

# Untersuchung zur Ionenleitfähigkeit eines pflanzlichen Proteins mit Homologie zu den tierischen "Chloride Intracellular Channels" (CLICs)

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor rerum naturalium*  
genehmigte Dissertation

von  
**Astrid Beate Elter**  
aus Aschaffenburg

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Lüttge

Tag der Einreichung: 24. August 2005  
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2005

Darmstadt 2005

Holzhacken ist deshalb so beliebt,  
weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

*Albert Einstein*

***Inhaltsverzeichnis:***

|  |          |
|--|----------|
| Inhaltsverzeichnis   | I        |
| Abbildungsverzeichnis  | IV       |
| Tabellenverzeichnis  | VI       |
| Abkürzungsverzeichnis  | VII      |
| <br>   |          |
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b> |
| 1.1 Anionenkanäle  | 1        |
| 1.2 Chloride Intracellular Channels                            | 2        |
| 1.3 Glutathion S-Transferasen                                  | 5        |
| 1.4 Dehydroascorbat-Reduktasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 7        |
| 1.5 Zielsetzung  | 8        |
| <br>   |          |
| <b>2. Material und Methoden</b>                                | <b>9</b> |
| 2.1 Chemikalien  | 9        |
| 2.2 Sterilität   | 9        |
| 2.3 Molekularbiologische Methoden                              | 9        |
| 2.3.1 <i>Enzyme</i>  | 9        |
| 2.3.2 <i>Größenstandarts</i>                                   | 9        |
| 2.3.3 <i>Reaktionssysteme (Kits)</i>                           | 10       |
| 2.3.4 <i>Oligonukleotide (Primer)</i>                          | 10       |
| 2.3.5 <i>Plasmide</i>  | 11       |
| 2.3.6 <i>Heterologe Expressionssysteme</i>                     | 13       |
| 2.3.7 <i>RNA-Präparation</i>                                   | 14       |
| 2.3.8 <i>Reverse Transkription (RT-PCR)</i>                    | 14       |
| 2.3.9 <i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>                   | 15       |
| 2.3.10 <i>Ligation</i>   | 15       |
| 2.3.11 <i>Escherichia coli Kultivierung</i>                    | 16       |
| 2.3.12 <i>Transformation</i>                                   | 16       |
| 2.3.12.1 <i>Hitzeschock-Methode</i>                            |          |
| 2.3.12.2 <i>Elektrotransformations-Methode</i>                 |          |
| 2.3.13 <i>Plasmidpräparation</i>                               | 17       |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.14    | <i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>                                     | 17        |
| 2.3.15    | <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>   | 18        |
| 2.3.16    | <i>DNA-Sequenzierung</i>   | 18        |
| 2.4       | Proteinbiochemische Methoden   | 19        |
| 2.4.1     | <i>Antikörper</i>  | 19        |
| 2.4.2     | <i>Proteinisolation aus HEK293 Zellen</i>                                    | 19        |
| 2.4.3     | <i>Proteinisolation aus Escherichia coli</i>                                 | 19        |
| 2.4.3.1   | <i>Denaturierende Bedingungen</i>  |           |
| 2.4.3.2   | <i>Native Bedingungen</i>  |           |
| 2.4.4     | <i>TCA-Fällung</i>   | 21        |
| 2.4.5     | <i>Proteinbestimmung</i>   | 21        |
| 2.4.6     | <i>SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)</i>                        | 21        |
| 2.4.7     | <i>Western-Blot Analyse</i>  | 21        |
| 2.4.8     | <i>Immunofärbung</i>   | 22        |
| 2.5       | Zellkulturführung  | 22        |
| 2.5.1     | <i>Kultivierung der HEK- und CHO-Zellen</i>                                  | 22        |
| 2.5.2     | <i>Expression von AtCLIC in HEK293- und CHO-K1- Zellen</i>                   | 23        |
| 2.6       | Elektrophysiologie   | 23        |
| 2.6.1     | <i>Aufbau</i>  | 23        |
| 2.6.2     | <i>Elektrophysiologie an HEK293- und CHO-K1-Zellen</i>                       | 24        |
| 2.7       | Confokalmikroskopie  | 27        |
| 2.6.1     | <i>Fluorophore</i>   | 27        |
| 2.6.2     | <i>Aufnahmen</i>   | 28        |
| 2.8       | Software und Internetprogramme   | 28        |
| <br>      |  |           |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>29</b> |
| 3.1       | Sequenzvergleiche  | 29        |
| 3.1.1     | <i>Vergleich der Aminosäuresequenz von AtCLIC mit CLIC1 aus Homo sapiens</i> | 29        |
| 3.1.2     | <i>Phylogenetischer Baum</i>   | 30        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung von AtCLIC        | 32        |
| 3.2.1 Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC                        | 32        |
| 3.2.1.1 Cell-attached-Messungen mit 140 mM TEA-Chlorid        |           |
| 3.2.1.2 Inhibierung mit IAA-94                                |           |
| 3.2.1.3 Cell-attached-Messungen mit 14 mM TEA-Chlorid         |           |
| 3.2.1.4 Cell-attached-Messungen mit 140 mM TEA-Acetat         |           |
| 3.2.1.5 Whole-cell-Messungen mit 140 mM TEA-Chlorid           |           |
| 3.2.2 Cell-attached-Messungen an HEK293 pIRES-EGPF-AtCLIC     | 41        |
| 3.2.3 Cell-attached-Messungen an CHO-K1 pEGFP-AtCLIC          | 42        |
| 3.3 Proteinbiochemische Detektion von AtCLIC in HEK293-Zellen | 44        |
| 3.4 Zelluläre Lokalisation von AtCLIC in HEK293-Zellen        | 45        |
| 3.4.1 Lokalisation mit GFP                                    | 45        |
| 3.4.1 Colokalisation von GFP- und Fm4-64                      | 46        |
| 3.5 Aufreinigung von AtCLIC aus <i>Escherichia coli</i>       | 47        |
| <br>  |           |
| <b>4. Diskussion</b>  | <b>50</b> |
| <br>  |           |
| <b>5. Zusammenfassung</b>                                     | <b>56</b> |
| <br>  |           |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>                                | <b>57</b> |
| <br>  |           |
| <b>Anhang:</b>  |           |
| Eidesstattliche Erklärung                                     | A1        |
| Danksagung  | A2        |
| Curriculum vitae  | A3        |

**Abbildungsverzeichnis:**

**Abbildung 1:** Dreidimensionale Struktur von CLIC1.

**Abbildung 2:** Dreidimensionale Struktur eines humanen GSTs: Monomer der Glutathion S-Transferase P1-1 aus *Homo sapiens*.

**Abbildung 3:** Plasmid pEGFP-N2.

**Abbildung 4:** Plasmid pIRES-EGFP.

**Abbildung 5:** Plasmid pQE-31.

**Abbildung 6:** Verlaufsschema der Proteinaufreinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen.

**Abbildung 7:** Darstellung der Ablesestellen für stationäre und instantane Ströme und der Stromkomponenten einer einzelnen Spur.

**Abbildung 8:** Struktur von R(+)-methylindazone indanyloxy acetic acid 94 (IAA-94).

**Abbildung 9:** Sequenzvergleich der Proteine AtCLIC aus *Arabidopsis thaliana* und CLIC1 aus *Homo sapiens*.

**Abbildung 10:** Phylogenetischer Baum der DHARs und anderer Mitglieder der GST-Familie aus *Arabidopsis thaliana* und der CLIC-Familie aus *Homo sapiens*.

**Abbildung 11:** *Cell-attached*-Messungen an einer repräsentativen HEK293 pEGFP-AtCLIC Zelle und einer Kontrollzelle mit 140mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

**Abbildung 12:** *Cell-attached*-Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC Zellen unter Zugabe des Blockers IAA-94.

**Abbildung 13:** *Cell-attached*-Messungen an HEK293 pEGFP Zellen mit 14 mM bzw. 140 mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung .

**Abbildung 14:** *Cell-attached*-Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC Zellen mit unterschiedlichen Anionen (Acetat und Chlorid) in der Pipettenlösung.

**Abbildung 15:** *Whole-cell* Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC Zellen mit 14 mM bzw. 140 mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

**Abbildung 16:** *Cell-attached* Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC und HEK293 pIRES-AtCLIC Zellen mit 140mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

**Abbildung 17:** *Cell-attached* Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC und CHO-K1 pEGFP-AtCLIC mit 140mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

**Abbildung 18:** Western-Blot der cytosolischen Fraktion und der Membranfraktion aus HEK293 Zellen, die mit den Konstrukten pEGFP und pEGFP-AtCLIC transfiziert wurden.

**Abbildung 19:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HEK293 Zellen, die cytosolisches GFP oder das Fusionsprotein AtCLIC::GFP exprimieren.

**Abbildung 20:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer HEK293 pEGFP-AtCLIC Zelle, die mit dem Sterylfarbstoff FM4-64 comarkiert wurde und deren Intensitätsplots.

**Abbildung 21:** Western-Blot mit Proteinisolation aus AtCLIC transformierten *E. Coli*-Bakterien.

***Tabellenverzeichnis:***

**Tabelle 1:** Oligonukleotide

**Tabelle 2:** Prozentuale Identitäten von AtCLIC und Proteinen aus den Familien der GSTs aus *Arabidopsis thaliana* und der Familie der CLICs aus *Homo sapiens*

**Tabelle 3:** Berechnete Umkehrpotentiale der relevanten Ionen für die benutzten Messlösungen

**Abkürzungsverzeichnis:**

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

|               |  |
|---------------|--|
| Abb.          | Abbildung  |
| ATP           | Adenosin-5'-triphosphat  |
| Bp            | Basenpaar(e)   |
| CHO-Zellen    | <i>Chinese hamster ovary cells</i>                                     |
| CLIC          | Chloride Intracellular Channel   |
| CLSM          | Konfokale Laser Scanning Mikroskopie                                   |
| DHAR          | Dehydroascorbat Reduktase  |
| DNA           | Desoxyribonucleinsäure   |
| dNTP          | Desoxyribonukleotide   |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGFP          | <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>                              |
| EGTA          | Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| GFP           | Grün fluoreszierendes Protein (aus <i>Aequoria victoria</i> )          |
| GST           | Gluthathion S-Transferase  |
| HEK293        | <i>human embryonic kidney cells</i> (Zelllinie 293)                    |
| HEPES         | N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)                    |
| I             | Strom  |
| $I_{st}$      | stationärer Strom  |
| $I_{instant}$ | instantaner Strom  |
| kDa           | Kilodalton   |
| LB            | Luria Bertani-Medium   |
| MCS           | Multiple cloning site  |
| n             | Anzahl der Versuchswiederholungen                                      |
| OD            | Optische Dichte  |
| ORF           | <i>open reading frame</i>  |
| pA            | Picoamper  |
| PAGE          | Polyacrylamidgel-Elektrophorese  |
| PBS           | <i>Phosphate Buffered Saline</i>                                       |
| PCR           | Polymerasekettenreaktion   |
| Pfu           | Enzym aus <i>Pyrococcus furiosus</i>                                   |
| rel.          | relativ  |
| RNA           | Ribonucleinsäure   |

---

|      |   |
|------|---|
| SD   | Standardabweichung                      |
| SDS  | Natriumdodecylsulfat                    |
| Tab. | Tabelle                                 |
| Taq  | Enzym aus <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TBS  | Tris gepufferte Saline                  |
| TM   | Transmembran (-region)                  |
| U    | Unit                                    |
| mV   | Millivolt                               |
| V    | Spannung                                |

Für Aminosäuren wurde der Ein- und Dreibuchstabencode verwendet:

|   |     |                        |
|---|-----|------------------------|
| A | Ala | Alanin                 |
| C | Cys | Cystein                |
| D | Asp | Asparaginsäure         |
| E | Glu | Glutaminsäure          |
| F | Phe | Phenylalanin           |
| G | Gly | Glycin                 |
| H | His | Histidin               |
| I | Ile | Isoleucin              |
| K | Lys | Lysin                  |
| L | Leu | Leucin                 |
| M | Met | Methionin              |
| N | Asn | Asparagin              |
| P | Pro | Prolin                 |
| Q | Gln | Glutamin               |
| S | Ser | Serin                  |
| T | Thr | Threonin               |
| V | Val | Valin                  |
| W | Trp | Tryptophan             |
| Y | Tyr | Tyrosin                |
| X |     | unbestimmte Aminosäure |

## ***1. Einleitung***

### ***1.1 Anionenkanäle***

Anionenkanäle sind Transportproteine, durch die Anionen über Plasma- und Endomembranen geleitet werden. Sie kommen in vielen prokaryontischen und allen eukaryontischen Zellen vor (Ashley 2003) und sind wichtig für viele physiologische Prozesse. Anionenkanäle sind permeabel für zahlreiche Anionen wie Chlorid, Iodid, Bromid, aber auch Nitrat, Phosphat und sogar negativ geladene Aminosäuren (Nilius et al. 2003).

