Henle-Schleife lokalisiert (Pfeil); (C) TSC ist in der apikalen Membran des distalen, gewundenen Nierentubulus lokalisiert (Pfeil); (Balken in (A) und (C): $20 \mu\text{m}$, in (B): $50 \mu\text{m}$).

(Ginns et al., 1996)). NKCC2 ist die absorptive Form der NKCC-Proteine und ist in der apikalen Membran der Epithelzellen des dicken, aufsteigenden Asts der Henle-Schleife lokalisiert (Abb. 3.24 (B); Lytle et al., 1995; Ecelbarger et al., 1996)). TSC ist vorwiegend in der apikalen Membran des distalen, gewundenen Nierentubulus lokalisiert (Abb. 3.24 (C); Gamba et al., 1994)). Der Antikörper gegen KCC2 gab auf Gehirnschnitten einen sehr hohen Hintergrund, so dass keine spezifische Färbung, zum Beispiel der Hippokampus-Neuronen (Gulyàs et al., 2001), gezeigt werden konnte. Auch mit dem KCC1-Antikörper konnte auf Nierenschnitten keine spezifische Immunreaktivität detektiert werden. Dieser Antikörper gab eine starke Färbung des gesamten Nierenschnitts, obwohl KCC1 nur in den Epithelzellen des proximalen Tubulus, des distalen Nierentubulus und des Sammelrohrs beschrieben wurde (Liapis et al., 1998).

Mit Hilfe von RT-PCR konnten KCC1-, NKCC1- und TSC-Fragmente auf olfaktorischer cDNA amplifiziert werden (vergl.: 3.6.1). Da die verwendeten Antikörper gegen NKCC1 und TSC spezifische Färbungen auf Nierenschnitten ergaben, wurden sie verwendet, um die Lokalisation beider Kotransporter in Kryoschnitten des olfaktorischen Epithels zu überprüfen. Die KCC1-Expression konnte aufgrund des unspezifischen Antikörpers hier nicht genauer untersucht werden.

Abb. 3.25 (A) und (B) zeigen eine Immunfärbung des olfaktorischen Epithels mit dem Antikörper gegen NKCC1. Es wurden einzelne Zellen gefärbt, die sich in Höhe der Stützzellschicht befinden. Anhand der Anzahl gefärbter Zellen und ihrer Morphologie wurden sie als Mikrovillizellen identifiziert (persönliche Mitteilung von Dr. E. Asan, Universität Würzburg). Weder Ziliensaum noch Zellen der Neuronenzellschicht waren NKCC1-immunreaktiv. Die Fluoreszenz-Färbung, die sich mit dem Antikörper gegen TSC ergab, war dagegen in der Neuronenzellschicht punktförmig verteilt und ansonsten diffus (Abb. 3.25 (C) und (D)). Sie lag in den Zellzwischenräumen der Neuronenzellschicht und unterhalb des Ziliensaums, wo keine erkennbare Struktur angefärbt wurde, sondern vielmehr ein diffuser Hintergrund auf der Stützzellschicht entstand.

Die Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen an intaktem olfaktorischen Epithel haben bekräftigt, dass die $[Cl^-]_i$ der Riechzellen im Gegensatz zu anderen Neuronen sehr hoch ist. Das bedeutet, dass Riechzellen nicht durch Cl^- gehemmt werden können. Somit unterscheiden sich

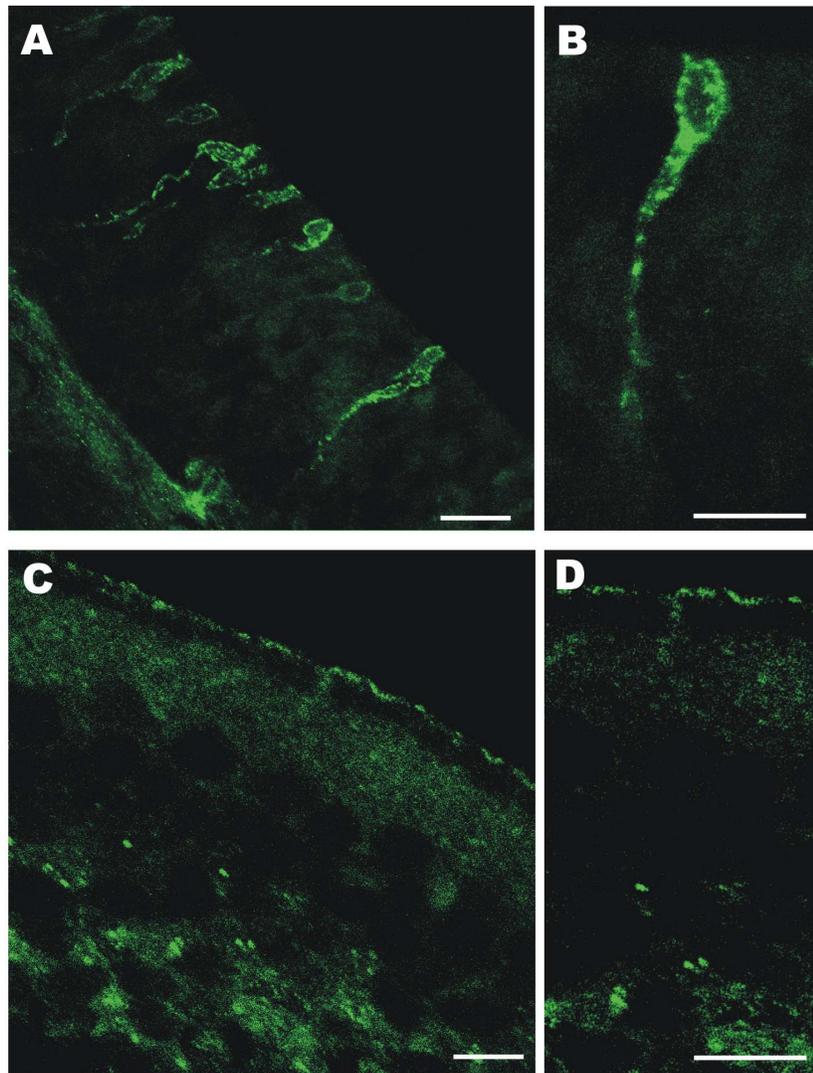


Abbildung 3.25: Immunzytochemische Lokalisation von NKCC1 (A und B) und TSC (C und D) im Riechepithel. Balken: 50 μm

Riechzellen und somatosensorische Neurone von den meisten anderen Neuronen. Offenbar hängt die hohe $[\text{Cl}^-]_i$ in Riechzellen und somatosensorischen Neuronen mit dem Fehlen von KCC2 zusammen, dessen Expression eine Voraussetzung für die Absenkung von $[\text{Cl}^-]_i$ auf unter 10 mM zu sein scheint (Rivera et al., 1999). Besonders interessant ist, dass in beiden Sinneszellen die Aufrechterhaltung einer hohen $[\text{Cl}^-]_i$ mit der Expression Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanäle einhergeht. Beide Zellen werden bei Öffnung dieser Kanäle depolarisiert. Der genaue Wert von $[\text{Cl}^-]_i$ in den somatosensorischen Neuronen der Ratte wurde bislang nur mit invasiven oder indirekten Methoden bestimmt. Deshalb habe ich $[\text{Cl}^-]_i$ in frisch-dissoziierten, somatosensorischen Neuronen mit Hilfe der FLIM-Methode gemessen.

3.6.3 Messung der $[Cl^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen der Ratte

Die $[Cl^-]_i$ der somatosensorischen Neurone wurde durch TP-FLIM mit dem Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff MQAE bestimmt.

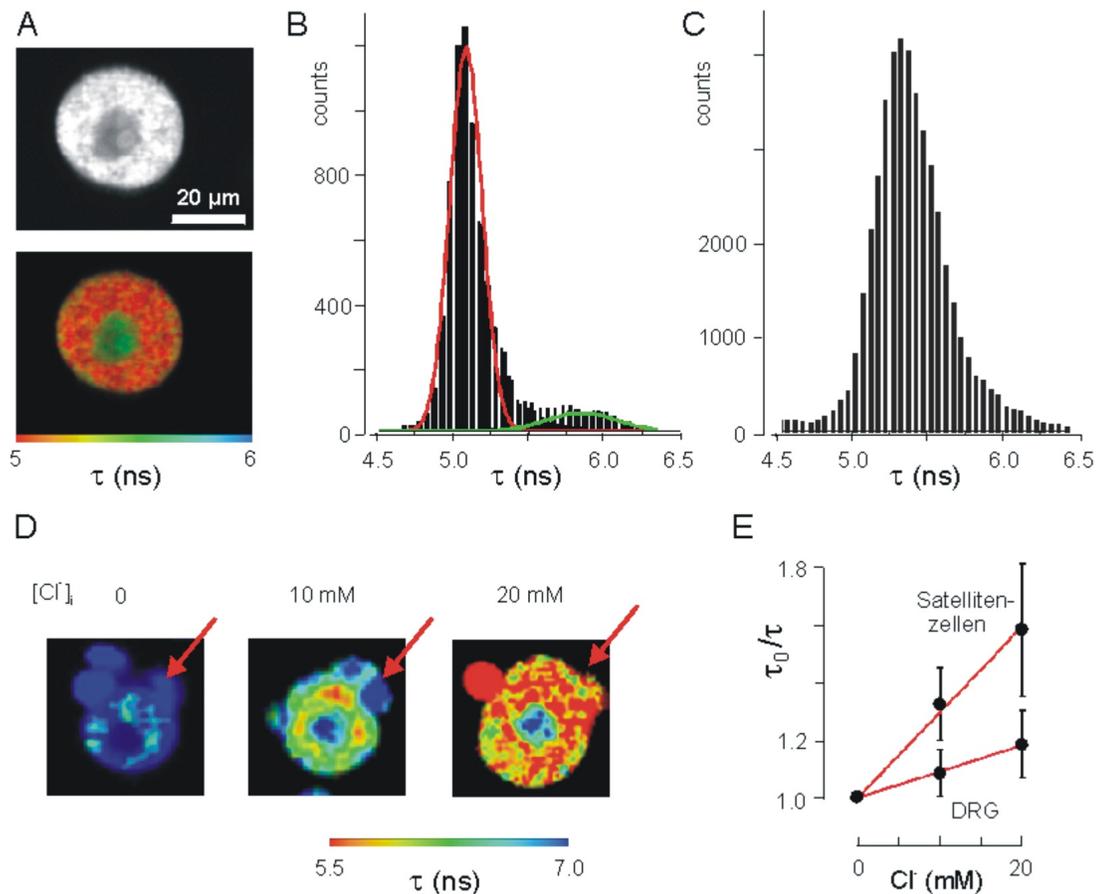


Abbildung 3.26: Bestimmung der $[Cl^-]_i$ in somatosensorischen Neuronen mit der Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung. (A) Zwei-Photonen-Aufnahme der Fluoreszenz-Intensität (oben) und der MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit (unten) in einem einzelnen, dissoziierten, somatosensorischen Neuron. Die Fluoreszenz-Lebenszeit τ [ns] wird in Falschfarben kodiert. (B) Histogramm der MQAE-Lebenszeit aus jedem Pixel der in (A) gezeigten Zelle. (C) Histogramm der gesammelten Lebenszeit-Daten aus 28 somatosensorischen Neuronen. (D) und (E) Eichung der MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit in somatosensorischen Neuronen. (D) Darstellung der Fluoreszenz-Lebenszeit dreier somatosensorischer Neurone, die sich in Badlösungen unterschiedlicher $[Cl^-]$ befinden. Der Pfeil zeigt auf Satelliten-Zellen, die den Neuronen anhaften. (E) Stern-Volmer-Plot: Die Steigung der Geraden gibt die Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) der Satellitenzellen und somatosensorischen Neuronen an.

Abb. 3.26 (A) zeigt Bilder eines somatosensorischen Neurons. Das obere Bild gibt die

Fluoreszenz-Intensität des MQAEs in der Zelle wieder. Das untere Bild stellt die Fluoreszenz-Lebenszeit des MQAEs in dem selben Neuron in Falschfarbendarstellung dar. Das Zytosol besaß eine gleichmäßige Fluoreszenz-Intensität. Seine Fluoreszenz-Lebenszeit lag bei 5 ns, wie an der Farbskala abzulesen ist. Der Fluoreszenzfarbstoff im Nukleus der Zelle wies dagegen eine geringere Fluoreszenz-Intensität auf und besaß eine längere mittlere Fluoreszenz-Lebenszeit von etwa 5,5-6 ns. Abbildung 3.26 (B) stellt die Lebenszeit-Verteilung des Farbstoffs in der in (A) gezeigten Zelle dar. Die mittlere Fluoreszenz-Lebenszeit im Zytosol dieser Zelle lag bei $5,1 \pm 0,1$ ns, wohingegen die mittlere Lebenszeit im Nukleus bei $5,85 \pm 0,22$ ns lag. Die Messungen von 28 somatosensorischen Neuronen ergab eine mittlere Lebenszeit von 5,3 ns im Zytosol (3.26 (C)). Warum unterscheiden sich die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeiten im Zytosol und Nukleus? Es ist möglich, dass ein Cl^- -Gradient zwischen den Kompartimenten bestand und die Cl^- -Konzentration im Nukleus geringer als im Zytosol war (die Verteilung ist in Abb. 3.26 (C) gezeigt). Bildet dagegen die Kernmembran keine Barriere für Cl^- , wiesen die Kompartimente unterschiedliche "Quenching"-Eigenschaften auf. In Versuchen mit der EDXA-Methode an Sympathikus-Neuronen (Galvan et al., 1984) wurde kein Unterschied der $[\text{Cl}^-]_i$ von Zellplasma und -kern gemessen. Somit besitzen beide Kompartimente wahrscheinlich unterschiedliche "Quenching"-Eigenschaften für MQAE, die zum Beispiel durch die unterschiedliche Zusammensetzung an "quencheden" Proteinen zu Stande kommen kann.

Damit die Cl^- -Konzentration in Zytosol und Nukleus verglichen werden können, musste sie auf die gemessene Lebenszeit geeicht werden. Dazu wurde die MQAE-Fluoreszenz-Lebenszeit in somatosensorischen Neuronen in Lösungen unterschiedlicher $[\text{Cl}^-]$ gemessen, was allerdings keinen Einfluss auf die Fluoreszenz-Lebenszeit der Farbstoff beladenen Zellen zeigte. Scheinbar bildete die Zellmembran eine absolut Cl^- -impermeable Barriere zwischen Badlösung und Zellinnerem. Deshalb wurden Fluoreszenz-Lebenszeit und $[\text{Cl}^-]_i$ mit einer Doppel-Ionophor-Strategie geeicht (Chao et al., 1989). Die Zellen wurden 30 min in einer Ringerlösung inkubiert, die 40 μM Tributylzinn und 10 μM Nigericin enthielt. Tributylzinn ist ein Cl^-/OH^- -Austauscher, der den Chloridgradienten über der Plasmamembran aufhebt. Der K^+/H^+ -Austauscher Nigericin stabilisiert den pH-Wert in der Zelle, der durch die durch Tributylzinn verursachte OH^- -Verschiebung in der Zelle ansteigt. Um τ_0 , die MQAE-Lebenszeit bei $[\text{Cl}^-]_i = 0$ mM, zu bestimmen, wurden die Zellen zuerst in einer Cl^- -freien Ringerlösung

(Cl⁻ wurde durch NO₃⁻ vollständig ersetzt) gewaschen, 30 min in Cl⁻-freier Ringerlösung mit 5 mM MQAE beladen und dann 30 min in Cl⁻-freier Ionophor-Lösung inkubiert. Die Zellen zeigten nach dieser Inkubation eine gleichmäßige Fluoreszenz-Lebenszeitverteilung in Zytosol und Nukleus, die als τ_0 angenommen wurde. Die Fluoreszenz-Lebenszeiten in 13 somatosensorischen Neuronen wurden gemittelt, was für τ_0 im Zytosol $6,8 \pm 0,3$ ns und im Nukleus $7,0 \pm 0,5$ ns ergab.

Die Messung wurde mit Lösungen, die 10 mM und 20 mM Cl⁻ enthielten, wiederholt. In Abb. 3.26 (D) ist gezeigt, wie die Fluoreszenz-Lebenszeit von MQAE in einer Zelle mit steigender Cl⁻-Konzentration der Badlösung abnimmt. Bei Cl⁻-Konzentrationen über 20 mM änderten sich die Fluoreszenz-Lebenszeiten jedoch nicht mehr so konstant und reproduzierbar wie im Bereich von 0-20 mM Cl⁻. Für jede Messung wurde der Mittelwert aus 8-13 Zellen bestimmt und in einen Stern-Volmer-Plot eingetragen (3.26 (E)). Die Standardabweichungen für jeden Messpunkt zeigen, dass die MQAE-Lebenszeiten stark schwankten. Die Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) wurde durch lineare Regression über die einzelnen Messpunkte bestimmt und betrug $9,1 \text{ M}^{-1}$ für das Zytosol. Im Zellkern betrug K_{SV} dagegen 6 M^{-1} . Somatosensorische Neurone werden *in vivo* von nicht-neuronalen Satellitenzellen umgeben, die ebenfalls Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle besitzen (England et al., 2001). Auch nach der enzymatischen Dissoziation der DRGs haften sie oft an den Neuronen, wie zum Beispiel in 3.26 (D) (Pfeil) zu sehen ist. Die K_{SV} für MQAE in diesen Zellen betrug $29,8 \text{ M}^{-1}$.

Der Vergleich von K_{SV} in wässriger Lösung und in Zellen [185 M^{-1} (Kaneko et al., 2002) gegenüber $6,8 \text{ M}^{-1}$] zeigt, dass die Sensitivität des Farbstoffs MQAE gegenüber Cl⁻ in Zellen sehr viel geringer als in Lösung ist. Für andere Zelltypen wurden ähnliche Werte ($K_{SV}(\text{MQAE}) = 5\text{-}25 \text{ M}^{-1}$) gemessen (Kaneko et al., 2001; Lau et al., 1994; Bevensee et al., 1997; Eberhardson et al., 2000; Maglova et al., 1998). Vermutlich wurde die MQAE-Fluoreszenz in der Zelle durch andere Anionen, wie z.B. negativ geladene Proteine oder andere lösliche Anionen, bereits stark "gequencht" (Chao et al., 1989). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die MQAE-Lebenszeit in Cl⁻-freier Lösung (τ_0) von 28 ns in wässriger Lösung auf 6,7 ns in somatosensorischen Neuronen absank (Kaneko et al., 2002). Mit Hilfe der ermittelten Lebenszeit-Parameter ($\tau_0 = 6,8$ ns; $K_{SV} = 9,1 \text{ M}^{-1}$ für das Zytosol der somatosensorischen Neurone) und der mittleren Werte für die Fluoreszenz-Lebenszeit in frisch dissoziierten Neuronen ($\tau = 5,3$ ns), ließ sich durch Einsetzen in die Stern-Volmer-

Gleichung $[Cl^-]_i = (\tau_0 / \tau - 1) / K_{SV}$, eine $[Cl^-]_i$ von 31 mM errechnen. Die $[Cl^-]_i$ im Nukleus betrug 33 mM ($\tau_0 = 7,0$ ns; $K_{SV} = 6$ M⁻¹; $\tau = 5,85$ ns) und die $[Cl^-]_i$ der Satellitenzellen betrug 23 mM ($\tau_0 = 9,1$ ns; $K_{SV} = 29,8$ M⁻¹; $\tau = 5,4$ ns). In Tabelle 3.9 sind die Lebenszeit-Daten und die $[Cl^-]_i$ zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Fluoreszenz-Lebenszeit-Daten und ermittelte $[Cl^-]_i$ der Neurone und Satellitenzellen in DRGs. τ_0 : MQAE-Lebenszeit in Cl⁻-freier Umgebung; τ : gemessene Lebenszeit in Ringerlösung; K_{SV} : Stern-Volmer-Konstante von MQAE in den unterschiedlichen Zellen/Kompartimenten.

	τ_0	τ	K_{SV}	$[Cl^-]_i$
Somatosens. Neuron (Zytosol)	6,8 ns	5,3 ns	9,1 M ⁻¹	31 mM
Somatosens. Neuron (Nukleus)	7,0 ns	5,85 ns	6 M ⁻¹	33 mM
Satellitenzelle	9,1 ns	5,3 ns	29,8 M ⁻¹	23 mM

3.6.4 RT-PCR-Nachweis von Kationen/Cl⁻-Kotransportern in DRG-cDNA

Die $[Cl^-]_i$ dissoziierter, somatosensorischer Neurone der Ratte beträgt 31 mM (3.6.3) und ist im Vergleich zu anderen Neuronen hoch. Die $[Cl^-]_i$ in den somatosensorischen Neuronen des Froschs wurde bereits von Alvarez-Leefmans et al. (1988) mit Cl⁻-selektiven Mikroelektroden gemessen. Sie kamen auf einen Wert von 24 mM. Die $[Cl^-]_i$ in Zellen wird unter anderem durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Kationen/Cl⁻-Kotransporter bestimmt. Die Expression einiger Kationen/Cl⁻-Kotransporter wurde bereits in DRGs untersucht. Kanaka et al. (2001) zeigten mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung, dass KCC1 stark in Ratten-DRGs exprimiert wird. NKCC1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, was Alvarez-Leefmans et al. (2001) mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen von DRG-Schnitten bestätigten. Die Expression von NKCC2 und TSC in somatosensorischen Neuronen wurde bislang nicht untersucht. Dagegen wurde vielfach bestätigt, dass KCC2 wohl in adulten Neuronen des zentralen Nervensystems weit verbreitet ist (Payne et al., 1996), aber in den somatosensorischen Neuronen nicht exprimiert wird. KCC2 ist dafür verantwortlich, die $[Cl^-]_i$ in den Neuronen gering zu halten. Dabei nutzt dieser Kotransporter das elektrochemische Potenzial für K⁺, um Cl⁻ aus der Zelle zu transportieren. Die verminderte KCC2-Expression in somatosen-

sorischen Neuronen bewirkt wahrscheinlich die - im Gegensatz zu den meisten Neuronen - hohe $[Cl^-]_i$ (Rivera et al., 1999).

Über RT-PCR-Experimente (dieser Abschnitt) und Immunhistochemie (3.6.5) werden in dieser Arbeit die Expression und Lokalisation einiger Kationen/ Cl^- -Kotransporter, vor allem die bisher nicht untersuchten Transporter NKCC2 und TSC, in DRGs überprüft. Für die RT-PCR-Experimente wurden dieselben Primerpaare und cDNAs für die Positivkontrollen verwendet, wie in 3.6.3 beschrieben wurde (Tab. 3.7). DRG-cDNA wurde durch Umschreiben von poly (A)⁺-mRNA aus Ratten-DRGs synthetisiert (2.3.8.1). Die entstehenden PCR-Produkte wurden in pBlueskript SK⁻ (Stratagene) kloniert (2.3.6) und sequenziert (2.3.7). Tabelle 3.10 zeigt, in welchem Fall Kationen/ Cl^- -Kotransporter-Fragmente amplifiziert werden konnten.

Tabelle 3.10: Expression der Kationen/ Cl^- -Kotransporter-Gene in DRG-cDNA und in Geweben, deren cDNA für die Positivkontrollen verwendet wurden. ⁽¹⁾ Kanaka et al., 2001; ⁽²⁾ Lytle et al., 1995; ⁽³⁾ Gamba et al., 1994.

Kotransporter-Subtyp	Positivkontrolle für RT-PCR	Gen in DRG-cDNA vorhanden?
KCC1	Cerebellum ⁽¹⁾	ja
KCC2	Hippokampus ⁽¹⁾	schwach
NKCC1	Niere ⁽²⁾	nein
NKCC2	Niere ⁽³⁾	ja
TSC	Niere ⁽³⁾	ja

Die PCR-Experimente ergaben mit den Primern für KCC1, NKCC2 und TSC auf einem Agarosegel (Abbildung 3.27) intensiv fluoreszierende Banden in den erwarteten Größen (s. Tabelle 3.7). PCR-Experimente mit Primern für KCC2 gaben auf DRG-cDNA keine Bande. Ein NKCC1-Produkt wurde mit den entsprechenden Primern auf DRG-cDNA, im Gegensatz zu Nieren-cDNA, nicht erhalten.

Mit diesen Experimenten konnten die Ergebnisse von Kanaka et al. (2001) für KCC1 und KCC2 bestätigt werden. Die Ergebnisse, die Kanaka et al. und Alvarez-Leefmans et al. (2001) für NKCC1 gezeigt haben, wurden jedoch nicht bestätigt. Fragmente der beiden bislang nicht in DRGs untersuchten Na⁺-abhängigen Kotransporter, NKCC2 und TSC, konnten aus

Ratten-DRG-cDNA amplifiziert werden.

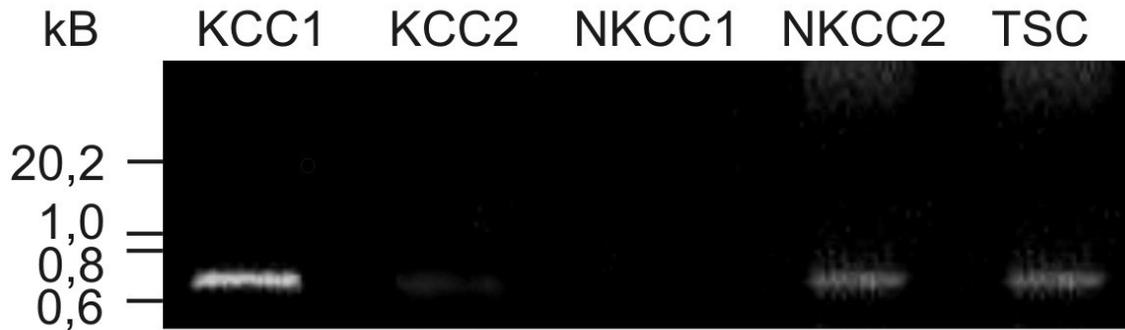


Abbildung 3.27: RT-PCR-Nachweis von Kationen/Chlorid-Kotransportern in DRGs. Mit Primern gegen die unterschiedlichen Isoformen wurde die Expression von Kationen/ Cl^- -Kotransportern auf 2,5 ng DRG-cDNA untersucht. Je 10% der PCR-Ansätze wurden jeweils auf ein ca. 1,25%iges Agarosegel aufgetragen.

3.6.5 Immunhistochemische Lokalisierung von Kationen/ Cl^- -Transportern in DRGs

Die RT-PCR-Experimente mit DRG-cDNA implizieren, dass KCC1, NKCC2 und TSC in somatosensorischen Zellen exprimiert werden. Um zu überprüfen, ob die entsprechenden Proteine tatsächlich gebildet werden, und wo sie in DRGs lokalisiert sind, wurden 25 μm dicke DRG-Kryoschnitten mit den unterschiedlichen Kationen/ Cl^- -Kotransporter-Antikörpern inkubiert. Die Antikörper gegen KCC1 und KCC2 zeigten auf Nieren- bzw. Gehirnschnitten keine der in der Literatur beschriebenen, spezifischen Immunfärbungen (3.6.3) und wurden deshalb nicht auf DRG-Schnitten eingesetzt. Abb. 3.28 zeigt zunächst ein Durchlichtbild eines 20 μm dicken DRG-Schnitts.

Jedes pseudounipolare somatosensorische Neuron besitzt ein Axon, das in einem Strang afferenter Neurone gebündelt wird. Somatosensorische Neurone können sehr unterschiedlich groß sein (\varnothing 20-60 μm). Die Immunfärbungen von DRG-Schnitten mit den Antikörpern gegen NKCC1, NKCC2 und TSC sind in Abb. 3.28 (B)-(D) gezeigt. Der Antikörper gegen NKCC1 ergibt keine spezifische Färbung der somatosensorischen Neurone, ihrer Axone oder der Satellitenzelle und bestätigt somit das negative RT-PCR-Ergebnis. Wie in der Abbildung gezeigt, gab dieser Antikörper, auch wenn er konzentriert (bis 1:5) eingesetzt

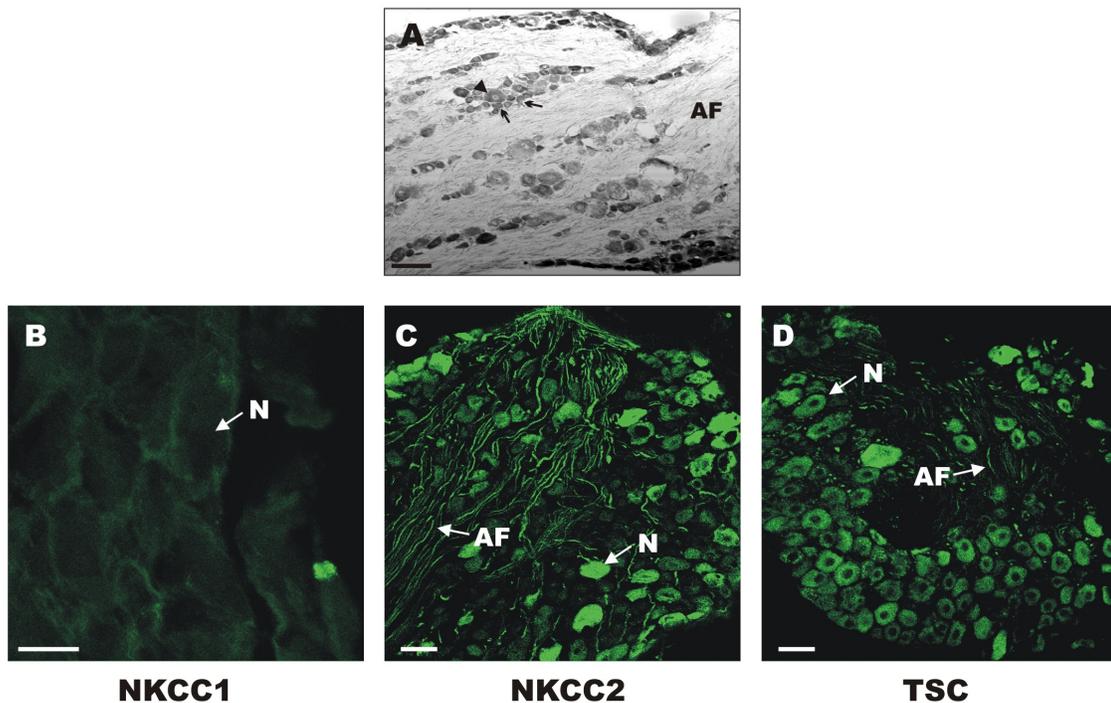


Abbildung 3.28: Immunzytochemischer Nachweis der Kationen/ Cl^- -Kotransporter NKCC1, NKCC2 und TSC in 25 μm dicken DRG-Schnitten. (A) Durchlichtaufnahme eines Richardson-Blau gefärbten DRG-Längsschnitts. Man erkennt afferente Axonfasern (AF) und Zellkörper sehr unterschiedlicher Größen (dicke und dünne Pfeile). (B) Somatosensorische Neurone werden durch NKCC1 nur sehr leicht - im Gegensatz zur Nieren-Positivkontrolle! - gefärbt. (C) NKCC2 färbt große und mittlere somatosensorische Neurone (N) und zusätzlich afferente Axonfasern (AF). (D) TSC färbt sowohl große als auch mittlere somatosensorische Neurone und zum Teil ihre Axonfasern. (Balken in (A): 100 μM ; in (B): 20 μM ; in (C) und (D): 50 μM)

wurde, nur eine sehr schwache Membranfärbung aller somatosensorischer Neurone. Im Gegensatz zu der NKCC1-Färbung eines Nierenschnittes (Abb. 3.24) ist das Signal auf somatosensorischen Zellen schwach. Der Antikörper gegen NKCC2 zeigt dagegen bei ca. 20% der somatosensorischen Neurone eine intensive, bei ca. 30% eine schwache Immunfluoreszenz (Abb. 3.28 (C)). Auch Axonfasern der afferenten Neurone werden im DRG-Schnitt deutlich gefärbt. Abb 3.28 (D) zeigt die Immunfluoreszenz des TSC-Antikörpers auf einem DRG-Schnitt. Fast alle somatosensorischen Neurone (ca. 90%) zeigten eine positive Färbung für TSC. Sowohl sehr kleine als auch große Neurone wurden angefärbt. Zudem waren sowohl afferente als auch efferente Axonfasern immunpositiv für TSC.