Pflanzliche Anionenkanäle können durch zahlreiche Faktoren, wie Nukleotide, Phosphorylierung/Dephosphorylierung, freies  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytosol, Hormone, photosynthetische Metabolite, Spannung und pH reguliert werden (Hechenberger et al. 1996; Wendehenne et al. 2002). In der Plasmamembran spielen sie unter anderem eine Rolle in der frühen Signaltransduktion. Verschiede Stimuli aktivieren membranständige Anionenkanäle durch die, aufgrund des vorhandenen Anionengradienten, ein passiver Efflux von Ionen in den extrazellulären Raum stattfindet. Außerdem haben Anionenkanäle eine wichtige Funktion in der Entstehung von pflanzlichen Aktionspotentialen, wo die Depolarisationsphase durch den Influx von Chloridionen ausgelöst wird, während die Repolarisation vom Ausfluss von Kaliumionen abhängig ist (Thiel 1995).

Die Eigenschaften pflanzlicher Anionenkanäle wurden in den letzten Jahren vor allem elektrophysiologisch untersucht (Barbier-Brygoo et al. 2002). Molekular und strukturell wurde jedoch bislang keiner charakterisiert.

Chlorid ist eines der Hauptanionen in physiologischen Prozessen und muss oft über Membranen geleitet werden (Ashley 2003). Dies geschieht mit Hilfe von Chlorid-selektiven Anionenkanälen.

Die tierischen Chloridkanäle teilen sich in vier Hauptklassen, die Liganden-aktivierten Kanäle wie GABA und Glycinrezeptoren, die CFTRs (Cystic Fibrosis conducted Regulators), die CLCs (Chlorid Channels) und die CLICs (Chlorid Intrazellular Channels) (zusammengefasst in Cromer et al. 2002, Ashley 2003). Allgemein sind tierische Chloridkanäle an der Kontrolle der Absorption und Sekretion von Salzen, der Regulation des Membranpotentials, der Ansäuerung von Organellen, der Zellzyklusregulation, der Apoptose und der Homeostase des Zellvolumens beteiligt (Harrop 2001, Debska et al. 2001, Nilius et al. 2003).

In Pflanzen spielen Chlorid und Chloridkanäle eine wichtige Rolle in osmotischen Prozessen, wie beispielsweise der Regulation des Turgors. Sie haben ebenso eine wichtige Funktion im Bewegungsprozess der Stomata, da durch Chloridionen die Ladung der sich ändernden

Kaliumkonzentration ausgeglichen wird (Hechenberger et al. 1996). Diese Ausgleichsfunktion für positive Ladungen erfüllt Chlorid auch in vielen weiteren physiologischen Prozessen. Außerdem ist Chlorid in der Photosynthese, speziell im Hydrolyseapparat, sowie in der Nitrataufnahme involviert.

Im Genom einiger Pflanzen, z.B. *Nicotiana tabacum* L. und *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., wurden Gene gefunden, die den Genen für tierische Anionenkanäle der CLC-Familie ähneln (Lurin et al. 1996; Hechenberger et al. 1996). Ihre Funktionalität wurde bisher jedoch noch nicht nachgewiesen. In dieser Arbeit wird ein Protein untersucht, das die Funktion eines pflanzlichen Chloridkanals haben könnte und große Ähnlichkeit mit den tierischen CLICs aufweist.

### **1.2 Chloride Intracellular Channels**

Die Familie der **Chloride Intracellular Channels (CLICs)** weist, besonders hinsichtlich der Faltung der gelösten Form, viele Ähnlichkeiten mit der Glutathion S-Transferase (GST)-Superfamilie auf. Man geht davon aus, dass sich beide Familien aus Vertretern der Thiothionin-Superfamilie entwickelt haben (Cromer et al. 2002). CLICs ähneln am meisten Vertretern der Beta und Omega Klasse der GST-Familie (Cromer et al. 2002).

Die Proteinfamilie der CLICs wurde erst vor kurzer Zeit entdeckt. Sie kommen sowohl in den intrazellulären Membranen verschiedenster Gewebe von Vertebraten (Cromer et al. 2002; Ashley 2003), als auch bei Invertebraten (Berry et al. 2003) vor. CLIC Proteine sind für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie Zellteilung (Valenzuela et al. 2000), Nierenfunktion (Landry et al. 1989), Regulation der Sekretion und Apoptose (Ashley 2003) verantwortlich. Das ungewöhnliche an der Familie der CLICs gegenüber anderen Ionenkanälen ist, dass die Proteine sowohl gelöst im Cytoplasma als auch membranständig vorkommen (Ashley 2003; Cromer et al. 2002; Harrop et al. 2001). CLIC-Proteine scheinen direkt zu ihrem subzellulären Bestimmungsort zu kommen, ohne den sekretorischen Signalweg der anderen Proteine zu nutzen. Diese Tatsache wiederum macht es erforderlich, dass sie neue Wege in der Kontrolle ihres Einbaus in die Membran und der Kanalformation gehen (Ashley 2003).

Der erste beschriebene Vertreter der CLIC-Familie stammte aus *Homo sapiens* L. und wurde CLIC1 (NCC27) genannt. Inzwischen wurden noch sechs weitere Vertreter, CLIC 2-6, und p64 gefunden (zusammengefasst in Harrop et al. 2001; Cromer et al. 2002). Diese organellären Anionenkanäle weisen untereinander eine Ähnlichkeit von 60-75 % auf, ihre Verteilung in der Zelle ist aber sehr unterschiedlich (Warton 2002). Sie bestehen aus einem

konservierten CLIC-Modul mit 240 Aminosäuren und unterschiedlich langen, nicht verwandten N-Termini (Littler et al. 2003).

Im Folgenden wird besonders auf einen Vertreter dieser Familie, den menschlichen Chloridkanal CLIC1, eingegangen. CLIC1 ist mit 241 Aminosäuren recht klein und besitzt nur eine Transmembrandomäne. Das Protein ist weitgehend löslich, kommt aber, wie alle CLICs auch in einer membrangebundenen Form vor. Als seine nächsten Verwandten gelten die pflanzlichen GSH-abhängigen Dehydroascorbat-Reduktasen (Harrop et al. 2001).

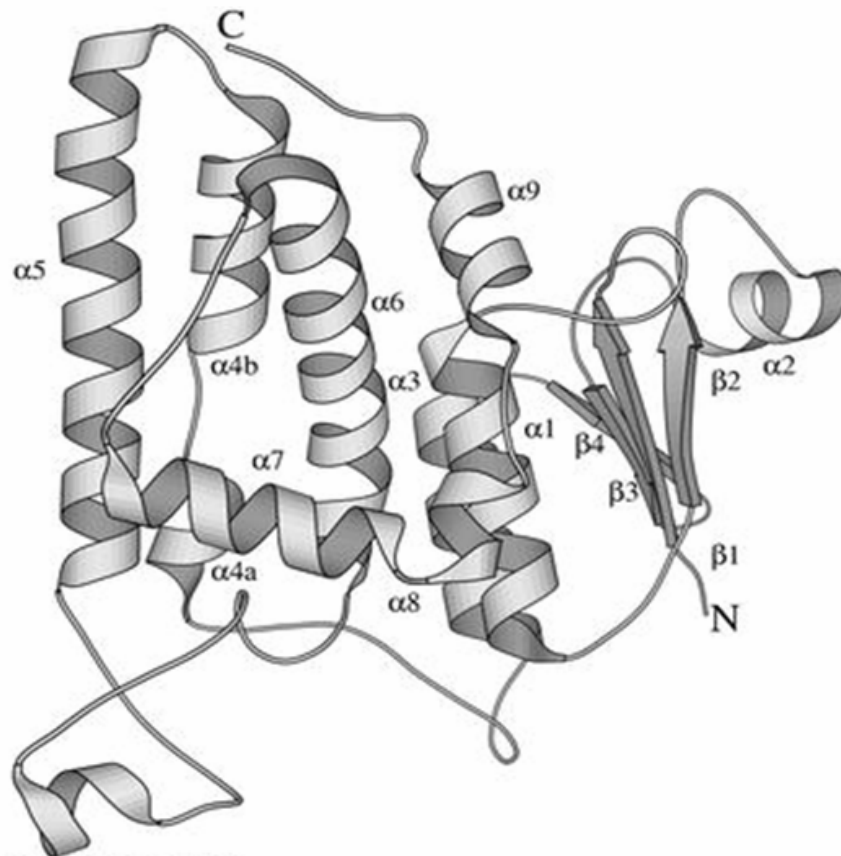
Die Struktur der löslichen Form, die erst kürzlich durch Kristallisation mit einer Auflösung von 1,4 Å gezeigt wurde (Harrop et al. 2001), hat keine Ähnlichkeit mit konventionellen Ionenkanälen. Das Protein existiert als Monomer mit strukturellen Homologien zur GST-Superfamilie und besitzt eine redoxaktive Domäne, ähnlich der von Glutharedoxin (Harrop et al. 2001; Warton et al. 2002). CLIC1 besteht, wie in Abbildung 1 gezeigt, aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne setzt sich aus vier  $\beta$  Faltblättern ( $\beta$ 1-4) und drei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ 1-3) zusammen und beinhaltet eine Thio-redoxinfaltung. Die C-Domäne besteht nur aus  $\alpha$ -Helices und besitzt einen sehr negativen Loop (Pro-147 bis Gln-164, zwischen  $\alpha$ 5 und  $\alpha$ 6), der räumlich etwas vom Kern des Proteins absteht (Harrop et al. 2001).

Die Aufnahme eines CLIC1-Glutathion-Komplexes zeigte, dass das Glutathion an die redoxaktive Stelle des Proteins bindet (Cys-24,  $\alpha$ 1), die neben einer offenen, verlängerten Tasche liegt, welche mit basischen Aminosäure-Resten ausgekleidet ist (Harrop et al. 2001).

Grundsätzlich liegt der grössere Teil der CLIC1-Proteine einer Zelle in gelöster Form vor.

Bei Lokalisationsstudien an CHO-Zellen mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz und Immunoblotting eines CLIC-GST-Fusionsproteins wurde das Protein hauptsächlich im Nukleoplasma, an der nuklearen Membran und im Cytoplasma gefunden. Kleinere Mengen des Proteins wurden in cytoplasmatischen Organellen wie den Lysosomen, Endosomen und sekretorischen Vesikeln lokalisiert (Valenzuela et al. 1997). Auch die Lokalisation eines markierten Proteins zeigte die Anwesenheit von CLIC1 im Nukleoplasma und der nuklearen Membran, sowie im Cytosol und in der Plasmamembran (Ashley 2003).

Bei CLIC1-transfizierten Zellen kann sowohl in der Plasmamembran als auch an der nuklearen Membran eine Leitfähigkeit gemessen werden, und der Kanal zeigt in beiden Membranen die gleichen Charakteristiken (Tonini et al. 2000; Valenzuela et al. 2001).



**Abb. 1:** Dreidimensionale Struktur von CLIC1 aus Cromer et al. 2002 (nach Harrop et al. 2001).

Die Struktur und Stöchiometrie der membranständigen Form von CLIC1 ist noch nicht vollständig geklärt. Die Integration und die damit verbundene Konformationsänderung erfolgen auf einen Stimulus hin und erfordern ein Rearrangement grosser Teile des Proteins. In dieser Hinsicht ähnelt ihr Verhalten dem von bakteriellen Toxinen, die sich auch während der Membraninsertion einer Reihe von Änderungen in ihrer Löslichkeit und Struktur unterziehen (Gouaux, 1997). Durch Oxidation geht das gelöste CLIC-Protein von einem monomeren Status über zu einem nicht kovalent gebundenen Dimer, das über eine intermolekulare Disulfidbindung zwischen Cys24 und Cys59 stabilisiert wird (Littler et al. 2003). Dies geht mit einer Konformationsänderung einher, bei der die GSH-Bindestelle zerstört wird, die  $\beta$ -Faltblattstrukturen verschwinden und die ehemaligen  $\beta$ -Faltblätter  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 einen Loop bilden, der einen mit Wasser gefüllten Tunnel auskleidet. Während der Dimerbildung wird zwischen den Monomeren eine hydrophobe Oberfläche freigelegt. Das oxidierte Dimer kann funktionale Kanäle in der Membran bilden, während eine reduzierende Umgebung die Kanalbildung unterbindet (Littler et al. 2003). Der Einbau des Proteins in die Membran führt zu einer erhöhten Anionenleitfähigkeit (Tulk et al. 2002; Littler et al. 2004). Bei der Insertion wandert der N-Terminus durch die Membran, der C-Terminus bleibt im

Cytosol (Duncan et al. 1997; Tonini et al. 2000). Die Membranintegration ist pH abhängig; bei niedrigem pH werden mehr Proteine eingebaut (Warton et al. 2002; Tulk et al. 2002). Es wurden auch Versuche mit gereinigtem CLIC1-Proteinen gemacht, die zeigten, dass das Protein in synthetischen Membranen einen Chloridkanal bildet, der die gleichen Eigenschaften hat wie der Kanal *in vivo* (Harrop et al. 2001). Dies bedeutet, dass dieses Protein alleine den Kanal bildet und weder weitere Proteine als Komponenten benötigt, noch einen anderen Kanal aktiviert.

In welcher Form und Struktur der aktive Kanal in der Membran vorliegt, ist bisher noch nicht geklärt. Leitfähige Kanäle entstehen sowohl bei Zugabe von Monomeren als auch von Dimeren zu Lipidbilayern (Littler et al 2003.) Ob diese wirklich in beiden Formen Chloridionen leiten können oder sich die Monomere in der Membran zu Dimeren oder sogar Tetrameren (Warton et al. 2002) verbinden, bleibt zu untersuchen.

### ***1.3 Glutathion S-Transferasen***

Glutathion S-Transferasen (GSTs) sind lösliche Enzyme, die die Konjugation von Glutathion mit unterschiedlichen elektrophilen und hydrophoben Partnern katalysieren. Diese Reaktion wird in Tieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien zur Detoxifikation von endogenen und exogenen Giften genutzt (Sheehan et al. 2001) und gehört zu den Antworten der Zelle auf oxidativen Stress. Die Mitglieder der GST-Superfamilie katalysieren vorrangig eine nucleophile Substitution oder Addition von Glutathion an giftige Substanzen, wodurch ein wenig reaktives, hydrophiles Glutathion-S-Konjugat gebildet wird.

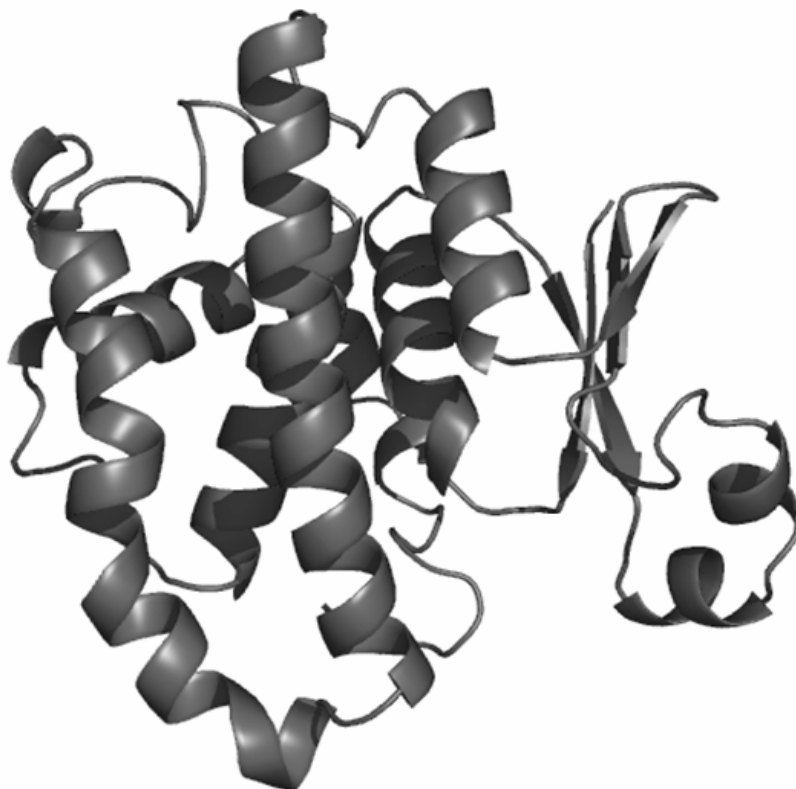
Neben der genannten Entgiftungsfunktion werden den Mitgliedern der GST- Superfamilie noch einige andere Funktionen zugeschrieben. Sie können auch als Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR), Peroxidasen, Isomerasen, Carrierproteine (z.B. Ligandin), Thiol-Transferasen, sowie als Regulatoren, Inhibitoren und Modulatoren fungieren (zusammengefasst in Cromer et al. 2002). Neuere Studien haben auch eine Funktion als Komponente des ultraviolett-induzierten Signalwegs und als Regulator der Apoptose gezeigt (Dixon et al. 2002a).

Die Glutathion S-Transferasen bilden eine Superfamilie evolutionär verwandter Enzyme. Neben dem elektrophilen Zentrum haben sie auch ihre Hydrophobie gemein. Die Superfamilie wurde aufgrund von Sequenzhomologien in 12 Klassen eingeteilt, die Alpha, Beta, Mu, Phi, Theta, Kappa, Sigma, Tau, Omega und Zeta Klasse (zusammengefasst in

Sheehan et al. 2001) sowie die DHARs und Lambda GSTs (Dixon et al 2002). Die Klassen sind untereinander sehr heterogen, mit einer Ähnlichkeit von 10 – 30 %. Die Phi, Tau und Lambda Klassen der GSTs sind pflanzenspezifisch (Dixon et al. 2002a).

Jedes GST-Monomer besteht aus zwei Domänen (siehe Abb. 2). N-terminal liegt die konservierte, hydrophile, hoch spezifische Glutathion-Bindestelle (G-Seite). Sie besteht aus vier  $\beta$ -Faltblättern, die von drei  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Die hydrophobe, weniger spezifische Bindestelle für elektrophile Substrate (H-Seite) liegt C-terminal und besteht nur aus  $\alpha$ -Helices. Die meisten strukturellen Unterschiede der GSTs betreffen die H-Seite (Neuefeind et al. 1997; Cromer et al. 2002). Der grösste Teil der GSTs liegt als Homodimer von ca. 50kDa vor, es sind aber auch einige wenige Heterodimere und zwei monomere GSTs bekannt. Anhand der Struktur gibt es viele Anzeichen dafür, dass die GST-Superfamilie aus der Thioredoxin-Superfamilie entstanden ist (Cromer et al. 2002).

Lokalisiert sind GSTs hauptsächlich im Cytosol, sie kommen aber auch in zellulären Strukturen wie dem endoplasmatischen Retikulum vor (Dixon et al. 2002a). Einige pflanzliche GSTs besitzen auch Zielsequenzen für den Chloroplasten (Dixon et al. 2002b).



**Abb. 2:** Dreidimensionale Struktur eines humanen GSTs:  
Monomer der Glutathion S-Transferase P1-1 aus *Homo sapiens* (aus “The RCSB Protein Database“).

In *A. thaliana* wurden über 40 Gene gefunden, die für Mitglieder der GST-Superfamilie kodieren. Darunter sind die Lambda-GSTs und die DHARs, die sich von allen anderen pflanzlichen GST's unterscheiden, da sie im aktiven Zentrum ein Cystein statt eines Serins tragen (Dixon et al. 2002b).

#### ***1.4 Dehydroascorbat-Reduktasen aus Arabidopsis thaliana***

Im Genom von *A. thaliana* gibt es vier Proteine, die eine große Ähnlichkeit mit den Dehydroascorbat-Reduktasen (DHAR) aus anderen Pflanzen besitzen. DHARs gehören zur Familie der GSTs. Genau wie die pflanzlichen Lambda GSTs und die tierischen CLICs tragen sie ein Cystein statt eines Serins im aktiven Zentrum, was sie von den restlichen GSTs unterscheidet (Dixon et al. 2002b). Unter ihnen ist auch das Protein AtDHAR1, das in der vorliegenden Arbeit AtCLIC genannt wird. Über dieses Protein ist noch nicht sehr viel bekannt. In den Datenbanken wird AtCLIC (AAF98403) als "putative GSH-abhängige Dehydroascorbat Reduktase (DHAR)" geführt. Das untersuchte Protein besteht aus 213 Aminosäuren und hat eine berechnete Molmasse von ca. 24 kDa. Die Aktivität als DHAR wurde von Dixon et al. (2002b) nachgewiesen. Durch diese Funktion scheint das Protein eine wichtige Rolle im Ascorbatstoffwechsel und somit in der Redox-Homeostase der Zelle einzunehmen. Auch die zelluläre Lokalisation der vier Genprodukte aus *A. thaliana* wurde von Dixon et al. (2002b) untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass drei der vier DHARs, darunter auch AtCLIC, im Cytoplasma exprimiert sind. Das vierte Protein AtDHAR3 besitzt eine Zielsequenz für den Chloroplasten und ist wahrscheinlich in den Plastiden aktiv. Von den drei cytosolischen DHARs zeigen zwei (AtCLIC und AtDHAR2) auch eine GSH-abhängige Aktivität als Thiol-Transferase und als Dehydroascorbat-Reduktase. AtDHAR4, obwohl in seiner Primärstruktur sehr ähnlich zu den aktiven Proteinen (66 % Identität), ist nicht aktiv. Zu bemerken ist noch, dass die wichtige Glutathion-Konjugationsaktivität der anderen GSTs allen vier DHARs fehlt.

Durch Mutationsstudien wurde nachgewiesen, dass das Glutathion an das Cystein an Stelle 20 (im aktiven Zentrum) von AtCLIC bindet, indem ein gemischtes Disulfid gebildet wird (Dixon et al. 2002b).

### 1.5 Zielsetzung

Seit längerem ist bekannt, dass es Anionenkanäle im Tonoplasten von *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perrier (Hafke et al. 2003), *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Epimashko et al. 2004) und *Arabidopsis thaliana* L. (Cerana et al. 1995) gibt. Mit Hilfe von proteinbiochemischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Protein, das für den Malattransport in *K. daigremontiana* verantwortlich ist, eine Grösse von ca. 30 kDa hat (Ratajczak et al. 1994). Dieser pflanzliche Malatkanal konnte, wie auch der aus *M. crystallinum* bisher nur elektrophysiologisch charakterisiert, jedoch nicht kloniert werden (Hafke et al. 2003; Epimashko et al. 2004).