Die $[\text{Cl}^-]_i$ frisch dissoziierter, somatosensorischer Neurone wurde mit FLIM bestimmt. Sie betrug 31 mM. Die $[\text{Cl}^-]_i$ der sie umgebenden, nichtneuronalen Satellitenzellen betrug 23 mM. Somatosensorische Neurone besitzen somit eine höhere $[\text{Cl}^-]_i$ als die meisten anderen Neurone, so dass somatosensorische Neurone durch die Öffnung von Cl^- -Kanälen depolarisiert und nicht hyperpolarisiert werden. Anders als beim typischen ZNS-Neuron kann eine Hemmung der Zelle somit nicht durch Cl^- bewirkt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass, der K^+/Cl^- -Kotransporter-Subtyp KCC2, der den Transport von Cl^- aus der Zelle verursacht, in adulten somatosensorischen Neuronen nicht exprimiert wird (Rivera et al., 1999). Dies konnte in meiner Arbeit insofern bekräftigt werden, als dass nur ein sehr schwaches KCC2-Produkt nachgewiesen werden konnte. Durch RT-PCR-Experimente und Immunhistochemie wurde hier ebenfalls gezeigt, dass die Na^+ -abhängigen Cl^- -Transporter TSC und NKCC2 und der K^+ -abhängige Cl^- -Transporter KCC1 in DRGs exprimiert werden. Die Expression von KCC1 in DRGs wurde in RT-PCR-Experimenten gezeigt, das entsprechende Protein konnte jedoch aufgrund des unspezifischen Antikörpers nicht in DRG-Schnitten lokalisiert werden.

4 Diskussion

Mindestens acht Arbeitsgruppen (Ran, Fuller & Benos; Kotlikoff & Ji; Gaspar, Racette, Loewen & Forsyth; Romio, Musante & Galiotta; Komiya & Hirohashi; Abdel-Ghany & Levine; Gruber; Gandhi, Elble & Pauli) beschäftigen sich mit CLCA-Proteinen. Die meisten Gruppen gehen davon aus, dass CLCA-Proteine Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle in Epithelzellen des Darms, respiratorischer Organe, reproduktiver Organe, in der Niere, der Milz, der Thymusdrüse und auch im Gehirn bilden.

Die Untersuchung der meisten CLCA-Proteine lief sehr ähnlich ab: sie wurden anhand ihrer Homologie kloniert, heterolog exprimiert und fünf der CLCA-Proteine wurden bislang elektrophysiologisch untersucht (Cunningham et al., 1995; Gruber et al., 1998; Gruber und Pauli, 1999b; Gandhi et al., 1998; Romio et al., 1999; Elble et al., 2002). Die Kanalfunktion wurde an *clca*-transfizierten Zellen getestet, die mit Ionomycin Ca^{2+} -permeabilisiert wurden. Auf diese Weise wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf mindestens 1 mM erhöht. Unter diesen Bedingungen konnten in Whole-Cell-Ableitungen Cl^- -Ströme gemessen werden. Die Gewebeexpression der *clca*-Gene wurde in vielen Fällen mit Hilfe von PCR-Experimenten, Northernblots und *in situ*-Hybridisierung untersucht. Nur in einem Fall wurde ein Antikörper erfolgreich dazu verwendet, das CLCA-Protein im Gewebe zu lokalisieren (bCLCA2; Elble et al., 1997). Des Weiteren wurden die heterolog exprimierten Proteine durch Westernblot-Analyse untersucht.

4.1 Ist rCLCA1 der Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal der Riechsignalkaskade?

Am Beginn dieser Arbeit stand die Hypothese, dass rCLCA1 an der Bildung des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal der Riechsignalkaskade beteiligt ist. Ein ausschlaggebendes Argument war die Lokalisation des *rclca1*-Gens in den Riechzellen. Nach den Versuchen an Odora-Zellen kann, meines Erachtens, die Hypothese jedoch nicht mehr aufrechterhalten werden.

Odora-Zellen besitzen große Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme, die dem nativen Kanal in Ca^{2+} -

Empfindlichkeit und Pharmakologie gleichen. So besitzen Odora-Zellen zum Beispiel eine Ca^{2+} -Empfindlichkeit, die durch einen $K_{1/2}$ -Wert von $1,5 \mu\text{M}$ gekennzeichnet ist. Der Hill-Koeffizient beträgt $n = 3,5$ (Dr. H. Kaneko, persönliche Mitteilung). Der Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal aus Riechzellen besitzt dagegen einen $K_{1/2}$ -Wert von $2,2 \mu\text{M}$ und einen Hill-Koeffizienten von $n = 3$ (Reisert et al., 2003). Das lässt vermuten, dass für den Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanal in Riechzellen und Odora-Zellen das gleiche Gen kodiert, obwohl das noch nicht abschließend untersucht wurde. Die Zellen exprimieren jedoch weder das *rclca1*-Gen (s. Kapitel 3.4) noch das in dieser Arbeit charakterisierte rCLCA1-Protein (s. 3.4). Die Hypothese, dass rCLCA1 und der Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanal in Riechzellen identisch sind, lässt sich also nicht mehr halten. Wie aber können die Ergebnisse meiner Arbeit erklärt werden?

4.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung

Die funktionelle Untersuchung der CLCA-Proteine (Übersicht: Fuller und Benos, 2000, Jentsch et al., 2002) ist bislang nicht mit kritischer Sorgfalt durchgeführt worden. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Protokoll zur elektrophysiologischen Untersuchung Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Ströme entwickelt (Strünker, 2002). Unter Berücksichtigung physiologisch relevanter Bedingungen war die funktionelle Expression nicht möglich. Es traten zwar Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme in *rclca1*-transfizierten Zellen auf, die jedoch nicht die Eigenschaften des nativen Riechzellkanals besaßen. Wie ich in Abschnitt 3.4 des Ergebnisteils gezeigt habe, war die Ursache dafür nicht die fehlerhafte proteolytische Prozessierung des heterolog exprimierten Proteins. Auch das Fehlen weiterer CLCA-Untereinheiten zur Ausbildung heterooligomerer Kanäle wurde durch Koexpression von rCLCA1 mit mCLCA1 und mCLCA2 sowie Koexpression von hCLCA1 und hCLCA2 ausgeschlossen (Dr. H. Kaneko, persönliche Mitteilung).

Die nicht-gelungene funktionelle Expression ist deshalb schwer zu interpretieren. Für das Auftreten von Cl^- -Strömen bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen in *rclca1*-transfizierten Zellen gibt es auch andere Erklärungen:

- Es ist möglich, dass bei der Expression von rCLCA1 in tsA-Zellen ein endogenes, zelleigenes Protein hochreguliert wurde. Dieses Protein könnte wiederum einen messbaren

Cl⁻-Strom bewirken (Gruber und Pauli, 1999b; Romio et al., 1999). Ein solcher Mechanismus wurde z.B. bei zystischer Fibrose beobachtet: Hier wird in Epithelzellen ein Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanal hochreguliert, wenn durch einen genetischen Defekt ein cAMP-aktivierter Cl⁻-Kanal (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein*, CFTR) ausfällt.

- Ebenfalls wäre möglich, dass die Cl⁻-Leitfähigkeit (die von mehreren Gruppen für CLCA-Proteine beschrieben wurde) von rCLCA1 nur ein Artefakt darstellt. Es wäre denkbar, dass das Protein eine ganz andere Funktion besitzt. Für einige CLCA-Proteine werden z.T. neben der Funktion als Cl⁻-Kanal auch die Beteiligung an Zell-Zell-Wechselwirkungen (Elble et al., 1997; Abdel-Ghani et al., 2001) postuliert. Es wäre möglich, dass die erhöhte Cl⁻-Leitfähigkeit allein durch die unphysiologisch hohe Ca²⁺-Konzentration zu Stande kommt; beispielsweise über eine der vielfältigen Funktionen von Ca²⁺ als “second messenger“.

4.1.2 rCLCA1-Lokalisierung in Riechzilien

Die Hypothese, dass rCLCA1 an der Signaltransduktion in Riechzellen beteiligt ist, basiert auf der Beobachtung, dass rCLCA1 in der Zilienpräparation schwach angereichert ist. Die Zilienpräparation hat in einer Reihe von Studien zur biochemischen Charakterisierung aller an der Signaltransduktion beteiligten Proteine gedient (u.a. G_{olf}, AC III, CNG-A2, CNG-A4, CNG-B1b). Die Lokalisierung von rCLCA1 in den Zilien konnte jedoch immunhistochemisch nicht bestätigt werden. Auf Riechepithelschnitten erkannten mehrere rCLCA1-Antikörper Tight-Junction-Strukturen, aber nicht den Ziliensaum des Epithels. Wie lassen sich die scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse der Westernblot-Studie und Immunhistochemie erklären?

Möglicherweise ist die ausreichende Spezifität der rCLCA1-Antikörper in der Immunhistochemie nicht gegeben. Obwohl die zuvor charakterisierten rCLCA1-Antikörper auf Westernblots dasselbe Bandemuster zeigten, ergaben sie auf Rattennasen-Schnitten z.T. unterschiedliche Färbemuster. Vier von fünf verschiedenen rCLCA1-Antikörpern färben Tight-Junction-Strukturen (301.P1, 302.P1, 302.P3, DchB, vgl. auch Jülich, 2002). Es gibt Beispiele dafür, dass spezifische Antikörper ihr Antigen zwar im Westernblot, nicht aber auf Gewebeschnit-

ten detektieren (z.B. CNG-A4, Bönigk et al., 1999). Dafür kann es folgende Erklärungen geben:

- Das Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet ist, wird nur im denaturierten Zustand (zum Beispiel in der SDS-PAGE) erkannt, nicht aber im nativ gefalteten Protein. Das kann besonders bei kleinen Epitopen auftreten, wie sie für die Herstellung der Peptidantikörper verwendet wurden.
- Das Epitop ist durch die Fixierung des Gewebeschnitts maskiert.

Allerdings treten bei dem Beispiel der CNG-A4, bei dem das Protein funktionell und mit Hilfe von Westernblots in Riechzellen lokalisiert wurde (Bönigk et al., 1999), gar keine - also auch keine unspezifischen - Färbungen des olfaktorischen Epithels auf, während die rCLCA1-Antikörper verschiedene Strukturen des olfaktorischen Epithels anfärbten.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das rCLCA1-Protein nur scheinbar in Riechzilien gegenüber dem olfaktorischen Epithel angereichert ist. Im Gegensatz zu den anderen Komponenten der Riechsignalkaskade, zum Beispiel CNG-A2, ist das rCLCA1-Protein in den Zilien nur schwach angereichert. Wie wäre eine nur leichte oder scheinbare Anreicherung zu erklären? Die Zilienpräparation wird durch die Ca^{2+} -Schock-Methode gewonnen. Dabei wird das olfaktorische Epithel in einem Puffer mit hoher Ca^{2+} -Konzentration gewaschen, wodurch die Riechzilien abgestoßen werden. Dadurch können jedoch auch Fortsätze anderer Zellen (zum Beispiel Mikrovilli der Stützzellen oder auch Membranfragmente der Riechzellen) abgetrennt werden. Es ist möglich, dass rCLCA1 nicht ein Protein aus Zilien ist, sondern ein Protein, das durch die Verunreinigung der Zilienpräparation mit Membranfragmenten anderer Zellen in der Präparation mit angereichert wird. Nach seiner Klonierung wurde das *rclca1*-Gen ausschließlich in den Riechzellen nachgewiesen. Diese Beobachtung könnte ebenso gut mit einer Expression des rCLCA1-Proteins in anderen Bereichen der Riechzelle korrelieren, zum Beispiel im oberen (apikalen) Bereich des Dendriten. Dieser Bereich der Riechzelle könnte durchaus mit in dieser Zilienpräparation enthalten sein. In diesem Bereich liegen die *Zonulae occludentes*, die in der Immunhistochemie von einigen der rCLCA1-Antikörper detektiert wurden. Um die Zilienpräparation auf eine Verunreinigung zu testen, sollten sowohl Anreicherungsexperimente als auch immunhistochemische

Versuche mit bekannten Mikrovilli- und Dendriten-spezifischen Proteinen wiederholt werden.

Die durchgeführten Experimente zur Lokalisierung von rCLCA1 lassen somit nur folgende Schlüsse zu:

- keiner der verwendeten Antikörper besitzt eine geeignete Spezifität für die Immunhistochemie, oder
- rCLCA1 ist ein Tight-Junction-Protein, oder wird von Tight-Junction-Proteinen unspezifisch gebunden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass einigen CLCA-Proteinen eine Funktion als Zell-Adhäsionsmolekül zugesprochen wird (Elble et al., 1997).

4.1.3 rCLCA1 im Vergleich mit anderen CLCA-Proteinen

Aminosäuresequenz und Proteingröße

rCLCA1 wurde anhand der *mclca1*-Sequenz aus cDNA des olfaktorischen Epithels kloniert. Die rCLCA1-Sequenz ist jedoch ähnlicher zu dem zuletzt klonierten *mclca4*-Gen (84% Identität zu *mclca4* im Gegensatz zu 74% Identität zu *mclca1*). Der cDNA-Klon ist 3,0 kB groß und kodiert für ein Protein mit 905 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 100,07 kDa. Diese Daten stimmen gut mit den anderen elf Mitgliedern der CLCA-Familie überein. Der Sequenzvergleich mit allen Mitgliedern der CLCA-Familie ergibt, dass zwei Motive in allen Isoformen hoch konserviert sind: eine Cystein-reiche Region und ein HEXXH-Motiv, das ein typisches Sequenzmotiv Metall-bindender Proteine ist. Welche Funktionen diese Motive in den CLCA-Proteinen besitzen, muss noch untersucht werden. rCLCA1 weist zudem potenzielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A und Proteinkinase C auf. Das rCLCA1-Protein trägt wahrscheinlich ein 21 Aminosäure langes, N-terminales Signalpeptid, das ebenfalls für bCLCA1, bCLCA2, mCLCA1, hCLCA1, hCLCA2, hCLCA3 und pCLCA1 hervorgesagt wurde (nach von Heijne, 1986).

Die heterologe rCLCA1-Expression in tsA-Zellen ergibt ähnliche Translationsprodukte wie für bCLCA2, mCLCA1, hCLCA1 und hCLCA2 beschrieben wurde. rCLCA1 wird

als 125 kDa-Vorläuferprotein exprimiert und anschließend in ein 97 kDa und ein 35 kDa-rCLCA1-Protein gespalten. Eine solche Prozessierung wird auch für bCLCA2, mCLCA1, hCLCA1 und hCLCA2 vorgeschlagen. In heterologen Expressionssystemen verläuft eine proteolytische Spaltung eventuell nicht vollständig oder fehlerhaft. Dagegen sollte die Prozessierung im nativen Gewebe komplett geschehen, das 125 kDa-Protein sollte also vollständig zu 97 kDa und 35 kDa geschnitten werden. Das erklärt, warum ein Protein der Größe 125 kDa in olfaktorischem Gewebe und nicht in Zilien auftritt. Neben rCLCA1 wurde bisher nur pCLCA1 aus nativem Gewebe über eine Westernblot-Analyse nachgewiesen. pCLCA1-spezifische Antikörper detektieren Proteine der Größe 90 kDa und 30 kDa auf einem Westernblot mit Proteinen des Darmepithels. Auch hier tritt keine Bande auf, die höher als 90 kDa liegt, ähnlich wie bei Zilienproteinen, die mit rCLCA1-Antikörpern nachgewiesen wurden.