Auf der Suche nach einem Protein, das eine entsprechenden Grösse und intrazelluläre Lokalisation aufweist, wurde man auf die tierische Familie der Chloride Intracellular Channels (CLICs) aufmerksam, die diese Kriterien erfüllen (Ashley 2003; Harrop et al. 2001). Bei einem Sequenzvergleich eines Vertreters dieser Familie (CLIC1 aus *Homo sapiens*) mit Genen aus *A. thaliana* wurde eine Sequenz gefunden, die eine hohe Homologie aufweist (Cromer et al. 2002). Dieses Protein gehört zur DHAR Klasse der GST-Superfamilie und wurde hier AtCLIC genannt.

Im Genom von *A. thaliana* findet man Gene für insgesamt 48 GSTs (Dixon et al. 2002a), von denen 25 konstitutiv exprimiert werden. Diese große Menge an GSTs suggeriert, dass GSTs neben den bekannten Aufgaben in der Detoxifikation noch viele weitere Funktionen haben könnten, von denen auch einige bereits bekannt sind.

Durch die hohe Homologie zu der Familie der tierischen CLICs und die allgemein sehr heterologe Funktionalität der GSTs liegt die Vermutung nahe, dass AtCLIC neben der DHAR-Aktivität eine weitere Funktion als Anionenkanal ausüben könnte.

Um die Frage zu beantworten, ob der putative Anionenkanal eine Funktion als Kanal hat, sollte das Gen für AtCLIC kloniert und im heterologen System exprimiert werden. Die durch das Protein induzierte Leitfähigkeit sollte mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch erfasst werden. Außerdem sollte die Frage der Lokalisation durch mikroskopische sowie proteinbiochemische Methoden geklärt werden.

## ***Material und Methoden***

### ***2.1 Chemikalien***

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Fluka (Buchs, Schweiz) und Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) bezogen.

### ***2.2 .Sterilität***

Nährmedien, Puffer, Einwegplastikmaterialien, Glasmaterial und die meisten Lösungen wurden 20 min in feuchter Hitze bei 1,5 bar/121 °C autoklaviert (Autoclave-Steam Sterilizier Typ 3870 ELV, Tuttnauer). Die Sterilisation von Glaspipetten erfolgte über 4-5 h bei 180 °C im Trockenschrank (Typ ST 5042, Heraeus, Darmstadt). Thermolabile Lösungen und Puffer wurden durch Sterilfiltration (0,2 µm Filter / Schleicher & Schuell, Dassel) entkeimt. Alle Arbeitsschritte der Zellkultur, sowie einige der Molekularbiologie, wurden mit Handschuhen unter einen Reinraumgerät (Flow Laboratory GmbH, Bonn) durchgeführt, das mit 70% Ethanol und UV-Licht keimfrei gemacht wurde.

### ***2.3 Molekularbiologische Methoden***

#### ***2.3.1 Enzyme***

Restriktionsendonukleasen wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) bezogen.

Für die PCR wurden *Pfu* DNA-Polymerase, die entsprechenden 10 x Polymerase-Puffer und dNTPs von Promega (Mannheim) verwendet.

#### ***2.3.2 Größenstandards***

Als Größenstandard für die Agarose-Gel- Elektrophorese wurden *1 kb* oder *100 kb DNA Ladder* (NEB, Frankfurt a.M.) verwendet.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde der *Größenstandard Precision Plus Protein Standart all blue* (Biorad, München) eingesetzt.

### 2.3.3 Reaktionssysteme (Kits)

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Arbeitsschritte mit Reaktionssystemen durchgeführt:

*RNeasy Plant mini Kit* (Qiagen, Hilden)

*RevertAid<sup>TM</sup> First Strand DNA Synthesis Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot)

*GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

*HiSpeed<sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden)

*MinElute<sup>TM</sup> Reaction Cleanup Kit* (Qiagen, Hilden)

*GenElute<sup>TM</sup> High Performance Plasmid Midiprep Kit* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

*BD Talon<sup>TM</sup> Metal Affinity Resin* (BD Biosciences ,Palo Alto)

*Ni-NTA Spin Kit* (Quiagen, Hilden)

Sofern nicht anders angegeben, wurde die Arbeitsvorschrift des Herstellers befolgt.

### 2.3.4 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide (Primer) wurden von Sigma Genosys (Steinheim) und SEQLAB (Göttingen) synthetisiert.

**Tab .1:** Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden

| Name                           | Sequenz  | Bemerkung   |
|--------------------------------|--|---|
| <i>forwAtCLIC</i>              | 5' <b>ggat agatct atg gct ctg gaa atc tgt gtg</b> 3' | Vorwärtsprimer für AtCLIC , zum Einklonieren in Expressionsvektoren pIRES-EGFP und pEGFP-N2       |
| <i>revAtCLIC</i>               | 5' <b>ccta gaattc tca agg gtt aac ttt ggg agc</b> 3' | Rückwärtsprimer für AtCLIC mit Stoppsequenz, zum Einklonieren in Expressionsvektor pIRES-EGFP     |
| <i>revAtCLICoStop</i>          | 5' <b>ccta gaattc agg gtt aac ctt ggg agc cca</b> 3' | Rückwärtsprimer für AtCLIC ohne Stoppsequenz, zum Einklonieren in Expressionsvektor pEGFP-N2      |
| <i>fwd_AtClicex</i>            | 5' <b>ggat gtcgac atg get ctg gaa atc tgt gtg</b> 3' | Vorwärtsprimer für AtCLIC , zum Einklonieren in Expressionsvektoren pQE-31                        |
| <i>rwd_AtClicex</i>            | 5' <b>ccta ctgcag tca agg gtt aac ttt ggg agc</b> 3' | Rückwärtsprimer für AtCLIC zum Einklonieren in Expressionsvektor pQE-31                           |
| <i>pQEprom</i>                 | 5' <b>ccc cga aaa gtg cca cct g</b> 3'               | Vorwärtsprimer für Sequenzierung einclonierter Gene in die MCS von pQE-31, Standardprimer SEQLAB  |
| <i>pQE Reversed Sequencing</i> | 5' <b>gtt ctg agg tca tta ctg g</b> 3'               | Rückwärtsprimer für Sequenzierung einclonierter Gene in die MCS von pQE-31, Standardprimer SEQLAB |

### 2.3.5 Plasmide

#### **pEGFP-N2** (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

pEGFP-N2 ist ein Vektor für Säugerzellen und trägt den Cytomegalovirus (CMV) Promotor und ein Gen für Ampicillin-Resistenz. Auf diesem Vektor befindet sich die codierende Sequenz für eine „red-shift“-Variante des Wildtyps des Green Fluorescent Protein (GFP). GFP ist ein Protein der Qualle *Aequorea victoria*, das bei entsprechender Anregung fluoresziert. Es dient in dieser Arbeit als Marker für die Genexpression und für Lokalisationsstudien. AtCLIC wurde zwischen die Schnittstellen *BglII* und *EcoRI* (im Leserahmen mit GFP) in die *multiple cloning site* (MCS) kloniert. Daraus resultierte das Fusionsprotein AtCLIC::GFP.

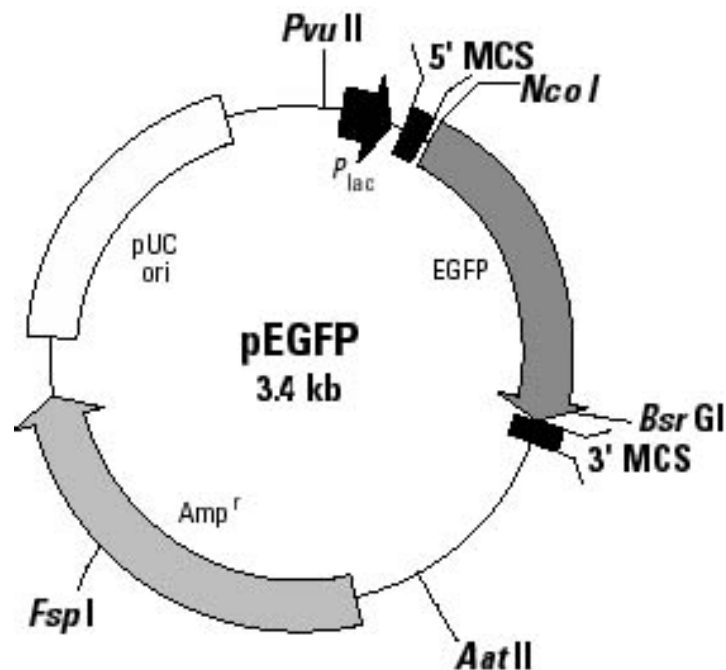
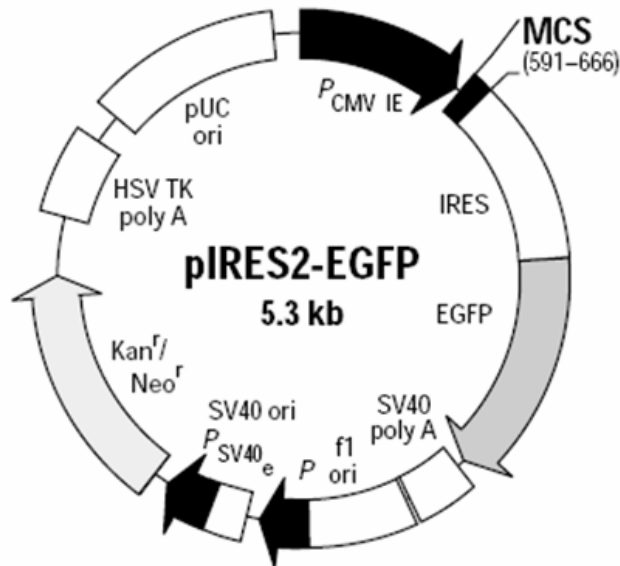


Abb .3: Plasmid pEGFP-N2 (4700bp) (Clontech).

#### **pIRES-EGFP** (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

pIRES-EGFP ist ebenfalls ein Säugervektor, der für GFP codiert. Er besitzt den Cytomegalovirus (CMV) Promotor, ein Gen für Ampicillin-Resistenz und die codierende Sequenz für GFP. Dieser Vektor ist ein so genannter bicystronischer Vektor, das heißt GFP und das einclonierte Gen werden getrennt von einer einzigen mRNA translatiert. AtCLIC

wurde zwischen die Schnittstellen *Bgl*III und *Eco*RI (im Leserahmen mit GFP) in die *multiple cloning site* (MCS) kloniert. In einer transfizierten Zelle werden AtCLIC und GFP gleichzeitig exprimiert.



**Abb. 4:** Plasmid pIRES-EGFP (5300bp) (Clontech).

#### **pQE-31** (Qiagen, Hilden)

pQE-31 ist ein Expressionsvektor für *E.coli* und besitzt einen T5-Promotor. Er trägt eine Ampicillin-Resistenz. Den Vektor pQE-3X gibt es in drei Leserahmen (pQE-30, pQE-31 und pQE-32), in dieser Arbeit wurde pQE-31 verwendet. Der Vektor besitzt die codierende Sequenz für 6 Histidine direkt upstream der MCS. Im Leserahmen klonierte Gene werden mit einem C-terminal fusionierten 6fach His-tag exprimiert.

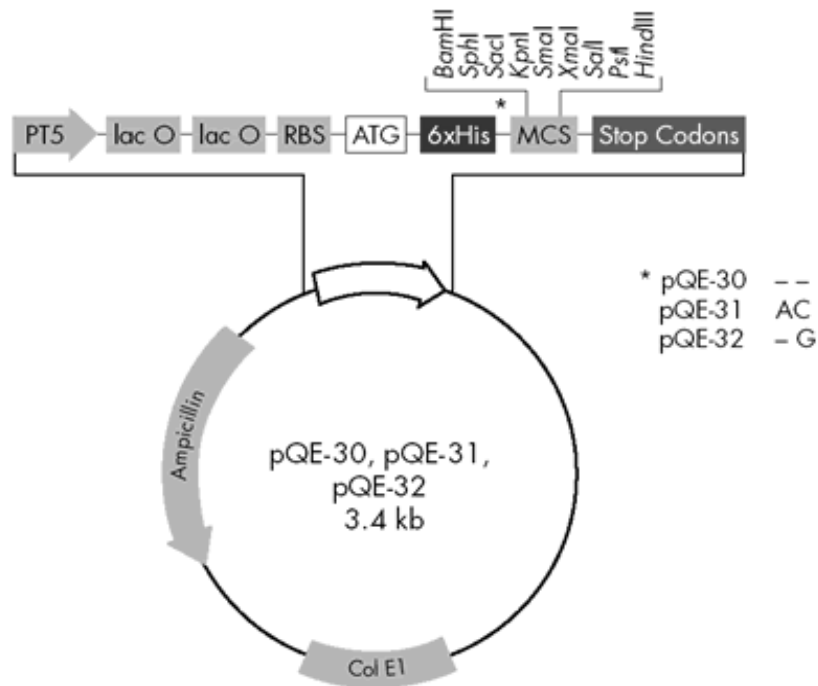


Abb. 5: Plasmid pQE-31 (3400bp) mit Restriktionsschnittstellen der Multiple Cloning Site (MCS) (Quiagen).

### 2.3.6 Heterologe Expressionssysteme

In dieser Arbeit wurden heterologe Expressionssysteme verwendet. Das heißt, ein Protein wird in einer Zelle exprimiert, die normalerweise nicht über das untersuchte Protein verfügt. Bei den Zellen handelt es sich um Humane Embryonale Nierenzellen (HEK 293) und Ovarienzellen chinesischer Hamster (CHO-K1).

#### Human Embryonal Kidney Cells (Graham et al. 1977)

Die eukaryontische Zelllinie "Human Embryonal Kidney Cells" (HEK293) wurde durch Einbringen gescherter Adenovirus-DNA in embryonale menschliche Nierenzellen hergestellt. Sie wurden in Rahmen dieser Arbeit zur transienten Expression des Proteins AtCLIC verwendet und in DMEM/F12 mit 10% (v/v) FCS, 2,5 mM Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank (Heraeus) unter standardisierten Bedingungen von 37 °C und 4-5 % CO<sub>2</sub>.

### **Chinese Hamster Ovary Cells** (Puck 1957)

Die permanente Zelllinie "Chinese Hamster Ovary Cells" (CHO-K1) verfügt über eine sehr gute Transfektionsfähigkeit. Auch diese Zelllinie wurde zur transienten Expression verwendet und unter den gleichen Bedingungen kultiviert, die für HEK293-Zellen beschrieben sind.

#### **2.3.7 RNA-Präparation**

Die RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Plant mini Kit* (Qiagen).

Zur RNA Gewinnung wurde *A. thaliana* unter Kurztagsbedingungen angezogen. Aus den grünen Teilen dieser Pflänzchen wurde die Gesamt-RNA isoliert.

Zunächst wurde höchstens 100 mg Pflanzenmaterial geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Alle weiteren Schritte der RNA-Isolierung wurden entsprechend den Angaben des Herstellers bearbeitet. Die jeweiligen Konzentrationen der so gewonnenen RNA-Proben wurden unter Verwendung eines speziellen Verfahrens bestimmt. Hierzu wurden zunächst die Küvetten wie folgt gereinigt:

1 x mit ca. 1 ml 0,1 M NaOH spülen

1 x mit ca. 1 ml 0,001 M EDTA spülen

2 x mit DEPC-H<sub>2</sub>O spülen

6 µl der Nukleinsäurelösung wurden anschließend zu 294 µl Puffer (0,01 M Tris/HCl, pH 7,5 mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt) gegeben und gut gemischt. Die optische Dichte (OD) wurde bei 260 und 280 nm gemessen. Als Referenz dienten 300 µl Puffer. Aus den Messwerten wurde die Konzentration der RNA berechnet (siehe 2.3.14).

#### **2.3.8 Reverse Transkription**

Um das genetische Material für weitere Schritte nutzen zu können, musste die mRNA aus der Gesamt-RNA mittels Reverser Transkription (RT-PCR) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies geschah mit Hilfe des Systems *RevertAid<sup>TM</sup> First Strand DNA Synthesis Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers.

### 2.3.9. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation von AtCLIC aus cDNA eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen mit dem Multi Cyclor PTC (MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt.

Die PCR erfolgte in einem 50 µl-Ansatz mit 30-50 ng *template*-DNA, 40 pmol dNTP-Mix (10 pmol je dNTP), je 100 pmol eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers, 5 µl 10 x Polymerase-Puffer, 2,5 U *Pfu*-DNA Polymerase.

#### PCR-Programm:

|               |  |
|---------------|--|
| 1 Zyklus mit  | 3 min bei 94 °C (Denaturierung der DNA)                      |
| 30 Zyklen mit | 30 s bei 94°C (Denaturierung der DNA)                        |
|               | 30 s bei 56 °C (Hybridisierung der Primer)                   |
|               | 4min bei 74 °C (Elongation durch die <i>Taq</i> -Polymerase) |
| 1 Zyklus mit  | 10 min bei 74 °C (Auffüllen abgebrochener Fragmente)         |

Durch die Primer wurden *BglIII* (5') und *EcoRI* (3') Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit den beiden Restriktionsenzymen verdaut und nach Reinigung über ein *MinElute<sup>TM</sup> Reaction Cleanup Kit* in den, vorher mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisierten, Säugerzell-Expressionsvektor pEGFP-N2 oder pIRES-EGFP in das Leseraster ligiert.

### 2.3.10 Ligation

Durch die Ligation mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase werden ein DNA-Fragment und ein vorher linearisierter Vektor verbunden.

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <u>Ligationsansatz:</u> | 1 µl pEGFP-N2 bzw pIRES-GFP(ca. 500 µg/µl)           |
|                         | 5 µl gereinigtes PCR-Produkt                         |
|                         | 1 µl 10 x T4 DNA-Ligase-Puffer (NEB, Frankfurt a.M.) |
|                         | 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl) (NEB, Frankfurt a.M.)  |
|                         | ad 10 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>          |

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation von *E.coli* durch Elektroporation oder Hitzeschock.

### 2.3.11 *Escherichia coli* Kultivierung

Folgende *Escherichia coli* (*E.coli*) Stämme wurden verwendet:

- DH5 $\alpha$  (Hanahan 1983): zur Plasmidvermehrung und -isolierung
- JM 101 (Messing 1979): zur Proteinsynthese
- X11-blue MFR' (Stratagen, La Jolla, USA): zur Plasmidvermehrung und -isolierung.

Die Kultivierung erfolgte im Medium nach Luria und Bertani (Bertani 1952). Dem LB-Medium (5 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert) kann zur Herstellung von Agarplatten 15 g/l Agar zugesetzt werden. Bei Bedarf wurden Bakterien-Stammkulturen, die als Glycerinsuspension (58 %) bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  lagerten mit einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert (Inkubationsschrank, Desaga, Heidelberg).

5 ml LB-Medium mit Antibiotika wurden Einzelkolonien angeimpft und über Nacht in einem heizbaren Schüttler (Certomat, B. Braun) bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Diese Übernachtskulturen wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

Die Selektion von Transformanten erfolgte über den Zusatz von geeigneten Antibiotika zum LB-Flüssigmedium oder LB-Agar. Diese dürfen erst nach Abkühlen des Mediums auf ca.  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  zugegeben werden, da sie sehr hitzelabil sind.

### 2.3.12 Transformation

#### 2.3.12.1 Hitzeschock-Methode

Ca.  $5 \times 10^7$  kompetente *E.coli*-Zellen (in  $50\text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension, nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan 1985) hergestellt) wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe  $1\text{ }\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (100-500 ng) und Inkubation der Zellen für 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Heizblock (Thermobloc, Renner GmbH, Dannstadt), um die Aufnahme der DNA zu ermöglichen. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden  $250\text{ }\mu\text{l}$  SOC-Medium (20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Glucose) zugegeben. Der Transformationsansatz wurde unter Schütteln (Certomat, B. Braun) 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

$30\text{-}100\text{ }\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden anschließend auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  Wärmeschrank (Desaga, Heidelberg) inkubiert.

### 2.3.12.2 Elektrotransformations-Methode

Die Elektroporationsküvetten wurden einige Minuten in 70 % Ethanol gereinigt. Nach dem Trocknen unter einer Sterilbank wurden sie ca. 10 Minuten einer UV-Bestrahlung ausgesetzt.  $2 \times 10^8$  elektrokompente Zellen (in 40  $\mu$ l Zellsuspension, nach Sambrook et al. (1989) hergestellt) und 0,5-2  $\mu$ l Plasmid-DNA (50-500 ng) wurden luftblasenfrei zusammen in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Dann wurde mit dem Elektroporationsgerät *Gene Pulser II* (Bio-Rad) mit folgenden Parametern elektroporiert: 2,5 kV Vorspannung, 200  $\Omega$  Widerstand und 25  $\mu$ F Kapazität. Bei Pulszeiten von 3-5 ms war die Elektroporation erfolgreich. Zu den so behandelten Zellen wurde sofort 1ml eiskaltes SOC-Medium (20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose) gegeben und der Ansatz 1h unter Schütteln (Certomat, B. Braun) bei 37 °C inkubiert.

30-100 $\mu$ l der Zellsuspension wurden anschließend auf eine geeignete LB-Selektionsplatte ausgestrichen und bei 37 °C im Wärmeschrank (Desaga, Heidelberg) inkubiert.

### 2.3.13 Plasmidpräparation

Kleine Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der alkalischen Lyse nach Sambrook et al. (1989) isoliert.

Die Plasmid-Isolation in größerem Maßstab und mit höherer Reinheit wurden mit dem *HiSpeed™ Plasmid Midi Kit* von Qiagen oder dem *GenElute™ High Performance Plasmid Midiprep Kit* von Sigma nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.3.14 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, kann bei dieser Wellenlänge und bei einer Schichtdicke von 1 cm, die optische Dichte (OD) einer Nukleinsäurelösung photometrisch gemessen werden. Die Nukleinsäurekonzentration dieser Lösung errechnet sich aus der OD<sub>260 nm</sub>, dem Verdünnungsfaktor der Lösung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der Tyrosin- und Tryptophanreste in Proteinen, können Aussagen über die Reinheit bzw. über eventuelle Proteinkontaminationen in der Nukleinsäurelösung gemacht werden. Das Verhältnis der OD<sub>260 nm</sub> und der OD<sub>280 nm</sub> sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen. In Abhängigkeit des für die Messung verwendeten Wassers oder Puffers können die OD<sub>260/280</sub>-Verhältnisse jedoch zwischen 1,5 und 2,2

variieren.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260} \cdot V \cdot F$$

**Gleichung 1** mit  $c$  = Konzentration der DNA,  $OD_{260}$  = Optische Dichte gemessen bei 260 nm,  $V$  = Verdünnungsfaktor;  $F$  = Multiplikationsfaktor ( 50 für dsDNA, 40 für RNA, 37 für ssDNA, 20 für einzelsträngige Oligonukleotide)

### *2.3.15 Agarose-Gelelektrophorese*

Die Agarose-Gelelektrophorese diente sowohl der qualitativen und quantitativen Analyse als auch der Aufreinigung von DNA. Sie wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

1% Agarose in TAE-Puffer (40mM Tris-HCl, 20mM Natriumacetat, 1mM EDTA, pH 7,5 – 8,0 ) wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollkommen geschmolzen war.

Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit 0,8-1,2  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid

1:10000 (w/v) versetzt Die flüssige Agaroselösung wurde in einen Gelschlitten mit

Probenkamm gegossen. Nach dem Erstarren der DNA wurde der Probenkamm aus dem Gel gezogen. Die Gelkammer wurde mit TAE Puffer gefüllt, bis das Gel bedeckt war.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (50 % Glycerin, 1 % Bromphenolblau) versetzt und in die Aussparungen, die der Probenkamm hinterlassen hat, pipettiert. In eine der Taschen wurde Größenmarker (100 bp DNA-Leiter oder 1 kbp DNA-Leiter (NEB, Frankfurt a.M.)) zur Größenbestimmung der aufgetrennten DNA gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 60-80mA.

### *2.3.16 DNA-Sequenzierung*

Die DNA-Sequenzen aller Konstrukte wurden durch Sequenzierung kontrolliert. Dazu wurde DNA-Material mit einem entsprechenden Sequenzierungsprimer von der Firma SEQLAB (Göttingen) analysiert.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Antikörper

#### **Primärantikörper:**

*Anti-GFP (JL-8)*, mouse monoclonal antibody (BD Biosciences Clontech, Heidelberg), eingesetzt 1:1000.

*Anti-His<sub>6</sub>*, mouse monoclonal antibody (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), eingesetzt 1:500.

*Anti-AtCLIC, guinea pig polyclonal antibody* (Pineda, Berlin) hergestellt mit Hilfe des in dieser Arbeit aufgereinigten Proteins AtCLIC.

#### **Sekundärantikörper:**

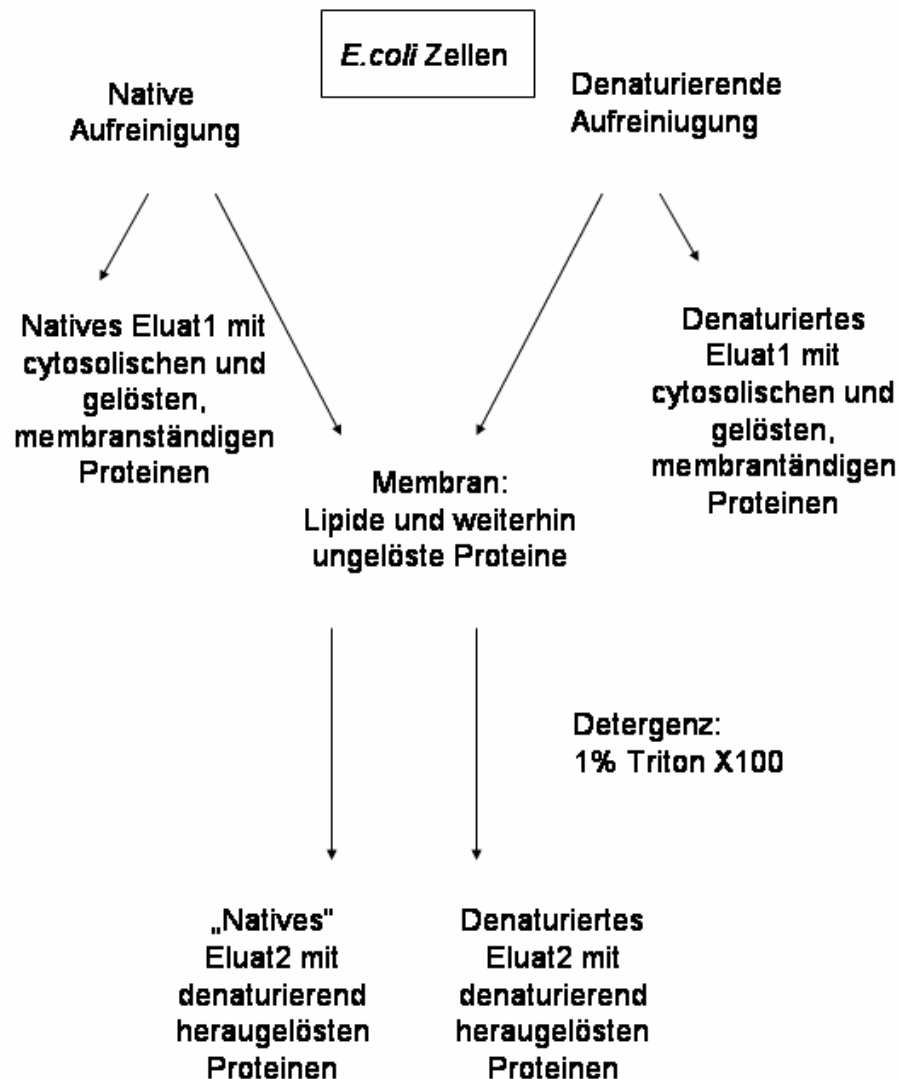
*Anti-Mouse IgG*, goat anti-mouse, *Alkaline Phosphatase-Konjugat*, (Sigma, Deisenhofen), eingesetzt 1:15000.

### 2.4.2 Proteinisolation aus HEK293-Zellen

Die Proteinisolation aus HEK293-Zellen erfolgte 2 Tage nach der Transfektion. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von den Kulturschälchen abgelöst. Nach Zugabe von 2 ml Medium wurde die Zellsuspension in ein 10 ml Falconröhrchen überführt und 8 min bei 1000 U/min zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet wiederum zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Homogenisierung erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung (Sonorex, Bandelin electronic, Berlin) für 1 min bei 4 °C, nach Zugabe des eiskalten Homogenisierungspuffers (200 mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 7.2). Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13000 U/min für 5 min bei 4 °C (Biofuge primoR, Heraeus) wurde der Überstand abgenommen. Die isolierten Proteine wurden bei -80 °C gelagert.

### 2.4.3 Proteinisolation aus *Escherichia coli*

Zunächst wurde getestet, ob die Aufreinigung der Proteine unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen besser gelingt. Dafür wurde das *BD Talon<sup>TM</sup> Metal Affinity Resin* (BD Biosciences, Palo Alto) genutzt. Die beiden Aufreinigungen liefen parallel ab, und die Membranreste beider Ansätze wurden mit einem scharfen Detergenz behandelt, um zu überprüfen, wie viel des Proteins in der Membran zurückgeblieben war (Abb. 6).



**Abb. 6:** Verlaufsschema der Proteinaufreinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen.

#### 2.4.3.1 Denaturierende Bedingungen

Aufgrund der Ergebnisse des oben beschriebenen Tests erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen weiterhin mit dem *BD Talon<sup>TM</sup> Metal Affinity Resin* (BD Biosciences, Palo Alto) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde der E/W Puffer mit pH8,0 gewählt und diesem 6 M Guanidin zugesetzt. Die Elution erfolgte mit dem Elutionspuffer pH7,0, dem 5,4 M Guanidin und 150 mM Imidazol zugesetzt waren.

Die so erhaltenen Proteine wurden zu Herstellung von Antikörpern eingesetzt. Da Guanidin für Tiere schädlich ist, wurden die aufgereinigten Proteine durch schrittweise Dialyse von Guanidin befreit und in TBS gelöst.

#### 2.4.3.2 Native Bedingungen

Das unter denaturierenden Bedingungen (siehe Punkt 2.4.3.1) genutzte Säulenmaterial Talon hat so starke Bindungseigenschaften, dass das nativ gereinigte Protein nicht mehr zu lösen war. Deshalb erfolgte die native Aufreinigung des Proteins AtCLIC mit Hilfe des *Ni-NTA Spin Kit* (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Bindung zwischen Nickel und dem Histidintag ist schwächer und deshalb leichter wieder zu lösen.

#### 2.4.4 TCA-Fällung

Zur Konzentrierung der Proteine wurde eine TCA-Fällung durchgeführt. Zu 100 µg Gesamtprotein wurde 1 ml einer 10 %igen TCA-Lösung gegeben, gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die nun gefällten Proteine 10 min bei 13000 U/min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Biofuge 13, Heraeus) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH ca. 7) gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt.

#### 2.4.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde nach der Methode von Popov et al. (1975) durchgeführt.

#### 2.4.6 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gel-Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine in Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8,7 % Glycerin, 3 % β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 0,01 % Bromphenolblau) aufgenommen und 3 min bei 60 °C inkubiert.

Die Elektrophorese wurde in einer Mini-Protean II-Kammer (Bio-Rad, München) durchgeführt. Als Standard-Trenngel wurden 12,5 %ige Polyacrylamidgele verwendet.

#### 2.4.7 Western-Blot Analyse

Die Proteine aus SDS-Gelen wurden auf PVDF-Membranen übertragen, um sie der Immunofärbung zugänglich zu machen. Dazu wurden das SDS-Gel, drei Blotpapiere (GB005 Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel) und eine auf Gelgröße zugeschnittene

Teflonmembran (PVDF, Immobilon P, Millipore), die zuvor mit Methanol benetzt wurde, für 5 min in Blotpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin) inkubiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer *Semi-Dry*-Blotapparatur (Trans-Blot® SD, Bio-Rad, München). Auf die Anode der Blotkammer wurden eine Lage Blotpapier, die Teflonmembran, das SDS-Gel und weitere zwei Lagen Blotpapier luftblasenfrei geschichtet. Danach wurde die Blotapparatur verschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte unter sequentieller Spannungssteigerung ( je 15 min bei 10 V, 12,5 V und 15 V).

#### **2.4.8 Immunofärbung**

Die Teflonmembran wurde nach dem Blotten für 5 min mit der proteinbeladenen Seite nach unten in TBS (10 mM Tris, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt, 0,9 % (w/v) NaCl) gewaschen. Nach Inkubation in TBS-Milch (2 % Milchpulver in TBS) für 1 h, folgten 4 Waschschrte mit TBS à 5 min. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h. Nach weiteren 4 Waschschrten von je 5 min mit TBS wurde für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für je 5 min mit TBS und viermal mit AP-Puffer (100 mM Tris, mit HCl auf pH 9,5 eingestellt, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und in Färbelösung (100 µl NTB, 50 µl BCIP, ad 15 ml AP-Puffer) gelegt. Nach ausreichender Farbreaktion auf der Membran wurde diese durch mehrfaches Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gestoppt und die Membran getrocknet.

#### **2.5 Zellkulturführung**

##### **2.5.1 Kultivierung der HEK- und CHO-Zellen**

Nach Erreichen der Konfluenz und Ausbildung eines dichten Zellrasens (ungefähr 10<sup>6</sup> Zellen/ml) mussten sowohl die HEK293-Zellen, als auch die CHO-K1-Zellen passagiert, d.h. verdünnt und in neue Kulturgefäße umgesetzt werden. Das war nötig, da sie als adhärenente Zellen wachsen und sich bei zu hohen Konzentrationen vom Untergrund ablösen und sterben. Die Kontrolle der Konzentration erfolgte in einer Bürker-Kammer. 0,5 ml der Zellsuspension wurden mit der gleichen Menge Medium verdünnt und mit Hilfe eines Mikroskops gezählt. Die Kammer enthält 144 größere Quadrate von je 0,04 mm<sup>2</sup> und hatte eine Tiefe von 0,1 mm. Die 144 Quadrate wurden ausgezählt und das Ergebnis anschließend

mit 3480 multipliziert. Auf diese Weise konnte die Anzahl der Zellen pro ml berechnet werden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkultur-Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> und Filterschraubkappen für den CO<sub>2</sub>-Austausch (Renner GmbH, Dannstadt).

Die zu passagierenden Zellen wurden vom verbrauchten Nährmedium befreit, mit 2 ml PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, mit NaOH auf pH 7,4, autoklaviert) gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA beschichtet, um die Zellen abzulösen.

Zur Inaktivierung des Trypsins wurden zur Zellsuspension 5 ml Nährmedium das Trypsininhibitoren enthielt, gegeben und gemischt. Je etwa 300.000 Zellen wurden in zwei neue Zellkultur-Flaschen, in die bereits 5 ml Nährmedium vorgelegt waren, überführt.