Prozessierung

Wie oben beschrieben, ist eine Prozessierung von rCLCA1 anzunehmen, die in dieser Arbeit näher untersucht wurde (3.4). Es wurden artifiziell trunkierte rCLCA1-N und -C-Termini hergestellt. Dazu wurde die hoch-konservierte, potenzielle Schnittstelle zwischen Arginin 670 und Tyrosin 671 verwendet. Die errechneten Molekulargewichte dieser Fragmente betragen 74 kDa und 26 kDa. Im direkten Vergleich der molekularbiologisch hergestellten rCLCA1-Fragmente mit den in Zilienproteinen auftretenden Proteinen, fällt auf, dass der artifiziell hergestellte N-Terminus kleiner ist als das in Zilien detektierte Protein. Der artifizielle C-Terminus ist dagegen größer als das native Protein. Das lässt darauf schließen, dass die verwendete Schnittstelle weiter N-terminal liegen muss. Somit kommt auch die für bCLCA2 beschriebene Schnittstelle, die zwar auch in rCLCA1 auftritt, aber weiter C-terminalwärts liegt, nicht in Frage. Das Problem, die richtige Schnittstelle zu finden, könnte durch Sequenzierung der Proteinfragmente gelöst werden. Das Sequenzieren von Proteinen ist jedoch eine aufwändige Methode, die durch das Vorhandensein einer Vielzahl von Proteinen, die auf derselben Höhe wie die rCLCA1-Fragmente im SDS-Gel laufen, erschwert wird. Ob durch eine korrekte proteolytische Prozessierung rCLCA1 doch die Funktion eines Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanals zuteil wird, ist fraglich. Ji et al. zeigen sogar, dass das Entfernen großer Teile des N- und C-Terminus des bCLCA1-Proteins die

vermeintliche Cl^- -Kanal-Funktion nicht verändert (Ji et al., 1998).

Membrantopologie

Die Ergebnisse der Permeabilisierungsstudie an *rclca1*-transfizierten Zellen und die Betrachtung der Hydropathie-Analyse zeigen, dass rCLCA1 wahrscheinlich vier Transmembrandomänen besitzt. Bisher wurden zwei Modelle zur CLCA-Membrantopologie veröffentlicht (Gruber et al., 1998; Gruber und Pauli, 1999b). Abb. 4.1 zeigt diese Modelle, die Gruber et al. für die transmembranale Topologie der CLCA-Proteine hCLCA1 (Mitte) und hCLCA2 (rechts) entworfen haben. Die Grundlage dieser Modelle bieten zum einen die Vor-

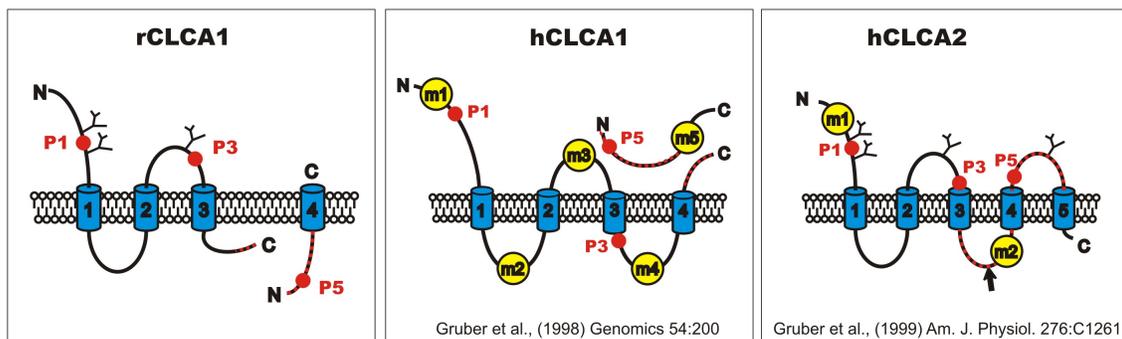


Abbildung 4.1: Vergleich der Modelle zur transmembranalen Topologie von rCLCA1, hCLCA1 und hCLCA2. Die Lage der rCLCA1-Antigene (P1, P3 und P5), gegen die Antikörper hergestellt wurden, sind mit einem roten Punkt eingezeichnet. Das C-terminale Fusionsprotein ist rotgestrichelt eingezeichnet. Die Modelle für hCLCA1 und hCLCA2 wurden aus Gruber et al., 1998 und Gruber et al., 1999 entnommen.

hersage der Membran-durchspannenden Proteinbereiche durch Kyte-Doolittle-Hydropathie-Analysen, zum anderen Experimente mit artifiziell in die hCLCA-Sequenz eingefügten myc-Tags (m1-m5). Myc-Tags sind kurze Proteinfragmente, die mit Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden können. Die Prognose, ob ein myc-Tag intra- oder extrazellulär liegt, wurde mit Hilfe von Permeabilisierungs-Studien an Zellen getroffen, die mit den derart veränderten hCLCA-Genen transfiziert worden waren. Nach den Modellen von Gruber et al. besitzt hCLCA1 vier Membran-durchspannende Domänen, wobei N- und C-Termini extrazellulär liegen. Es wird vorgeschlagen, dass der C-Terminus abgespalten wird, und extrazellulär an das N-terminale Fragment bindet. Für hCLCA2 werden dagegen fünf Transmembrandomänen vorgeschlagen. Es wird postuliert, dass der N-Terminus, der viele mögliche N-

Glykosylierungstellen besitzt, extrazellulär liegt, der C-Terminus dagegen intrazellulär. Um die rCLCA1-Topologie besser mit den Modellen von Gruber et al. vergleichen zu können, sind anhand der Homologie von rCLCA1 zu hCLCA1 und hCLCA2 die Positionen der rCLCA1-Antigene eingezeichnet, gegen die rCLCA1 spezifische Antikörper hergestellt wurden (Abb. 4.1: rote Punkte für P1, P3 und P5 und eine rotgestrichelte Linie für das Antigen des C-terminalen Fusionsproteins). Aus dem Vergleich der Modelle geht hervor, dass rCLCA1 wie hCLCA1 vier Transmembrandomänen besitzt, jedoch bis einschließlich TM3 in seiner Topologie hCLCA2 ähnlicher ist (P3 liegt extrazellulär!). Die Topologie des abgespaltenen rCLCA1-C-Terminus stimmt weder mit den Vorstellungen für hCLCA1 noch hCLCA2 überein. Allerdings wurden die hCLCA1- und hCLCA2-Proteinsequenzen durch das Einfügen von myc-Tags geändert, was eventuell eine veränderte Proteinfaltung bewirken könnte.

4.2 Chloridhomöostase in Riechzellen und somatosensorischen Neuronen

4.2.1 Komponenten der Chloridhomöostase in Riechzellen

Die $[Cl^-]_i$ der Riechzellen beträgt 46-69 mM (Nakamura et al., 1997; Reuter et al., 1998; Kaneko et al., in Vorbereitung). Wie behalten Riechzellen ihre hohe $[Cl^-]_i$ bei? In meiner Arbeit habe ich die Expression verschiedener Kationen/ Cl^- -Kotransporter-Proteine im olfaktorischen Epithel untersucht. Tabelle 4.1 zeigt die Zusammenfassung der RT-PCR- und Immunhistochemie-Daten für Riechzellen.

Es ist interessant, dass KCC2 im olfaktorischen Epithel nicht nachgewiesen werden kann. Das Fehlen von KCC2 - der Kationen/ Cl^- -Kotransporter, der die $[Cl^-]_i$ anderer Neurone gering hält - könnte die hohe $[Cl^-]_i$ der Riechzellen erklären. Das wurde so bereits für somatosensorische Neurone gezeigt.

Abbildung 4.2 zeigt die Verteilung der in den Riechzellen vorherrschenden Ionen. Der am besten untersuchte Mechanismus der Cl^- -Akkumulation durch ein Kotransporter-Protein, ist die Kopplung des Cl^- -Influx an das elektrochemische Potenzial von Na^+ (Payne et al., 2003). Sowohl Na^+ - als auch Cl^- -Konzentrationen sind aber in den Riechzellen und im Mu-

Tabelle 4.1: Expression von Kationen/ Cl^- -Kotransportern in Riechzellen

Kotransporter-Subtyp	PCR	Immunhistochemie
KCC1	+	?
KCC2	-	?
NKCC1	+	-
NKCC2	-	-
TSC	+	-

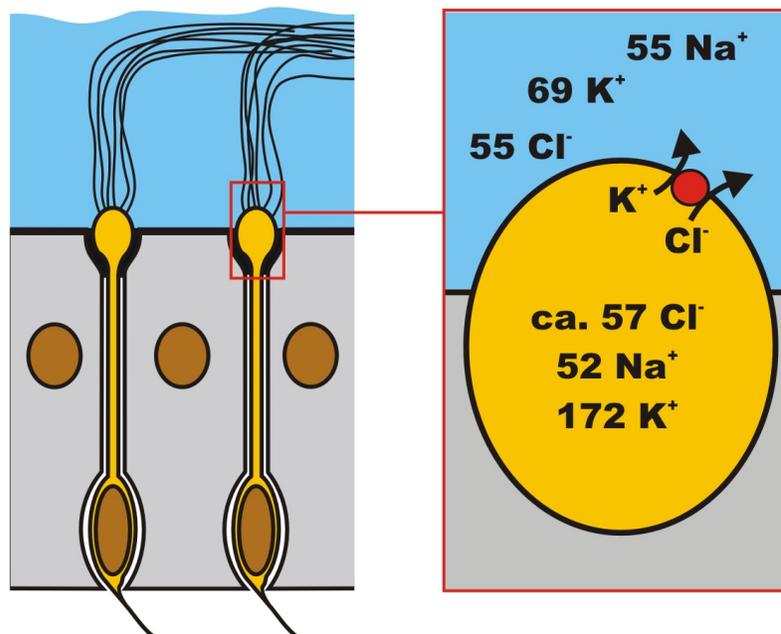


Abbildung 4.2: Verteilung der wichtigsten Ionensorten in der Riechzelle und im Mukus. Aufgrund der dargestellten Ionenverteilung könnte ein elektroneutraler Kationen/ Cl^- -Kotransporter nur einen Cl^- -Auswärtsstrom erzeugen.

kus in etwa gleich. Es besteht somit kein Gradient für diese Ionen, die einen Kationen/ Cl^- -Kotransporter antreiben könnten. Allein die K^+ -Konzentration ist in der Riechzelle viel höher als im Mukus, so dass durch den K^+ -Flux nach außen in jedem Fall nur ein Cl^- -Ausstrom erfolgen kann. Somit wäre TSC, dem kein K^+ -Auswärtsgradient entgegenwirkt, in diesem Fall geeigneter für die Cl^- -Akkumulation in Riechzellen. Diese Tatsache ist konsistent mit dem Ergebnis, dass keiner der untersuchten Kationen/ Cl^- -Kotransporter in den olfaktorischen

Neuronen lokalisiert werden kann. Zudem haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit spezifischen Blockern der verschiedenen Kationen/ Cl^- -Kotransporter ergeben, dass ein Na^+ -Transporter an der Cl^- -Aufnahme nicht beteiligt sein kann (Kaneko et al., in Vorbereitung). Das schließt folglich sowohl TSC als auch NKCC1 aus. Der Cl^- -Aufnahme-Mechanismus bleibt somit weiterhin ungeklärt und es wird deutlich, dass nur ein aktiver Cl^- -Aufnahme-Mechanismus in den Riechzellen funktionieren kann. Infolgedessen sollte weiterhin die Expression aktiver Cl^- -Transporter, wie zum Beispiel der Cl^- -ATPasen, untersucht werden.

4.2.2 Chloridhomöostase in somatosensorischen Neuronen

In meiner Arbeit habe ich erstmals mit der Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse (FLIM) die $[\text{Cl}^-]_i$ frisch dissoziierter, somatosensorischer Neurone gemessen. Sie betrug 30 mM. Mit diesen Messungen konnte ich die hohe $[\text{Cl}^-]_i$ der Zellen von 24-53 mM, die bereits von Alvarez-Leefmans et al. (1988) und Gallagher et al., (1978) postuliert wurde, bekräftigen. Die Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit eines Fluorophors besitzt jedoch gegenüber den Methoden, die andere Arbeitsgruppen für $[\text{Cl}^-]_i$ -Messungen verwenden, einige Vorteile:

- FLIM ist nicht-invasiv, da der nicht-toxische Cl^- -Farbstoff MQAE verwendet wird; Außerdem können FLIM-Messungen leicht an Gewebeschnitten durchgeführt werden.
- Die Messungen sind mit geringem Aufwand (im Gegensatz zum Beispiel zur EDXA-Methode) verbunden.
- Messungen können direkt verfolgt und auch während des Versuchs beispielsweise über die Badlösung beeinflusst werden.
- Ist die Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) für einen Zelltyp bestimmt, dann können Zellen unterschiedlicher Präparationen direkt miteinander verglichen werden.

Die FLIM-Methode hat allerdings nicht nur Vorteile. Vor allem die Eichung, also die Bestimmung der Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) eines Zelltyps, ist für die Zellen hoch-toxisch. K_{SV} wird mit Hilfe der stark giftigen Ionophoren Nigericin und Tributylzinn durchgeführt, die die Zellmembran für Cl^- -permeabilisieren. Die Ionophoren werden dazu verwendet, um die $[\text{Cl}^-]_i$ über die Badlösung einzustellen. Tributylzinn wird für diese Zwecke standardmäßig

verwendet. Es zerstört innerhalb weniger Minuten diverse physiologische Funktionen der Zelle, so dass Apoptose eingeleitet wird (Viviani et al., 1995; Nishikimi et al., 2001). Somatosensorische Neurone, die vor Beendigung der Messung lysierten, wurden aus der Analyse herausgenommen. Die Verwendung von weniger als 40 μM Tributylzinn ergab jedoch keine ausreichende Permeabilisierung der Zellen. Sogar mit 40 μM Tributylzinn war die Eichung der Zellen nur in einem sehr begrenzten Bereich (bis 20 mM Cl^-) möglich. Zur Zeit sind Triorganozinn-Verbindungen jedoch die einzigen erhältlichen Cl^- -Ionophoren. Es wurden allerdings bereits andere Verbindungen diskutiert, die als Cl^-/H^+ -Symporter oder Cl^-/OH^- -Austauscher dienen können und somit vielleicht in Zukunft eine bessere Möglichkeit zur die Cl^- -Permeabilisierung der Zelle bieten könnten (Sato et al., 1998).

Die Verwendung der FLIM-Methode hat außerdem den Nachteil, dass unterschiedliche Zelltypen nicht direkt während der Messung miteinander verglichen werden können. Dazu müssen die τ -Messdaten zunächst über die jeweilige K_{SV} und τ_0 in die $[\text{Cl}^-]$ umgerechnet werden.

4.2.3 Expression der Kationen/ Cl^- -Kotransporter in DRGs

Tabelle 4.2: Komponenten der Cl^- -Homöostase in somatosensorischen Neuronen

Kotransporter-Subtyp	PCR	Immunhistochemie
KCC1	+	?
KCC2	schwach	?
NKCC1	-	-
NKCC2	+	+
TSC	+	+

Meine Daten zur Expression der Kationen/ Cl^- -Kotransporter KCC1 und KCC2 bekräftigen die Daten von Kanaka et al. (2001) und die Untersuchung zur GABA-Funktionsänderung während der Ontogenese (*“chloride switch“*, Rivera et al. (1999)). Leider konnte die KCC1-Expression nicht über immunhistochemische Versuche bestätigt werden, da der gekaufte Antikörper unspezifisch war. Überraschend ist das Ergebnis, dass ich nicht NKCC1, sondern NKCC2 in somatosensorischen Neuronen nachweisen konnte. Diese Daten

widersprechen den bisherigen Untersuchungen zur NKCC-Expression. Plotkin et al. (1997) wiesen NKCC1 immunhistochemisch in den somatosensorischen Neuronen der Ratte nach. Kanaka et al. und Plotkin et al. (1997) konnten das NKCC1-Gen mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung in somatosensorischen Neuronen nachweisen. Beide Arbeitsgruppen zeigen jedoch unabhängig voneinander, dass das NKCC1-Gen zwar in fast allen Zellen exprimiert wird, dort aber nur schwach detektiert wird. Sung et al. (2000) zeigten durch Untersuchungen des GABA-Umkehrpotentials somatosensorischer Neurone einer homozygoten NKCC1-*“Knock-Out“*-Maus, dass NKCC1 vermutlich an der Cl^- -Akkumulation beteiligt ist. Allerdings kann durch die unterbundene NKCC1-Expression ein Cl^- -Ausstrom nicht vollständig unterdrückt werden, da das Cl^- -Gleichgewichtspotential auch hier immer noch über dem Ruhemembranpotential liegt. Falls NKCC1 überhaupt in den somatosensorischen Neuronen exprimiert wird, müsste somit zusätzlich eine weitere Komponente existieren, die zur Cl^- -Akkumulation in den Neuronen beiträgt. Das wurde jedoch bislang nicht weiter untersucht. Alvarez-Leefmans et al. (2001) führten immunhistochemische Versuche mit einem NKCC-Antikörper durch, der sowohl die NKCC1- als auch die NKCC2-Isoform erkennt. Sie zeigen eine starke NKCC-Expression in den somatosensorischen Neuronen und deren Nervenfasern. Es ist möglich, dass nicht NKCC1, sondern NKCC2 für die Cl^- -Akkumulation in somatosensorischen Neuronen zuständig ist, so wie es die RT-PCR und immunhistochemischen Experimente meiner Arbeit implizieren. Neben KCC1 und NKCC2 konnte ich zusätzlich die Expression des Na^+/Cl^- -Kotransporters TSC in somatosensorischen Neuronen nachweisen, was bisher nicht beschrieben wurde. Beide können zusammen für die Aufrechterhaltung der $[\text{Cl}^-]_i$ somatosensorischer Zellen sorgen und somit die Aktivierung durch Cl^- ermöglichen.

In meiner Arbeit habe ich die einzigen bekannten Nervenzelltypen untersucht, die aktiv Cl^- akkumulieren: Riechzellen und somatosensorische Neurone. Beides sind Sinneszellen, die Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle exprimieren. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erzeugt deshalb bei diesen Zellen eine Depolarisation durch Cl^- -Efflux und damit eine Verstärkung der elektrischen Aktivität. Da diese Vorgänge im Einzelnen noch unverstanden sind, habe ich in meiner Arbeit die Gemeinsamkeiten dieser Zellen untersucht. Weder Riechzellen noch somatosensorische Neurone exprimieren KCC2, den Kotransporter, der die intrazelluläre Cl^- -Konzentration in den Neuronen des ZNS soweit absenkt ($< 10 \text{ mM}$), dass die Zellen durch Cl^- -Influx hyperpolarisiert werden. Wahrscheinlich fehlt den in dieser Arbeit untersuchten Nervenzelltypen auch der Kationen/ Cl^- -Kotransporter NKCC1. Somit bleibt der Cl^- -Aufnahmemechanismus in die Zelle weiterhin ungeklärt. Um diese Frage zu klären, sollte als nächstes die Expression der Proteine, die einen aktiven Cl^- -Aufnahmemechanismus bewirken, wie zum Beispiel der Cl^- -ATPasen, in diesen Nervenzellen untersucht werden. Es bestand die Hypothese, dass CLCA-Proteine Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle darstellen. Das habe ich am Beispiel von rCLCA1 untersucht. Seine Beteiligung am Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strom der Riechzellen konnte ich mit hinreichender Gewissheit ausschließen. Die Frage, welches Gen für diesen Kanal kodiert, muss nun neu angegangen werden. In Anbetracht der hohen Expressionsdichte des Kanals in Riechzellen (Reisert et al., 2003) wäre eine Expressionklonierung aus nativem Gewebe oder einer Riechzelllinie, wie zum Beispiel Odora, die richtige Strategie.

Literaturverzeichnis

- Abdel-Ghani, M., Cheng, H., Elble, R., und Pauli, B. (2001). The breast cancer beta (4) integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J. Biol. Chem.*, 276:25438–25446.
- Agnel, M., Verinat, T., und Culouscou, J. (1999). Identification of the three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. *FEBS Letters*, 455:295–301.
- Alvarez-Leefmans, F., Gamino, S., Giraldez, F., und Nogueron, I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J. Physiol.*, 406:225–246.
- Bakalyar, H. und Reed, R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 250:1403–1406.
- Bevensee, M., Apkon, M., und Boron, W. (1997). Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus. *J. Gen. Physiol.*, 110:467–483.
- Birnboim, H. und Doley, J. (1979). A rapid alkaline extracion procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, 7:1513–1523.
- Bönigk, W., Bradley, J., Müller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnett, G., Kaupp, U., und Frings, S. (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J Neurosci.*, 13:5332–5347.
- Breer, H., Boekhoff, I., und Tarelius, E. (1990). Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature*, 345:65–68.
- Breer, H., Ramig, K., und Krieger, J. (1994). Signal recognition and transduction in olfactory neurons. *Biochem. Biophys. Acta*, 1244:277–287.

- Breer, H., Wanner, I., und Strotmann, J. (1996). Molecular genetics of mammalian olfaction. *Behav. Genet.*, 26:209–219.
- Buck, L. und Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65:175–187.
- Bullock, W., Fernandez, J., und Short, J. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5:376–379.
- Campbell, D., Leuscher, E., und Lerman, L. (1951). Immunologic absorbents. Isolation of an antibody by means of a cellulose-protein antigen. *J. of Neuroscience*, 37:575–578.
- Chao, A., Dix, J., Sellers, M., und Verkmann, A. (1989). Fluorescence measurement of chloride transport in monolayer cultured cells. *Biophys. J.*, 56:1071–1081.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molec. Cell. Biol.*, 7:2745–2752.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J., und Ben-Ari, Y. (1991). GABA: an excitatory neurotransmitter in early postnatal life. *Trends in Neurosci.*, 14:515–519.
- Cunningham, S., Awayda, M., Bubien, J., Ismailov, I., Arrate, M., Berdiev, B., und Fuller, D. B. (1995). Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J. Biol. Chem.*, 270:31016–31026.
- DeFazio, R., Keros, S., Quick, M., und Hablitz, J. (2000). Potassium-coupled chloride transport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 20(21):8069–8076.
- Dhallan, R., Yau, K., Schrader, K., und Reed, R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature*, 347(6289):184–187.
- Dubin, A. und Dionne, V. (1994). Action potentials and chemosensitive conductances in the dendrites of olfactory neurons suggest new features for odor transduction. *J Gen Physiol.*, 103:181–201.

- Dzeja, C., Hagen, V., Kaupp, U., und Frings, S. (1999). Ca-permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.*, 18:131–144.
- Eberhardson, M., Patterson, S., und Grapengiesser, E. (2000). Microfluorimetric analysis of Cl-permeability and its relation to oscillatory Ca-signalling in glucose-stimulated pancreatic β -cells. *Cell. Signal.*, 12:781–786.
- Eberius, C. und Schild, D. (2001). Local photolysis using tapered quartz fibres. *Pflugers Arch.*, 443:323–330.
- Ecelbarger, C., Terris, J., Hoyer, J., Nielsen, S., Wade, J., und Knepper, M. (1996). Localization and regulation of the rat renal Na-K-2Cl-cotransporter BSC-1. *Am. J. Physiol.*, 271:F619–F628.
- Elble, R., Ji, G., Nehrke, K., DiBiasio, J., Kingsley, P., Kotlikoff, M., und Pauli, U. (2002). Molecular and functional characterization of a murine calcium-activated chloride channel expressed in smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 277(21):18586–18591.
- Elble, R., Widom, J., Gruber, A., Abdel-Ghany, M., Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H.-C., und Pauli, B. (1997). Cloning and characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. *J. Biol. Chem.*, 272:27853–27861.
- England, S., Hebllich, F., James, I., Robbins, J., und Docherty, R. (2001). Bradykinin evokes an Ca-activated chloride current in non-neuronal cells isolated from neonatal rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.*, 530:395–403.
- Firestein, S., Darrow, B., und Shepherd, G. (1991). Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron*, 6:825–835.
- Freitag, J., Ludwig, G., Andreini, I., und Breer, P. R. H. (1998). Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J. Comp. Physiol.*, 183:635–650.

- Frings, S., Lynch, J., und Lindemann, B. (1992). Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity and blockage. *J. Gen. Physiol.*, 100:45–67.
- Frings, S., Reuter, D., und Kleene, S. (2000). Neuronal Ca-activated Cl-channels - homing in on an elusive channel species. *Progress in Neurobiology*, 60:247–289.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M., und Kaupp, U. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, 15:169–179.
- Fuller, C. und Benos, D. (2000). Electrophysiological characteristics of the Ca-activated Cl-channel family of anion transport proteins. *Clinic. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27:906–910.
- Gallagher, J., Hihashi, H., und Nishi, S. (1978). Characterization and ionic basics of GABA-induced depolarizations recorded *in vitro* from cat primary afferent neurons. *J. Physiol.*, 275:263–282.
- Galvan, M., Dörge, M., Beck, F., und Rick, R. (1984). Intracellular electrolyte concentrations in rat sympathetic neurones measured with an electron microprobe. *Pflügers Arch.*, 400:274–279.
- Gamba, G., Miyanoshita, A., Lombardis, M., Lytton, J., Lee, W., Hediger, M., und Hebert, S. (1994). Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chlorid cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.*, 269:17713–17722.
- Gamba, G., Saltzberg, S., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton, J., Hediger, M., Brenner, B., und Hebert, S. (1993). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2749–2753.
- Gandhi, R., Elble, R., Gruber, A., Schreur, K., Ji, H.-L., Fuller, C., und Pauli, B. (1998). Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J. Biol. Chem.*, 273:32096–32101.

- Gaspar, K., Racette, K., Gordon, J., Loewen, M., und Forsyth, G. (2000). Cloning a chloride conductance mediator from the apical membrane of porcine ileal enterocytes. *Physiol. Gen.*, 3:101–111.
- Gillen, C., Brill, S., Payne, J., und Forbush, B. (1996). Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J. Biol. Chem.*, 271:16237–16244.
- Ginns, S., Knepper, M., Ecelbarger, C., Terris, J., He, X., Coleman, R., und Wade, J. (1996). Immunolocalization of the secretory isoform of Na-K-Cl-cotransporter in rat renal intercalated cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7:2533–2542.
- Gruber, A., Elble, R., Ji, H.-L., Schreur, K., Fuller, C., und Pauli, B. (1998). Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca-activated Cl-channel proteins. *Genomics*, 54:200–214.
- Gruber, A., Fuller, C., Elble, R., Benos, D., und Pauli, B. (2000). The CLCA gene family: a novel family of putative chloride channels. *Current Genomics*, 1:201–222.
- Gruber, A. und Pauli, B. (1999a). Molecular cloning and biochemical characterization of a truncated, secreted member of the human family of Ca-activated Cl-channels. *Biochim. Biophys. Acta*, 1444:418–423.
- Gruber, A. und Pauli, B. (1999b). Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res.*, 59:5488–5491.
- Gruber, A., Schreur, K., Ji, H.-L., Fuller, C., und Pauli, B. (1999). Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am. J. Physiol.*, 276:C1261–C1270.
- Gulyàs, A., Sík, A., Payne, J., Kaila, K., und Freund, T. (2001). The KCl cotransporter KCC2 is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, 13:2205–2217.

- Hallani, M., Lynch, J., und Barry, P. (1998). Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.*, 161:163–171.
- Heery, D., Gannon, F., und Powell, R. (1990). A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.*, 6:173.
- Jentsch, T., Stein, V., Weinreich, F., und Zdebik, A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.*, 82:503–568.
- Ji, H.-L., DuVall, M., Patton, H., Satterfield, C., Fuller, C., und Benos, D. (1998). Functional expression of a truncated Ca-activated Cl-channel and activation by phorbol ester. *Am. J. Physiol.*, 274:C455–C464.
- Jones, D. und Reed, R. (1989). G_{olf} : An olfactory neuron specific G-protein involved in odorant signal transduction. *Science*, 244:790–795.
- Jülich, S. (2002). Charakterisierung des rCLCA1-Proteins in sensorischen Zilien von Riechzellen. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Kanaka, C., Ohno, K., Okabe, A., Kuriyama, K., Itoh, T., Fukuda, A., und Sato, K. (2001). The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl-cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl-cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience*, 104:933–946.
- Kaneko, H., Nakamura, T., und Lindemann, B. (2001). Noninvasive measurement of chloride concentration in rat olfactory receptor cells with use of a fluorescent dye. *Am. J. Physiol.*, 280:C1387–C1393.
- Kaneko, H., Putzier, I., Frings, S., und Gensch, T. (2002). Determination of Intracellular Chloride Concentration in Dorsal Root Ganglion Neurons by Fluorescence Lifetime Imaging. *Current Topics in Membranes*, 52:167–189.
- Kaupp, U. und Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 63:235–257.

- Kaup, U. und Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide gated ion channels. *Physiol. Rev.*, 82:769–824.
- Kleene, S. (1993). Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron*, 11:123–132.
- Kleene, S. (1995). Block by external calcium and magnesium of the cyclic-nucleotide-activated current in olfactory cilia. *Neuroscience*, 66:1001–1008.
- Kleene, S. (1997). High-gain, low-noise amplification in olfactory transduction. *Biophys J.*, 73:1110–1117.
- Kleene, S. und Gesteland, R. (1981). Dissociation of frog olfactory epithelium with N-ethylmaleimide. *Brain Res.*, 229(2):536–540.
- Kleene, S. und Gesteland, R. (1991). Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci.*, 11:3624–3629.
- Komiya, T., Tanigawa, Y., und Hirohashi, S. (1999). Cloning and identification of the gene gob-5, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255:347–351.
- Kurahashi, T. und Yau, K. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature*, 363:71–74.
- Kyte, J. und Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157:105–132.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Lakowicz, J. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Pub Corp., 2 Edition.
- Lau, K., Evans, R., und Case, R. (1994). Intracellular chloride concentration in striated intralobular ducts from rabbit mandibular salivary glands. *Pflügers Arch.*, 427:24–32.

- Lee, D., Ha, S., Kho, Y., Kom, J., Cho, K., Baik, M., und Choi, Y. (1999). Induction of mouse Ca-sensitive chloride channel 2 gene during involution of mammary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264:933–937.
- Leinders-Zufall, T., Rand, M., Sheperd, G., Greer, C., und Zufall, F. (1997). Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: Spatiotemporal dynamics. *J. Neurosci.*, 17:4136–4148.
- Li, Y., Schaffner, A., Walton, M., und Barker, J. (1998). Astrocytes regulate developmental changes in the chloride ion gradient of embryonic rat ventral spinal cord neurons in culture. *J. Physiol. Lond.*, 509:847–858.
- Liapis, H., M., Nag, und Kaji, D. (1998). K-Cl-cotransporter expression in the human kidney. *Am. J. Mol. Biol.*, 275:C1432–C1437.
- Lowe, G. und Gold, G. (1993). Nonlinear amplification by calcium dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature*, 366:283–286.
- Lytle, Xu, Biemesderfer, und Forbush (1995). Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.*, 269:C1496–C1505.
- Maglova, L., Crowe, W., Smith, P., Altamirano, A., und Russel, J. (1998). Na-K-Cl cotransport in human fibroblasts is inhibited by cytomegalovirus infection. *Am. J. Physiol.*, 275:C1330–C1341.
- Mandel, M. und Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53:159–162.
- Mayer, M. (1985). A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neruones in culture. *J. Physiol. Lond.*, 364:217–239.
- Meyer, T. und Lamberts, B. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta*, 107:144–145.
- Moore-Hoon, M. und Turner, R. (1998). Molecular characterization of the cation-chloride cotransporter family. *Europ. J. Morphol.*, 36:137–141.