### ***2.5.2 Expression von AtCLIC in HEK293- und CHO-K1-Zellen***

Die Zellen wurden auf 35 mm Kulturschälchen angezogen, bis sie diese zu 40-60 % bedeckten. Sie wurden gemäß der Gebrauchsanleitung mit Hilfe des Transfektionsreagens *Metafectene*<sup>TM</sup> (Biontex München) mit 1,5 µg Plasmid DNA transfiziert.

Die Zellen wurden dann für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, und die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt.

## ***2.6 Elektrophysiologie***

### ***2.6.1 Aufbau***

Der Strom durch die Zellmembran wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Hamil et al, 1981) gemessen. Dabei wurde mit einer Messelektrode, die an einen Patch-Clamp-Verstärker (EPC-7, Listelelectronic, Darmstadt) angeschlossen war, gegen die im Bad befindliche Referenzelektrode gemessen. Die Messelektrode befand sich in einer Glaspipette, die mit Hilfe eines Zweischnitt-Pipettenziehers (PP-830, Nasishige, Japan) aus Borosilikatkapillaren (Kimax-51, Kimle Products, USA) gezogen waren. Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt.

### 2.6.2 Elektrophysiologie an HEK293- und CHO-K1-Zellen

Experimente an HEK293-Zellen und CHO-K1-Zellen wurden an Zellen durchgeführt, die nach der Transfektion 2-3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert worden waren. Einen Tag vor den Experimenten wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von den Kulturschälchen abgelöst, zur Verringerung der Zelldichte auf Kulturschälchen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **Lösungen:**

Die Bad bzw. Pipettenlösungen setzten sich zusammen aus:

##### Badlösungen:

Lösung a; 140 mM TEA-Chlorid, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

Lösung b; 140 mM TEA-Chlorid, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM IAA-94

##### Pipettenlösungen:

###### *Cell-attached- Messungen:*

Lösung c; 140 mM TEA-Chlorid, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

Lösung d; 14 mM TEA-Chlorid, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

Lösung e; 14 mM TEA-Acetat-Tetrahydrat, 1 mM MgCl<sub>2</sub> ,1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

###### *Whole-cell-Messungen:*

Lösung f; 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 0,1 mM GTP (Stocklösung 10 mM),  
0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>,

5 mM Phosphocreatin-Dinatrium, 14 mM TEA-Chlorid

Lösung g; 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 0,1 mM GTP (Stocklösung 10mM),  
0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>,

5mM Phosphocreatin-Dinatrium, 140 mM TEA-Chlorid

Die Osmolarität aller Lösungen wurde mit Mannitol auf 300 mOSM eingestellt, der pH mit BTP oder HCl auf pH 7,5 bzw. pH 6,0 (Bad-Lsg.b).

TEA wurde als Kation verwendet, da es die zelleigenen Kaliumkanäle blockiert, was zu einer Verminderung des Messhintergrundes führt.

Als Anion dienten Chlorid oder Acetat. Magnesium- und Calcium-Kationen stabilisieren die Zellmembran.

Ein Liquid Junction Potential bestand jeweils zwischen Badlösung a und Pipettenlösung b (2,5mV), Pipettenlösung d (5,9 mV) und Pipettenlösung e (1,1 mV). Diese Potentiale wurden in den Daten nicht korrigiert.

### **Messungen:**

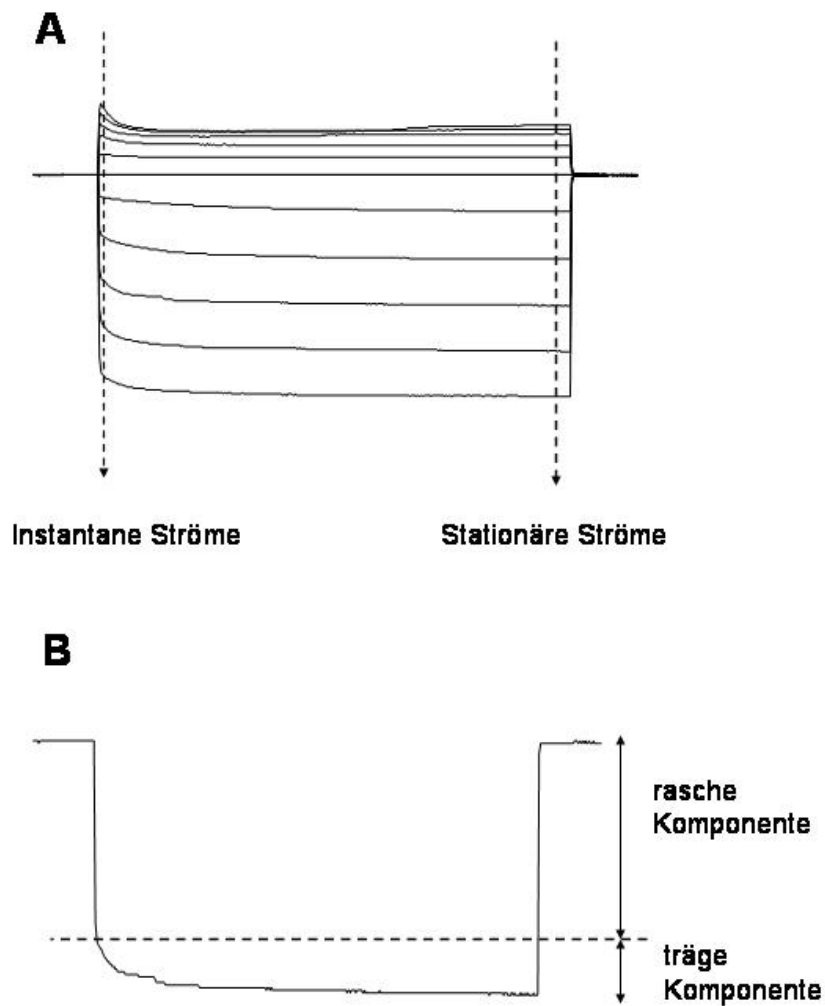
Die Messungen wurden entweder in der *Cell-attached*- oder der *Whole-cell*-Konfiguration vorgenommen. Für die *Cell-attached*-Messungen wurde die Messelektrode mit Hilfe eines Mikromanipulators (MMo-203, Narishige, Japan) an die Zelle herangebracht und durch Anlegen eines leichten Unterdrucks direkt an die Zellmembran angeheftet. Dabei wurde die Bildung eines Abdichtwiderstands von ca. 10 G $\Omega$  mit einem Speicherosilloskop (OS-3020D, Voltkraft, Korea) kontrolliert. Bei den *Whole-cell*-Messungen wurde danach noch durch einen starken Saugzug die Membran durchbrochen. Die *Cell-attached*-Messungen wurden anhand von Stufenprotokollen von -125mV bis +125mV, in Stufen von 25mV und einer Länge von 4s durchgeführt. Bei den *Whole-cell*-Messungen wurde ein Stufenprotokoll von -40 bis +80 mV in Stufen von 10mV und einer Länge von 4s gewählt.

Zur Erfassung und Aufzeichnung der Daten wurde die PCLAMP 5.5 Hard- und Software (Axon Instruments, Forster City, USA) genutzt. Die Messdaten wurden bei 1 kHz über einen 8-Pol-Besselfilter Tiefpass-gefiltert, mittels eines Analog-Digitalwandlers (TL-1 DMA Interface, Axon Instruments, Forster City, USA) digitalisiert und aufgezeichnet.

Die Analyse der Daten wurde mit den Computerprogrammen Clampfit 8.0 (Axon Instruments, Forster City, USA), Exel (Microsoft Corps., USA) und Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA) vorgenommen.

### **Auswertung:**

Zur Auswertung wurden die gemessenen Stromamplituden gegen die entsprechenden Spannungen aufgetragen und als Strom-Spannungs-Kennlinien (I/V-Kurven) dargestellt. Dabei wurden, je nach Auswertung, die Daten an zwei unterschiedlichen Stellen der Stromantwort abgelesen (siehe Abbildung 7 A). Die instantanen Ströme wurden in den ersten Millisekunden der Stromantwort abgelesen. In diesen Strom gingen die Stromantworten aller Kanäle ein, die sich sofort auf den Spannungssprung hin öffneten. Die stationären Ströme setzen sich, wie in Abbildung 7 B zu sehen, aus den instantanen Strömen und einer trägen Komponente zusammen. Sie wurden am Ende der Stromantwort abgelesen (Abb. 7 A).



**Abb. 7:** Darstellung der Ablesestellen für stationäre und instantane Ströme und der Stromkomponenten einer einzelnen Spur A, Original Stromantwort einer HEK293-Zelle, die mit pEFGP-N2-AtCLIC transfiziert wurde. Durch gestrichelte Linien ist angezeigt, wo die Daten für die instantanen bzw. stationären Ströme abgelesen wurden; B einzelne Stromspur aus A. Anhand von Pfeilen ist der Anteil der raschen und der zeitabhängigen Komponente dieser Stromantwort dargestellt.

### Benennung:

Per Definition wird ein Kanal „einwärtsgerichtet“ genannt, wenn positive Ladungen ins Zellinnere transportiert werden. Das bedeutet bei einem Anionenkanal eine Umkehrung der Bezeichnung: der Kanal heißt Einwärtsgerichtet, die Flussrichtung der untersuchten Anionen aber geht aus der Zelle heraus. In dieser Arbeit wird die Benennung der Ströme nach der Definition erfolgen, die Ionenflüsse nach der tatsächlichen Flussrichtung.

**Umkehrpotentiale:**

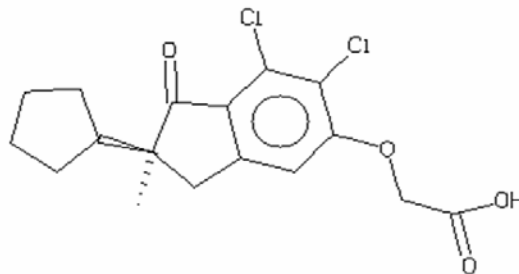
Die Umkehrpotentiale verschiedener Ionen wurden für die gewählten Lösungen berechnet, um die Selektivität des Proteins zu bestimmen. Sie wurden nach der Nernst'schen Gleichung berechnet:

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[c]_a}{[c]_i}$$

**Gleichung 2** mit **R**: Allgemeine Gaskonstante, **F**: Faraday-Konstante, **T**: Absolute Temperatur, **z**: Ladungszahl des Ions, **[c]<sub>a</sub>**: Konzentration des Ions außen **[c]<sub>i</sub>** Konzentration des Ions innen, **E**: Elektrische Potentialdifferenz über der Membran]

**Inhibierung:**

Für Inhibierungsexperimente wurde R(+)-methylindazone indanyloxy acetic acid 94 (IAA-94, siehe Abb. 8) ein spezifischer Chloridkanal-Blockereingesetzt. Nach Warton et al. (2002) kann mit 100 µM dieser Substanz eine deutliche Inhibierung des Anionenkanals CLIC1 erreicht werden.



**Abb. 8:** Struktur von R(+)-methylindazone indanyloxy acetic acid 94 (IAA-94).

**2.7 Confokalmikroskopie****2.7.1 Fluorophore**

Zur Untersuchung der HEK293-Zellen mit Hilfe des Confokalen Laserscanning Mikroskops (CLSM) wurden zwei Fluorophore eingesetzt. Dabei handelte es sich um GFP und Fm4-64. GFP ist ein autofluoreszierendes Protein aus der grün fluoreszierenden Qualle *Aequorea victoria*. Das Protein hat eine Größe von 238 Aminosäuren und eine Molmasse von 27 kDa. Es bildet eine β-Fässer-Struktur, in dem das Chromophor liegt. Durch blaues und UV-Licht

kann es zur Fluoreszenz angeregt werden. Wang and Hazelrigg zeigten 1994, dass GFP an das N- oder C-Ende anderer Proteinen gekoppelt werden kann, ohne dass die fluoreszierenden Eigenschaften von GFP verloren gehen oder die Funktionen der Proteine, an die GFP gekoppelt wurde, verändert werden.