- Mount, D., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A., Delpire, E., und Gamba, G. (1999). Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J. Biol. Chem.*, 274:16355–16362.
- Mullis, K., Faraone, F., Schar, S., Saiki, R., Horn, G., und Ehrlich, H. (1986). Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263–273.
- Murell, J. und Hunter, D. (1999). An olfactory sensory neuron line, *Odora*, properly targets olfactory proteins and responds to odorants. *J. Neurosci.*, 19:8260–8270.
- Nakamura, T., Kaneko, H., und Nishida, N. (1997). Direct measurement of the chloride concentration in newt olfactory receptors with the fluorescent probe. *Neuroscience Letters*, 237:5–8.
- Nilius, B. und Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol. Scand.*, 177:119–147.
- Nishikimi, A., Kira, Y., Kasahara, E., Sato, E., Kanno, T., Utsumu, K., und Inoue, M. (2001). Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome C release. *Biochem. J.*, 356:621–626.
- Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y., und Lancet, D. (1985). Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Neuron*, 316:255–258.
- Pauli, B., Abdel-Ghany, M., Cheng, H., Gruber, A., Archibald, H., und Elble, R. (2000). Molecular characteristics and functional diversity of CLCA family members. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27:901–905.
- Payne, J., Rivera, C., Voipio, J., und Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neuroscience*, 26(4):199–206.
- Payne, J., Stevenson, T., und Donaldson, L. (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal specific isoform. *J. Biol. Chem.*, 271:16245–16252.

- Pfeuffer, E., Mollner, S., Lancet, D., und Pfeuffer, T. (1989). Olfactory adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 264:18803–18807.
- Piston, D. (1996). Two-photon excitation microscopy. In Wang, X. und Herman, B., editors, *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*, Volume 137, Seiten 253–272. J. Wiley and Sons, New York.
- Putzier, I. (2000). Methoden zur Untersuchung Kalzium-aktivierter Chloridkanäle in somatosensorischen Neuronen der Ratte. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Reisert, J., Bauer, P., Yau, K.-W., und Frings, S. (2003). The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J. General Physiol.*, 122:1–16.
- Reisert, J. und Matthews, H. (1996). Na-dependent Ca extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *J Gen Physiol.*, 112:529–535.
- Reuter, D., Pierold, K., Schröder, W., und Frings, S. (1998). A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons *in situ*. *Journal of Neuroscience*, Seiten 6623–6630.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J., Ruusuvori, E., Lahtinen, H., Lainsa, K., Pirvola, U., Saarma, H., und Kaila, K. (1999). The K/Cl-co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal modulation. *Nature*, 397:251–255.
- Romio, L., Musante, L., Cinti, R., Seri, M., Moran, O., Zegarra-Moran, O., und Galietta, L. (1999). Characterization of a murine gene homologue to the bovine CACC choride channel. *Gene*, 228:181–188.
- Sambrook, J., Fritsch, E., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 Edition.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463–5467.
- Sato, T., Konno, H., Tanaka, Y., Kataoka, T., Nagai, K., Wassermann, H., und Ohkuma, S. (1998). Prodigiosins as a new group of H/Cl-symporters that uncouple proton translocators. *J. Biol. Chem.*, 273:21455–21462.

- Schild, D. und Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.*, 78:429–466.
- Scott, R. (1995). Aspects of calcium-activated chloride currents: a neuronal perspective. *Pharmac. Ther.*, 66(3):535–565.
- Seifert, R., Eismann, E., Ludwig, J., Baumann, A., und Kaupp, U. (1999). Molecular determinants of a Ca-binding site in the pore of cyclic nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates. *EMBO J.*, 18:119–130.
- Short, J., Fernandez, J., Sorge, J., und Huse, W. (1988). λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.*, 16:7583–7600.
- Strünker, T. (2002). Identifizierung von Ca-aktivierten Cl-Kanälen durch die kontrollierte photolytische Freisetzung von Ca aus DM-Nitrophen. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci. USA*, 76:4350–4353.
- Viviani, B., Rossi, A., Chow, S., und Nicotera, P. (1995). Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *NeuroToxicology*, 16:19–26.
- Xu, J., Lytle, C., Zhu, T., Payne, J., Benz, E., und Forbush, B. (1994). Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2201–2205.
- Zhainazarov, A. und Ache, B. (1995). Odor-induced currents in *Xenopus* olfactory receptor cells measured with perforated-patch recording. *J Neurophysiol.*, 74:479–483.
- Zhu, D., Cheng, C.-F., und Pauli, B. (1991). Generation of monoclonal antibodies directed against organ-specific endothelial cell surface determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9568–9572.
- Zufall, F. und Firestein, S. (1996). Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol.*, 69:1758–1768.

Zufall, F., Firestein, S., und Shepherd, G. (1994). Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:577–607.

A rCLCA1 - Aminosäuresequenz

1	MVPVLKVLFF	LTLHLLQDVK	SKVHLNNG	YEGVVIAINP	SVPEDERLIP	50
				P1: 85 - 99		
51	SLKEMVTQAS	TYLFEATRRR	FYFRNVSILV	PITWKSKEEY	LTPKQESYDQ	100
101	ADVIVADPHL	KYGDDPYTLQ	YGQCGDRGQY	IHFTPNFLLI	DNLSIYGPRG	150
	HEXXH-Motiv					
151	RVFVHEWAHL	RWGVFDEYNK	ERPFYLSRKN	VVEATRCSTD	ITGTNVVHEC	200
201	QGGSCVTRKC	RRDSKTGLPE	PKCTFIPNKS	QTARASIMFL	QSLDSVVEFC	250
251	TEKTHNTEAP	NLQNKICNGR	STWDVIKESA	DLQHAPPMRG	TEAPPPPTFS	300
301	LLKSRQQVVC	LVLDKSGSMS	SGDPITRLTL	MNQAAELYLI	QILEKESLVG	350
351	LVTFDIAIV	QNNLIRMIND	SSYLEISAKL	PQEAAGGTSI	CNGLRKFET	400
401	ITSSDQSTCG	SEIVLLTDGE	DDQISSCFEE	VKHSGAVIHT	IALGPDAARE	450
451	LETLSDMTGG	RRFYASEGIN	GLIDAFSGIS	SKSGSLSQQA	LQLESKALEI	500
				P3: 538-552		
501	KEKEWLSGTV	PVDSTVGNDD	FFVVTWTVQK	PEIILQDPKG	KNYRTSDFQE	550
551	DKLNIFSVRL	QIPGIAETGT	WTYSLFNKGV	KPQLLTVTVT	TRARSPTTQP	600
601	LMATAHMSQS	AAQYPSEMIV	YARVSQGFLP	VLGANVTAVI	ESETGHQVTL	650
			▼ DchB: GST-Fusionsprotein			
651	VLWDNAGAGAD	TLRNDGIYSR	YFTEFHNGR	YSLKVSQAR	KNITKLNKQ	700
701	KNKALYIPGY	VENDQIILNP	PRPEVPPEEAT	EAAVEDFSRL	TSGESFTVSG	750
			P5: 765 - 785			
751	APPDGGHAHV	FPPSKVTDLE	AEFKGDHIHL	TWTAPGKVLG	KGRAHRYVIR	800
801	MSRHPPGLQD	FNDATLVNTS	GLIPKEAGSE	ETFKFKPASF	KIENGTQIYI	850
851	AIQAENEAGL	TSEVSNIAQA	VNFIPPREPSN	PNLGNKMPV	PCLTVLVFVA	900
901	TLFIF	905				

rCLCA1-Proteinsequenz: Die Peptide P1, P3 und P5, die zur erfolgreichen Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden, sind blau dargestellt, ebenso wie der C-terminale rCLCA1-Teil, der zur Herstellung des Fusionsprotein-Antikörpers verwendet wurde. Die Cystein-reiche Region des Proteins ist durch Hervorheben der Cysteinreste in Gelb gekennzeichnet. Potenzielle N-Glycosylierungsstellen sind mit roten Buchstaben dargestellt. Die rCLCA1-Aminosäuresequenz weist eine Bindestelle für Metallionen auf, ein sogenanntes HEXXH-Motiv, das grau gekennzeichnet ist. Das 21 Aminosäuren lange N-terminale Signalpeptid ist in Grün dargestellt. Der Pfeil zeigt eine potenzielle Schnittstelle für die proteolytische Prozessierung. Diese Stelle ist stark konserviert unter den unterschiedlichen CLCA-Proteinen (siehe Sequenzalignment, 8.2). Der Schlüssel für den Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren befindet sich im Abkürzungsverzeichnis.

B Vergleich der CLCA-Proteinsequenzen

Sequenzvergleich aller bislang bekannten CLCA-Proteine: Die Cystein-reiche Region ist durch Hervorhebung der Cysteine in Gelb gekennzeichnet. Das HEXXH-Motiv (grau hervorgehoben. Die Schnittstelle für die proteolytische Prozessierung ist rot, die nur für bCLCA1 und bCLCA2 geltende ist grün hervorgehoben. Ist die Sequenz völlig identisch, wird dies mit einem Sternchen gekennzeichnet; ähnliche Aminosäuren werden durch einen Punkt angezeigt. Lücken in der homologen Sequenz werden durch ein Minuszeichen ausgefüllt. hCLCA3 ist ein trunkiertes Protein, deshalb werden die Ähnlichkeiten ab AS 262 nicht mehr angezeigt. Es ist jedoch ersichtlich, dass sich die Sequenzen stellenweise sehr ähnlich sind (bis zu 84%) und erst am C-Terminus stark voneinander abweichen (hypervariable Region).

RCLCA MV--PVLKVLFLTLHLLQDV-KSSK-----VHLNMNGYEGVVIAINPS 41
MCLCA4 MV--PGLQVLLFRTLHLLQNT-ESSM-----VHLNSNGYEGVVIAINPS 41
MCLCA1 MV--PGLQVLLFRTLHLLQNT-ESSM-----VHLNSNGYEGVVIAINPS 41
MCLCA2 MV--PGLQVLLFRTLHLLQNT-ESSM-----VHLNSNGYEGVVIAINPS 41
BCLCA1 MV--PRLTVILFRTLHLLPGM-KSSM-----VNLINNGYDGIVIAINPS 41
BCLCA2 MV--LCLNVILFRTLHLLPGM-KSSM-----VNLINNGYDGIVIAINPS 41
HCLCA1 MG--PFKSSVFLILHLLEGALSNL-----IQLNMNGYEGIVVAIDPN 42
PCLCA1 MG--SFRSSLFILVHLLEGAQSNL-----IQLNGNGYEGIVIAIDPN 42
MCLCA3 ME--SLKSPVFLILHLLEGVLSL-----IQLNMNGYEGIVIAIDHD 42
HCLCA4 MG--LFRGFVFLVLCLLHQS-NTSF-----IKLNMNGFEDIVIVIDPS 41
HCLCA2 MTQRSIAGPICNLKFVTLVALSSEL PFLGAGVQLQDNGYNGLLIAINPQ 50
HCLCA3 MV--FSLKVILFSL-LLSPVLKSSL-----VTLNMNGYDGIVIAINPS 41
* . * . * * . * . *

RCLCA VPEDERLIPSLKEMVTQASTYLFEATRRRFYFRNVSILVPI TWKSKTEYL 91
MCLCA4 VPEDERLIPSIKEMVTQASTYLFEATERRFYFRNVSILVPI TWKSKTEYL 91
MCLCA1 VPEDERLIPSIKEMVTQASTYLFEASQGRVYFRNISILVPM TWKSKPEYL 91
MCLCA2 VPEDERLIPSIKEMVTQASTYLFEASQGRVYFRNISILVPM TWKSKSEYL 91
BCLCA1 VPEDEKLIQNIKEMVTEASTYL FHATKRRVYFRNVSILIPMTW KSKSEYL 91
BCLCA2 VPEDEKLIENIKEMVTEASTYL FHATKRRVYFRNVSILIPMTW KSKSEYF 91
HCLCA1 VPEDETLIQIQKDMVTQASLYLFEATGKRFYFKNVAI LIPETWTKADYV 92
PCLCA1 VPEDERLIQNIKDMVTKASPYLFEATEKRFYFKNVAI LIPASWAKPEYV 92
MCLCA3 VPEDALIQHIKDMVTQASPYLFEATGKRFYFKNVAI LIPESWAKPEYT 92
HCLCA4 VPDEKIEQIEDMVTTASTYLFEATEKRFFFKNVSI LIPENWKENPQYK 91
HCLCA2 VPENQNLISNIKEMITEASFYLFNATKRRVFFRN I KILIPATWKANNN-S 99
HCLCA3 VPDEKLIQNIKEMVTEASTHLFHATKQRAYFRNVS I LIPMTYKSKSEYL 91
***. . * . . . * . * * . * . * . * . * . * . * . * . . .

RCLCA TPKQESYDQADVIVADPHLKYGDDPYTLQYGQCGDRGQYIHF TPNFLLID 141
MCLCA4 TPKQESYDQADVIVADPHLQHGDPPYTLQYGQCGDRGQYIHF TPNFLLTD 141
MCLCA1 MPKRESYDKADVIVADPHLQHGDPPYTLQYGQCGDRGQYIHF TPNFLLTD 141
MCLCA2 MPKRESYDKADVIVADPHLQHGDPPYTLQYGQCGDRGQYIHF TPNFLLTD 141
BCLCA1 MPKQESYDQAEVIVANPYLKHGDDPYTLQYGRGCEKQYIHF TPNFLLTN 141
BCLCA1 IPKQESYDQADVIVANPYLKYGDDPYTLQYGRGCEKGYIHF TPNFLLTN 141
HCLCA1 RPKLETYKNADVVAESTPPGNDEPYTEQMGNCGEKGERIHL TPDFIAGK 142
PCLCA1 KPKLETYKNADVVTPEPNPPENDGPYTEQMGNCGEKGEKIYF TPDFVAGK 142
MCLCA3 RPKLETYKNADVLSVSTTSPGNDEPYTEHIGACGEKGI R IHLTPDFLAGK 142
HCLCA4 RPKHENHKKADVIVAPPTLPGRDEPYTKQFTECGEKGEYIHF TPDLLL GK 141
HCLCA2 KIKQESYEKANVIVTDWYGAHGDDPYTLQYRGCGEKGYIHF TPNFLLND 149
HCLCA3 IPKQETYDQADVIVADLYLKYGDDPYTLQYGQCGDKQYIHF TPNFLLTN 141
* * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

HEXXH-Motiv

RCLCA NLSI-YGPRGRVVFVHEWAHLRWGVFDEYNKERPFYLSRKNVVEATRCSTD 190
MCLCA4 NLGI-YGPRGRVVFVHEWAHLRWGVFDEYNMDRPFYMSRKNTVEATRCSTD 190
MCLCA1 NLRI-YGPRGRVVFVHEWAHLRWGVFDEYNVDQPFYMSRKNTIEATRCSTR 190
MCLCA2 NLRI-YGPRGRVVFVHEWAHLRWGVFDEYNVDRPFYISRKNTIEATRC SAS 190
BCLCA1 NLPI-YGSRGRAVVFVHEWAHLRWGIFDEYNGDQPFYISRRNTIEATRCSTH 190
BCLCA2 NFHI-YGSRGRVVFVHEWAHLRWGIFDEYNVDQPFYISRKNTIEATRCSTH 190
HCLCA1 KLAE-YGPQKAFVHEWAHLRWGVFDEYNNDEK FYLSNGR-IQAVRCSAG 190
PCLCA1 KVLQ-YGPQGRVVFVHEWAHLRWGVFN EYNNQK FYLSNKK-EQPVICSA A 190
MCLCA3 KLTQ-YGPQDRTFVHEWAHFRWGVFN EYNNDEK FYLSK GK-PQAVRCSAA 190
HCLCA4 KQNE-YGPPGKLFVHEWAHLRWGVFDEYNEDQPFYRAKSKKIEATRC SAG 190
HCLCA2 NLTAGYSGRGRVVFVHEWAHLRWGVFDEYNNDKPFYINGQNQIKVTRCSSD 199
HCLCA3 NLAT-YGPRGKVFVHGWAHLRWGVFDEYNVDQPFYISRRNTTEATRCSTR 190
. * . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

RCLCA	ITGTNVV-HECQGGSCVTR-KCRRDSKTGLPEPKCTF IPNKSQTARASIM	238
MCLCA4	ITGTSVV-RECQGGSCVSR-RCRRDAKTGMQEAKCTF IPNKSQTARASIM	238
MCLCA1	ITGTNVV-HNCERGNVTR-ACRRDSKTRLYEPKCTF IPDKIQTAGASIM	238
MCLCA2	ITGKKVV-HECQRGSCVTR-ACRRDSKTRLYEPKCTF IPDKIQTAGASIM	238
BCLCA1	ITGTNVIVK-CQGGSCITR-PCRDRSQTGLYEAKCTF IPEKSQTARESIM	238
BCLCA2	ITGINVVFKKCPGGSCITS-LCRRDSQTGLYEAKCTFLPKKSQTAKESIM	239
HCLCA1	ITGTNVV-KKCQGGSCYTK-RCTFNKVTGLYEKGCEFVLQSRQTEKASIM	238
PCLCA1	IRGTNVL-PQCQGGSCVTK-PCRADRVTLGLFOKECEF IPDPQQSEKASIM	238
MCLCA3	ITGKNQV-RRCQGGSCITNGKCVIDRVTLGLYKDNCFVFPDPHONKASIM	239
HCLCA4	ISGRNRV-YKCQGGSCLSRA-CRIDSTTKLYGKDCQFFPDKVQTEKASIM	238
HCLCA2	ITGIFV----CEKGPC-PQENCIISK---LFKEGCTF IYNSTQATASIM	241
HCLCA3	IT-VYMLNECKGASCIAR-PFRRDSQTGLYEAKCTF IPKRSQTAKESIV	238
	* . * . . . * * . * . . * .	
RCLCA	FLQSLDSVVEFCTEKTHNTEAPNLQNKICNGRSTWDVIKESADLQHAAPPM	288
MCLCA4	FMQSLDSVVEFCTEKTHNVEAPNLQNKMCNLRSTWDVIKASADFQNASPM	288
MCLCA1	FMQNLNSVVEFCTEKNHNAEAPNLQNKMCNRRSTWDVIKTSADFQNAAPPM	288
MCLCA2	FMQNLNSVVEFCTEKNHNAEAPNLQNKMCNRRSTWDVIKASADFQNSPPM	288
BCLCA1	FMQSLHSVTEFCTEKTHNVEAPNLQNKMCNGKSTWDVIMNSTDFQNTSPM	288
BCLCA2	FMPSLHSVTEFCTEKTHNTEAPNLQNKMCNGKSTWDVIMNSVDFQNTSPM	289
HCLCA1	FAQHVDSIVEFCTEQNHNKEAPNKQKCNLRSTWEVIRDSDFKKTTPM	288
PCLCA1	FAQSIDTVVEFCKEKNHNKEAPNDQKQKCNLRSTWEVIQDSEDFKKTTPM	288
MCLCA3	FNQININSVVEFCTEKNHNQEAAPNDQKQKCNLRSTWEVIQSEDFKQTTTPM	289
HCLCA4	FMQSIDSVVEFCNEKTHNQEAPSLQNIKCNFRSTWEVISNSEDFKNTIPM	288
HCLCA2	FMQSLSSVVEFCNASTHNQEAPNLQNMCSLRSAMDVITDSADFHHSFPM	291
HCLCA3	FMQNLDSVTEFCTEKTHNKEAPNL-----	262
	* * * . . * * * .	
RCLCA	RGTEAPPPPTFSLKSRQVVCLVLDKSGSMSSGDPITRLTLMNQAAELY	338
MCLCA4	TGTEAPPLPTFSLKSRQVVCLVLDKSGSMRLGSPITRLTLMNQAAELY	338
MCLCA1	RGTEAPPPPTFSLKSRRRVVCLVLDKSGSMDKED---RLIRMNQAAELY	335
MCLCA2	RGTEAPPPPTFSLKSRRRVVCLVLDKSGSMDKED---RLIRMNQAAELY	335
BCLCA1	TEMNPPTQPTFSLKSKQVVCLVLDKSGSMSSD---RLFRMNQAAELF	335
BCLCA2	TEMNPPTHPTFSLKSKQVVCLVLDKSGSMSAED---RLFQMNQAAELY	336
HCLCA1	--TTQPPNPTFSLQIGQRIVCLVLDKSGSMATGN---RLNRLNQAGQLF	333
PCLCA1	--TTQPPAPTFSLLQIGQRIVCLVLDKSGSMTVGG---RLKRLNQAGKLF	333
MCLCA3	--TAQPPAPTFSLLQIGQRIVCLVLDKSGSMLNDD---RLNRMNQASRLF	334
HCLCA4	--VTPPPPPVFSLLKIRQIVCLVLDKSGSMGGKD---RLNRMNQAAKHF	333
HCLCA2	NGTELPPPTFSLVQAGDKVVCLVLDVSSKMAEAD---RLQLQQAEEFY	338
HCLCA3	-----	262
RCLCA	LIQILEKESLVGLVTFDSIAIVQNNLIRMINDSSYLEISAKLPQEAAGGT	388
MCLCA4	LIQIEKESLVGLVTFDSTATIQTNLIRIINDSSYLAISTKLPQYPNGGT	388
MCLCA1	LTQIVEKESMVGLVTFDSAAHIQNYLIKITSSSDYQKITANLPQQASGGT	385
MCLCA2	LTQIVEKESMVGLVTFDSAAHIQNYLIKITSSSDYQKITANLPQQATGGT	385
BCLCA1	LIQIEKESLVGMVTFDSVAEIRNNTKITDDNVYENITANLPQEAANGT	385
BCLCA2	LIQVIEKESLVGMVTFDSVAEIQNHLTRITDDNVYQKITAKLPQVANGT	386
HCLCA1	LLQTVELGSWVGMVTFDSAAHVQSELIQINSGSDRDTLAKRLPAAASGGT	383
PCLCA1	LLQTVEQGAWVGMVAFDSAAVVKSELVQINSAAERDALARSLPAAASGGT	383
MCLCA3	LLQTVEQGSWVGMVTFDSAAVQSELKQLNSGADRDLLIKHLPTVSAGGT	384
HCLCA4	LLQTVENGSWVGMVHFDSTATIVNKLQIKSSDERNTLMAGLPTYPLGGT	383
HCLCA2	LMQIVEIHTFVGIASFDSKGEIRAQLHQINSNDRKLLVSYLPTTVSAKT	388
HCLCA3	-----	262

RCLCA	--SICNGLRKGFEITSSDQSTCGSEIVLLTDGEDDQISSCFEEVKHSGA	436
MCLCA4	--SICNGLKKGFEAITSSDQSTSGSEIVLLTDGEDNRISSCFQEVKHSGA	436
MCLCA1	--SICHGLQAGFQAITSSDQSTSGSEIVLLTDGEDNGIRSCFEAVSRSGA	433
MCLCA2	--SICHGLQAGFQAITSSDQSTSGSEIVLLTDGEDNGISSCFEAVSRSGA	433
BCLCA1	--SICRGLKAGFQAI IQSQSTSGSEI ILLTDGEDNEIHSCIEEVKQSGV	433
BCLCA2	--SICRGLKAGFQAI IHSQSTSGSEI ILLTDGEDNEINSCFEDVKRSGA	434
HCLCA1	--SICSGLRSAFTVIRKKYPT-DGSEIVLLTDGEDNTISGCFNEVKQSGA	430
PCLCA1	--SICSGLRSAFTVIKKKYPT-DGSEIVLLTDGEDNTISACFPEVKQNGA	430
MCLCA3	--SICSGLRSAFTVIRKKKYPT-DGSEIVLLTDGEDNTISSCFDLVKQSGA	431
HCLCA4	--SICSGIKYAFQVIGELHSQLDGSEVLLLDGEDNTASSCIDEVKQSGA	431
HCLCA2	DISICSGLKKGFVVEKLNKGAYGSMILVTSGDDKLLGNCLPTVLSGS	438
HCLCA3	-----	262
RCLCA	VIHTIALGPDAARELETLSDMTGRRFYASEGI--NGLIDAFSGISSKSG	484
MCLCA4	IIHTIALGPSAARELETLSDMTGGLRFYAKEDV--NGLIDAFSGISSKSG	484
MCLCA1	IIHTIALGPSAARELETLSDMTGGLRFYANKDL--NSLIDAFSRISSTSG	481
MCLCA2	IIHTIALGPSAARELETLSDMTGGLRFYANKHV--SSLIDAFSRISSTSG	481
BCLCA1	IIHTIALGPSAAKELETLSDMTGGRFYANKDI--NGLTNAFSRISRSRG	481
BCLCA2	IIHTIALGPSAAKELETLSNMTGGYRFFANKDI--TGLTNAFSRISRSRG	482
HCLCA1	IIHTVALGPSAAQEELELSKMTGGLQTYASDQVQNNGLIDAFGALSSGNG	480
PCLCA1	IIHTVALGPSAAKELEELSQMTGGLQTYASDQAENNGLIDAFGALSSGNR	480
MCLCA3	IIHTVALGPAAAKELEQLSKMTGGLQTYSSDQVQNNGLVDAFAALSSGNA	481
HCLCA4	IVHFIALGRAADEAVIEMSKITGGSHFYVSDEAQNNGLIDAFGALTSGNT	481
HCLCA2	TIHSIALGSSAAPNLEELSRITGGLKFFVPDISNSNSMIDAFSRISSTGTG	488
HCLCA3	-----	262
RCLCA	SLSQQALQLESKALEIKEKEWLSGTVPVDSTVGNDTFFVVTWTVQ--KPE	532
MCLCA4	SISQQALQLESKAFNVGAGAWINSTVPVDSTVGNDTFFVITWTVR--KPE	532
MCLCA1	SVSQQALQLESKAFDVRAGAWINGTVPLDSTVGNDTFFVITWTVK--KPE	529
MCLCA2	SVSQQALQLESKAFNVRAGAWINSTVPVDSTVGNDTFFVITWTVQ--KPE	529
BCLCA1	SITQTIQLESKALAI TEKKWNGTVPVDSTIGNDTFFVVTWTIK--KPE	529
BCLCA2	SITQQAIQLESKALKITGRKRVNGTVPVDSTVGNDTFFVVTWTIQ--KPE	530
HCLCA1	AVSQRSIQLESKGLTLQNSQWMNGTVIVDSTVGKDTLFLITWTTQ--PPQ	528
PCLCA1	AASQRSIQLESQGLTLQNNQWMNGTVVVDSTVGKDTLFLITLERKFLSPI	530
MCLCA3	AIAQHSIQLESRGVNLQNNQWMNGSVIVDSSVGKDTLFLITWTTT--PPT	529
HCLCA4	DLSQKSLQLESKGLTLNSNAWMNDTVIIDSTVGKDTFFLITWNS--LPPS	529
HCLCA2	DIFQQHIQLESTGENVKPHHQLKNTVTVDNTVGNDTMFLVTWQAS--GPPE	537
HCLCA3	-----	262
RCLCA	IILQDPKGKNYRTSDFQEDKLNIFSVRLQIPGIAETGTWTYSLFNKGVKP	582
MCLCA4	IILQDPKGKNYTTSDQEDKLNIFSVRLRIPGIAETGTWTYSLLNKGATS	582
MCLCA1	IILQDPKGKKYTTSDQDDKLNIR SARLQIPGTAETGTWTYSI--TGTKS	577
MCLCA2	IILQDPKGKKYITSDFQDELNIR SARLQIPGTAETGTWTYSI--TGTKS	577
BCLCA1	ILLQDPKGKKYKTSDFKEDKLNIR SARLRIPGIAETGTWTYSLLNNHASP	579
BCLCA2	IVLQDPKGKKYKTSDFKEDKLNIR SARLQIPGIAETGTWTYSLLNNHASS	580
HCLCA1	ILLWDPGSGQ--QGGFVVDK--NTKMAYLQIPGIAKVGTWKYSL--QA--SS	572
PCLCA1	PPFGVPSGRS--QDSFLVGK--HNKMAYFQVPGTAKVGMWKYSL--QA--SS	574
MCLCA3	IFIWDPGSGVE--QNGFILD T--TTKVAYLQVPGTAKVGFWKYSI--QA--SS	573
HCLCA4	ISLWDPSGTI--MENFTVDA--TSKMAYLSIPGTAKVGTWAYNL--QAKANP	575
HCLCA2	IILFDPDGRKYTYTNNFITN--LTFRTASLWIPGTAKPGHWTYTLNNTHLSL	586
HCLCA3	-----	262

RCLCA	QLLTVTVTTRARSPTTQPLMATAHMSQSAQAQYPSPMIVYARVSQGFLPVL	632
MCLCA4	QLLTVTVTTRARSPTTLPVIATAHMSQSTAQYPSRMIVYARVSQGFLPVL	632
MCLCA1	QLITMTVTTRARSPTMEPLLATAHMSQSTAQYPSRMIVYARVSQGFLPVL	627
MCLCA2	QLITMTVTTRARSPTMEPLLATAHMSQSTAQYPSRMIVYVYRVSQGFLPVL	627
BCLCA1	QILTVTVTTRARSPTTPPVATAHMSQNTAHYPSPVIVYAQVSQGFLPVL	629
BCLCA2	QMLTVTVTTRARSPTIPPVIATAHMSQHTAHYPSPMIVYAQVSQGFLPVL	630
HCLCA1	QTLTLTVTSRASNATLPPITVTSKTNKDTSKFSPPLVVYANIRQGASPIL	622
PCLCA1	QTLTLTVSSRRSSATLPPVTVTSKMNKDTGKFSPSPMVVYTKIHQGTLPIL	624
MCLCA3	QTLTLTVTSRAASATLPPITVTPVVKNTGKFSPSPVTVYASIRQGASPIL	623
HCLCA4	ETLTITVTSRAANSSVPPITVNAKMNKDVNSFSPSPMIVYAEILQGYVPVL	625
HCLCA2	QALKVTVTSRASNSAVPPATVEAFVERDSLHFPHPVMIYANVKQGFYPII	636
HCLCA3	-----	262
RCLCA	GANVTAVIESETGHQVTLELWDNGAGADTLRNDGIYSRYFTEFHNGRYS	682
MCLCA4	GANVTAVIEAESGNQVTLELWDNGAGADTLKNDGIYSRYFTDFHNGRYS	682
MCLCA1	GANVTALIEAEHGHQVTLELWDNGAGADTVKNDGIYTRYFTDYHNGRYS	677
MCLCA2	GANVTALIEAEHGHQVTLELWDNGAGADTVKNDGIYTRYFTDYHNGRYS	677
BCLCA1	GINVTALIEATEDGHQVTLELWDNGAGADTVKNDGIYSRYFTDYRGNGRYS	679
BCLCA2	GISVIALIEATEDGHQVTLELWDNGAGRDTVKNDGIYSRYFTDYNGRYS	680
HCLCA1	RASVTALIESVNGKTVTLELLDNGAGADATKDDGVYSRYFTTYDTNGRYS	672
PCLCA1	RAKVTALIESVNGKTVTLELLDNGAGADATKNDGIYSRYFTAYDANGRYS	674
MCLCA3	RASVTALIESVNGKTVTLELLDNGAGADATKNDGVYSRYFFTAFDANGRYS	673
HCLCA4	GANVTAFIESQNGHTEVLELLDNGAGADSFKNDGVYSRYFTAYTENGRYS	675
HCLCA2	NATVTATVEPETGDPVTLRLLDDGAGADVINKNDGIYSRYFFSFAANGRYS	686
HCLCA3	-----	262
RCLCA	LKVSQAQRKNITKLNKQ-KNKALYIPGYVENDQIILNPPRPEVPEEATE	731
MCLCA4	LKVNAQAQRKNMAKLNKQ-KNKSLYIPGYVENDQIVLNPPRPEIPE-ATE	730
MCLCA1	LKVRVQAQRKNKTRLSLRQ-KNKSLYIPGYVENGKIVLNPPRPDVQEEAIE	726
MCLCA2	LKVRVQAQRKNKARLSLRQ-KNKSLYIPGYVENGKIVLNPPRPDVQEEAIE	726
BCLCA1	LKVHAEARMNTARLSLRQPQNKALYIPGYIENGKIILNPPRPEVKDDLAK	729
BCLCA2	LKVHAQAARMNTARLNLRQPQNKVLYVPGYVENGKIILNPPRPEVKDDLAK	730
HCLCA1	VKVRALGGVNAARRRVIPQQSGALYIPGWIENDEIQWNPPRPEINKDDVQ	722
PCLCA1	VKVVWALGGVNTPRRRAPPLWSGAMYIRGWIENGEIKWNPPRPDINKDDLQ	724
MCLCA3	VKIWALGGVTSDRQRAAPPKNRAMYIDGWIEDGEVRMPPRPETSYP--VQ	721
HCLCA4	LKVRAHGGANTARLKLRLPLNRAAYIPGWVNGEIEANPPRPEID-EDTQ	724
HCLCA2	LKVHVMHSPSISTPAHSIPGSHAMYVPGYTANGNIQMNAPRKSVMGRNE-E	735
HCLCA3	-----	262
RCLCA	AAVEDFSRLTSGESFTVSGAPPDGGHAHVPPSKVTDLEAEFKGDH-IHL	780
MCLCA4	ATVEDFSRLTSGGSFTVSGAPPDGDHARVFPKSKVTDLEAEFIGDH-IHL	779
MCLCA1	ATVEDFNVRTSGGSFTVSGAPPDGDHARVFPKSKVTDLEAEFIGDY-IHL	775
MCLCA2	ATVEDFNVRTSGGSFTVSGAPPDGDHARVFPKSKVTDLEAEFIGDY-IQL	775
BCLCA1	AEIEDFSRLTSGGSFTVSGAPP-GNHPSVLPNKIIDLEAKFKEDH-IQL	777
BCLCA2	AKIEDFSRLTSGGSFTVSGAPPPGNHPSVFPKSKITDLEAKFKEDY-IQL	779
HCLCA1	HKQVCFSTRSSGGSFVADVPNA-PIPDFPQGQITDLKAEIHGGSLINL	771
PCLCA1	GKQVCFSTRASGGSFVADVPKS-PIPDFPCKITDLKAGIQGDNLINL	773
MCLCA3	DKQVCFSTRSSGGSFVATNVPAAAPIPDLFPPCQITDLKASIQGQNLVNL	771
HCLCA4	TTLEDFSRTASGGAFVVSQVP-SLPLPDQYPPSQITDLDATVHEDKII-L	772
HCLCA2	ERKWGFSRVSSGGSFVSLGVPA-GPHPDVFPCKIIDLEAVKVEEELT-L	783
HCLCA3	-----	262

RCLCA	TWTAPGKVLDKGRAHRYVIRMSRHPPGLQ-DFNDATLVNTSGLIPKEAGS	829
MCLCA4	TWTAPGKVLDKGRAYRYVIRMSGHSLALQEDFSNSTLVNTSSVMPKEAGS	829
MCLCA1	TWTAPGKVLDMGRAHRYIIRMSQHPLDLQEDFNNATLVNASSLIPKEAGS	825
MCLCA2	TWTAPGKVLDKGRAHRYIIRVSOHPLGLQEDFNNATLVNASSLIPKEAGS	825
BCLCA1	SWTAPANVLDK GKANSYIIRISKSFLDLQKFDNATLVNTSSLLKPKKEAGS	827
BCLCA2	SWTAPGNVLDK GKANSYIIRISKSFMDRQEDFDNATLVNTSNLIPKEAGS	829
HCLCA1	TWTAPGDDYDHGTAHKYIIRISTSILDLRDKFNESLQVNTTALIPKEANS	821
PCLCA1	TWTAPGDDYDHGRADRYIIRISTNILDRLDKFNDSVQVNTTDLIPKEANS	823
MCLCA3	TWTAPGDDYDHGRASNYIIRMSTSIVDLRDFNTSLQVNTTGLIPKEASS	821
HCLCA4	TWTAPGDNFDVGKQRYIIRISASILDLRDSFDDALQVNTTDLSPKEANS	822
HCLCA2	SWTAPGEDFDQGGQATSYEIRMSKSLQNIQDDFNNAILVNTSKRNPQQAGI	833
HCLCA3	-----	262
RCLCA	EETFKFKPASFK-----IENGTQIYIAIQAEAGLTSEVSNIAQ	869
MCLCA4	KETFKFKPETFK-----IENGTQVYIAIQADNEARLSSEVSNIAQ	869
MCLCA1	KETFKFKPETFK-----IANGIQLYIAIQADNEASLTSEVSNIAQ	865
MCLCA2	KETFKFKPETFK-----IANDTQLYIAIQAYNEAGLTSEVSNIAQ	865
BCLCA1	DENFEFKPEPFR-----IENGTNFYIAVQAINEANLTSEVSNIAQ	867
BCLCA2	KENFEFKPEHFR-----VENGTKFYISVQAINEANLISEVSHIVQ	869
HCLCA1	EEVFLFKPENIT-----FENGTDLFIAIQAVDKVDLKSEISNIAR	861
PCLCA1	EEVVFVKPEGIP-----FTNGTDLFIAVQAVDKTNLKSEISNIAQ	863
MCLCA3	EEIFEFELGGNT-----FGNGTDIFIAIQAVDKSNLKSEISNIAR	861
HCLCA4	KESFAFKPENIS-----EENATHIFIAIKSIDKSNLTSKVSNIQAQ	862
HCLCA2	REIFTFSPQISTMGPEHQPNGETHESHRIYVAIRAMDRNSLQSAVSNIAQ	883
HCLCA3	-----	262
RCLCA	AVNFIPPR-----EPSNPNLGNKMPVPCLTVLVFVA-----	900
MCLCA4	AVKFI PPQV-----YLPSTPPGLGTKVSVPSLTVFVLVA-----	904
MCLCA1	AVKLT-----LEDISALGDDISAIMTIWGLTV-----	895
MCLCA2	AVKFTS-----LEDISALGADISAIMTVWGLAV-----	895
BCLCA1	AIKFI P-----MPEDSVPALGTKISAINLAIFALAM-----	898
BCLCA2	AIKFI P-----LPEDSVHDLGTKISEITLAILGLPM-----	900
HCLCA1	VSLFI PPQTPP----ETPSPDE TSA-PCPNIHINSTIPGIHILKIMWKWI	906
PCLCA1	VSLFLPPEAPP----ETPPETPAPSLPCPEIQVNSTIPGIHILKIMWKWL	909
MCLCA3	VSVFI PAQEPP----IPEDSTP--PCPDISINSTIPGIHVLKIMWKWL	903
HCLCA4	VTLFI PQANPD----DIDPTPTPTPKSHNSGVNISTL-VLSVI-GSV	906
HCLCA2	APLFI PPNSDPVPARDYLILKGVL TAMGLIGIICLII-VVTHHTLSRKKR	932
HCLCA3	-----	262
RCLCA	----TL--FIF	905
MCLCA4	----TL--FIF	909
MCLCA1	----IFNSILN	902
MCLCA2	----IFNSILN	902
BCLCA1	----ILS--IV	903
BCLCA2	----IFS--VF	905
HCLCA1	GELQ--LSIA-	914
PCLCA1	GELQ--LSIA-	917
MCLCA1	GEMQVTLGLH-	913
HCLCA4	VIVNFI LSTTI	917
HCLCA2	ADKKENGTKLL	943
HCLCA3	-----	262

C Die Familie der CLCA-Proteine

Nachfolgende Tabelle listet die neue und ursprüngliche Bezeichnung der unterschiedlichen CLCA-Proteine auf, die Arbeitsgruppe, welche die Sequenz veröffentlicht hat, das Gewebe und die Spezies aus der sie kloniert wurden sowie die Nummern, unter denen die Sequenzen in der Datenbank zu finden sind.

Name	vorher	Kloniert von	Klonierung	Datenbank-Nr.
bCLCA1	bCaCC	S.A. Cunningham, (um D.J. Benos), 1995	mit cDNA aus Rindertrachea-Epithel	U36455
bCLCA2	LuECAM1	R.C. Elble, (um B.U. Pauli), 1997	mit cDNA aus Rinderlungen-Epithel	AF001261
mCLCA1	mCaCC	R. Gandhi (um U.Pauli), 1998	mit cDNA-Bibliothek aus Mauslungen-Epithel (Sonden gegen LuECAM1)	NM009899
mCLCA2	mCLCA2	D. Lee (um Y. Choi), 1999	aus Mauslungen-Epithel	AF108501
mCLCA3	gob-5	T. Komiya (um S. Hiroshati), 1999	mit cDNA Bibliothek aus Darmepithel d. Maus	NM017474
mCLCA4		R.C. Elble (um B.U. Pauli), 2000 unveröffentlicht	Maus	AY008277
hCLCA1	hCaCC-1	A.D. Gruber (um B.U. Pauli), 1999 M. Agnel (um J.-M. Culouscou), 1999	Menschl. genomische Phagen- cDNA-Bibliothek mit Proben gegen Lu-ECAM1	AF039400
hCLCA2	hCaCC-3	A.D. Gruber, 1999; M. Agnel, 1999	mit cDNA-Bibliothek aus menschl. Lungeneithel	NM006536
hCLCA3	hCLCA3	A.D. Gruber, 1999; M. Agnel, 1999	mit cDNA-Bibliothek aus menschl. Darmepithel	NM004921
hCLCA4	hCaCC-2	M. Agnel, 1999	Expressed Sequence Tag- Bibliothek gegen bCLCA1	NM012128
pCLCA1	-	K.J. Gaspar, 2000	Ileum-Enterocyten des Schweins	AF095584
rCLCA1		J. Bradley, n.veröff.	cDNA des olfaktorischen Epithels der Ratte	-

D Verwendete Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer werden nach Nummern sortiert in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Primer-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
2830	AATCAAGGAGTCCGCTGAC	Nachweis rCLCA1, 5'-Primer
2831	AGTTCTCGGGCAGCGTCA	Nachweis rCLCA1, 3'-Primer
3090	ATGGCTGATCAGCTGACTGAAG	Nachweis Calmodulin, 5'-Primer
3091	TCATTTTGCAGTCATCATCATCT GTAC	Nachweis Calmodulin, 3'-Primer
3259	CATCGCCACATCCTTCACC	Nachweis, KCC1 5'-Primer
3260	TGGTACTCGATGTACTTGTAG	Nachweis, KCC1 3'-Primer
3261	TCTTAGCCATTTTGATTACTAC	Nachweis, NKCC1 5'-Primer
3262	GTAAGTAACATAAATGTACAGC	Nachweis, NKCC1 3'-Primer
3281	TGATCACAGCCGGCATCTTT	Nachweis, TSC 5'-Primer
3283	TATGTCTTCAGTGATATGACCT	Nachweis, KCC2 5'-Primer
3308	ATATGAGGCCAGGAAGAAGTT	Nachweis, NKCC2 3'-Primer
3309	ACTTCTTCATTGGAAGTGCAT	Nachweis, NKCC2 5'-Primer
3310	AGAGGCTCATGCCCAGGAA	Nachweis, KCC2 3'-Primer
3311	TGGCGATGAGCCGGAGCT	Nachweis, TSC 3'-Primer
3327	GCTCTGCAGTTGCAGAGCAAAG	Herstellung des trunkierten rCLCA1-Klons; 5'-Primer f. N-Terminus
3329	CTGTCTAGATTATCTTGAGTAGA TGCCATCATTTTC	Herstellung des trunkierten rCLCA1-Klons; 3'-Primer f. N-Terminus
3330	AGAGGATCCACCATGTATTTAC GGAGTTTCATGGAAAC	Herstellung des trunkierten rCLCA1-Klons; 5'-Primer f. C-Terminus
3331	AAAATATGAATAAGGTTGCAACA AATAC	Herstellung des trunkierten rCLCA1-Klons; 3'-Primer f. C-Terminus
9001	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Sequenzierung von pBlueskript SK ⁻ -Konstrukten
9002	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung von pBlueskript SK ⁻ - und pCDNA 3.1-Konstrukten
9067	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierung von pCDNA 3.1-Konstrukten (reverser Primer)

Danke

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1), Forschungszentrum Jülich angefertigt. Mein Dank gilt allen Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit im Laufe der letzten Jahre. Mein Dank gilt insbesondere:

- Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des bearbeiteten Themas.
- Ganz besonderes Prof. Dr. S. Frings für sein Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft und das große Interesse an meiner Arbeit hat sehr zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.
- Herrn Dr. A. Baumann für die Aufnahme in sein Labor, die Hilfestellung in molekularbiologischen Fragen, sein reges Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.
- Herrn Dr. A. Scholten für Hilfe bei biochemischen Fragen, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die Zeit, die er sich zur kritischen Begutachtung der vorliegenden Arbeit genommen hat.
- Herrn Dr. J. Bradley für die Bereitstellung des rCLCA1-Klons.
- Frau Dr. A. Köngeter, Herrn Dr. W. Bönigk und Frau A. Brühl für die Bereitstellung unterschiedlicher cDNAs.
- Herrn Dr. W. Bönigk für die Beratung bei molekularbiologischen Fragen.
- Herrn Dr. F. Müller für die Beratung bei immunzytochemischen Fragen und der Hilfestellung am konfokalen Mikroskop.
- Herrn Dr. T. Gensch für die Hilfestellung bei Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen und das Interesse für “gut-aussehende“ Spinalganglien-Zellen.
- Frau M. Bruns für die ausführliche Beratung und die Hilfe bei Zellkulturfragen.

- A. Brühl, D. Harzheim, S. Balfanz, S. Wachten und A. Baumann für eine lustige aber auch sehr konstruktive Arbeitsatmosphäre im Labor.
- D. Harzheim und T. Strünker für eine hervorragende Atmosphäre im Büro, für ihre Diskussionsfreudigkeit und für diverse Packungen Kekse.
- Frau A. Eckert und Herrn R. Esser für zahlreiche kleinere und größere Hilfe bei organisatorischen Problemen jeglicher Art.
- Ganz besonders T. Wagner, der mir nicht nur beim Editieren dieser Arbeit geholfen hat sondern auch sehr viel Zeit, Geduld und Verständnis für mich und meine Arbeit aufgebracht hat.

Nicht zuletzt möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, die mich auch in einer für uns alle traurigen Zeit sehr unterstützt hat und großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat.

Lebenslauf

Ilva Putzier

Mauerstraße 9

52064 Aachen

Tel: 0241 / 4018680

Persönliche Angaben:

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 02.05.1976
- Geburtsort: Leverkusen

Ausbildung:

- 1982 - 1986 Städt. Gemeinschaftsgrundschule Büscherhof, Leichlingen
- 1986 - 1995 Städt. Gymnasium Leichlingen, Abschluß: Abitur
- 1995 - 2000 Diplomstudium Biologie an der Universität zu Köln
- 31.08.1999 - 31.08.2000 Diplomarbeit am Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1, Forschungszentrum Jülich, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp. Thema: Methoden zur Untersuchung Kalzium-aktivierter Chloridkanäle in somatosensorischen Neuronen der Ratte.
- ab dem 1.09.2000 tätig als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1, Forschungszentrum Jülich, unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp
- Angestrebter Abschluß: Promotion im Fachgebiet Biochemie über das Thema: Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle und Cl^- -Akkumulation in Sinneszellen der Ratte.

Köln, den

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.B. Kaupp betreut worden.

Bereits veröffentlichte Teilpublikation:

Kaneko, H.; Putzier, I.; Frings, S. & Gensch, T. (2002). Determination of Intracellular Chloride Concentration in Dorsal Root Ganglion Neurons by Fluorescence Lifetime Imaging. *Current Topics in Membranes*; 52, 167-189

Teilpublikation in Vorbereitung:

Kaneko, H.; Putzier, I.; Frings, S.; Kaupp, U.B.; Gensch, T. Intracellular chloride accumulation in rat olfactory receptor neurons.

Köln, den