Der Styrylfarbstoff Fm4-64 gehört zu einer Gruppe amphiphiler Moleküle mit fluorophoren Eigenschaften. Er wurde wie alle Fm-Farbstoffe von Betz et al. (1992) entwickelt. Er gilt als membranspezifischer Farbstoff, da er nicht durch die Membran diffundiert, sondern endocytotisch aufgenommen wird. Dabei zeigt er in wässriger Lösung keinerlei Fluoreszenz, in der Lipidumgebung der Membran dagegen eine hohe Fluoreszenzintensität.

### **2.7.2 Aufnahmen**

Die GFP-Fluoreszenz von transfizierten HEK293-Zellen wurde 2 Tage nach der Transfektion mit einem Leica TCS Spektral Confokalmikroskop detektiert, ausgerüstet mit einem Argon-Krypton-Laser (Leica Microsystems Heidelberg GmbH). Bilder wurden mit einem HCX PL APO 63x/1,2 NA Objektiv aufgenommen. GFP wurde mit der Argon-Laserlinie (488 nm) angeregt und die Emission confokaler Schnitte bei 500-540 nm gesammelt. Als Filter wurde TD488/543/633 genutzt. Fm4-64 wurde etwa zehn Minuten vor den Aufnahmen in einer 10µ M Konzentration in das Medium der Zellen gegeben. Es wurde ebenfalls mit 488 nm angeregt und bei 610-680 nm detektiert. Dabei wurde der Filter RSP500 eingesetzt.

Für die Darstellung und Auswertung der Bilder wurde die Leica Confocal Software 2.00 (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg) verwendet.

### **2.8 Software und Internetprogramme**

Zur Auswertung und Analyse von Daten wurden Excel (Microsoft), Clampfit (Axon Instruments), OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation) und Leica Confocal Software 2.00 (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg) benutzt.

Folgende zur Suche, Verarbeitung und zum Vergleich von Sequenzen eingesetzte Programme sind über das Internet frei verfügbar:

|                           |   |
|---------------------------|---|
| TMHMM2.0                  | <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM</a>                             |
| Tmpred                    | <a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a> |
| DAS                       | <a href="http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html">http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html</a>           |
| ClustalW                  | <a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw">http://www.ebi.ac.uk/clustalw</a>   |
| NCBI (BLAST, Pubmed),     | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>   |
| The RCSB Protein Database | <a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>   |

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Sequenzvergleiche

##### 3.1.1 Vergleich der Aminosäuresequenz von AtCLIC mit CLIC1 aus *Homo sapiens*

Das Gen für AtCLIC (AAF98403) stammt aus dem Genom von *A. thaliana*. Dieses Protein wurde von Harrop et al. (2001) als einer der nächsten Verwandten des humanen Chloridkanals CLIC1 bestimmt. Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob das Protein AtCLIC aufgrund seiner Ähnlichkeiten möglicherweise ebenfalls die Funktion als Kanal mit CLIC1 gemeinsam haben könnte. Bei Sequenzvergleichen mit dem Kanal CLIC1 (NM\_001288) aus humanen Zellen zeigte AtCLIC 61 % Ähnlichkeit bzw. 27 % Identität. Die Homologien befinden sich besonders in Bereichen, die für die Funktion des Kanals CLIC1 wichtig sind. So besitzen beide Proteine die gleiche GSH-Bindedomäne (XXCPFSQRXX), die das CPF Motiv der tierischen omega GSTs mit dem katalytischen Cystein enthält (Cromer et al. 2002). Auch eine prolinreiche Region (Harrop et al. 2001) ist bei beiden zu finden. Die hydrophobe Porenregion zwischen Pro-25 und Asp-47 enthält bei CLIC1 12 hydrophobe Aminosäuren. Eine entsprechende Region ist auch bei AtCLIC vorhanden und beinhaltet 9 solcher Aminosäuren.

|        |   |       |
|--------|---|-------|
| AtCLIC | MALEICVKA AVGAPDHLGDC <b>CPFSQR</b> ALLTLEEKSLTYKIH LINLSDKPQWFLDISPQ GKVPV | 62    |
|        | +E VKA +G+CPFSQR + L K +T+ + ++ + + + P G++P                                |       |
| CLIC1  | MAEEQPOVELFVKAGSDGAK-IGN <b>CPFSQR</b> LFMVLWLKGVTFNVTVDTKRRTETVQKLCPPGQLPF | 66    |
|        |   | *     |
| AtCLIC | LKIDDKWVTDSDVIVGILEE-----KY <b>DDPPLKTP</b> AEFASVGSNIFGTFGTF LKSKDS--      | 115   |
|        | L + TD++ I LE +YP P E + G +IF F ++K+ +                                      |       |
| CLIC1  | LLYGTEVHTDTNKIEEFLEAVL <b>CPPRYPKL</b> AALNP-ESNTAGLDIFAKFSAYIKNSNPAL       | 125   |
| AtCLIC | NDGSEHALLVELEALENHLKS-----HDGPF IAGERVSAVDLSLAPKLY                          | 159   |
|        | ND E LL L+ L+N L S F+ G ++ D +L PKL+  |       |
| CLIC1  | NDNLEKGLLKALKVLDNYLTSPLPEEVD ETSAEDEGVSQRKFLDGNELTLADCNLLPKLH               | 185   |
|        |   | * • * |
| AtCLIC | HLQVALGHFKSWSVPESFPVHNYMKT LFSLDSFEKTKTEEKYVISGWAPK VNP                     |       |
|        | +QV ++ +++PE+F VH Y+ ++ + F T +++ +   |       |
| CLIC1  | IVQVCKKYRGFTIPEAFRGVHRYLSNAYAREEFAS TCDDEEILPKLHIVELAYEQVAKALK              |       |

**Abb. 9:** Sequenzvergleich der Proteine AtCLIC aus *A. thaliana* und CLIC1 aus *H. sapiens*.

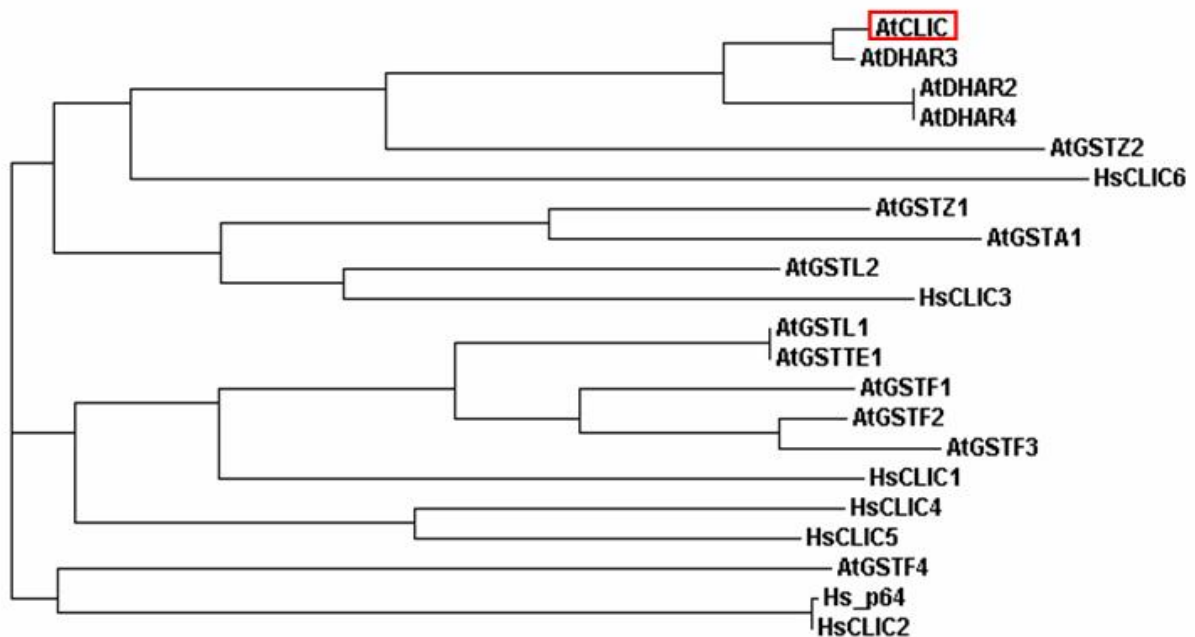
Die Domänen von CLIC1, die für die Kanalfunktion wichtig sind, sind markiert: *kursiv* =GSH-Bindestelle mit katalytischem Cystein (**C**), **fett**= prolinreiche Region, unterstrichen = putative Transmembrandomäne, • Ser/Thr- Domäne für Helixkapping, \* Strukturell wichtige Aminosäuren. Der Aminosäurevergleich wurde durch das BLAST-Programm (NCBI) erstellt.

Einige einzelne Aminosäuren, die bei CLIC1 strukturelle Funktionen besitzen (Harrop et al. 2001), wie das Gly-171 oder das Pro-66, finden sich auch bei AtCLIC. Die Aminosäure Thr-175 von CLIC1 gehört zu einem wichtigen Helix-Capping-Motiv am terminalen Ende von Helix 6. Dieses Threonin kann in diesem Motiv auch durch ein Serin ausgetauscht sein (Cromer et al. 2002), wie es bei AtCLIC der Fall ist. Der konservierte Asparaginsäurerest an Stelle 178 von CLIC1 dient der N-terminalen Helix-Capping-Interaktion (Cromer et al. 2002). Des Weiteren sind in Abbildung 9 die putativen Transmembrandomänen beider Proteine gezeigt. Ein Protein, das in der Membran vorliegt, zeigt im Normalfall einen Bereich, der hauptsächlich hydrophob ist, da dieser von den Lipiden der Membran umgeben ist. Für CLIC1 wurde eine einzelne  $\alpha$ -helicale Transmembrandomäne zwischen Cys-24 und Val-46 (Tonini et al. 2000) vorhergesagt. Die Transmembrandomäne des Proteins AtCLIC basiert auf dem Vorhersage-Algorithmus des Computerprogramms TMPred (EMBNET). Diese putative Transmembrandomäne von AtCLIC liegt nicht in der gleichen Region des Proteins, die für CLIC1 angegeben wird. Von weiteren Transmembran-Vorhersageprogrammen TMHMM (TMHMM Server v. 2.0. Prediction of transmembrane helices in proteins) und DAS (Dense Alignment Surface method; transmembran prediction server) wird keine Transmembrandomäne in AtCLIC angegeben. Auf der Basis dieser Vorhersagen ist es daher nicht möglich zu entscheiden, ob AtCLIC eine Transmembrandomäne besitzt. Es besteht die Möglichkeit, dass, wie auch im Falle von CLIC1, die Membraninsertion eher von den Eigenschaften eines Dimers bestimmt wird (Littler et al. 2004). Einige Bereiche des Proteins CLIC1 sind bei AtCLIC nicht zu finden, wie der negative Loop (Stelle 147-163 bei CLIC1) und ein strukturelles Glycin an Stelle 39 (Littler et al. 2003).

### 3.1.2 Phylogenetischer Baum

Innerhalb des Tier- und Pflanzenreichs gibt es viele Proteine, die eine ähnliche GST-Faltung wie AtCLIC besitzen. Im aktiven Zentrum tragen diese entweder ein Cystein oder ein Serin (persönliche Mitteilung Paul Curmi). Im folgenden phylogenetischen Baum (Abb. 10) sind einige dieser Proteine berücksichtigt. Unter ihnen sind die anderen drei Vertreter der Klasse der DHARs aus *A. thaliana*; sie sind die die am nächsten verwandten Proteine zu AtCLIC und weisen entsprechend die höchste Identität mit diesem auf (Abb. 10). Außerdem sind einige Vertreter andere GST-Klassen aus *A. thaliana* und die Proteine der CLIC-Familie aus *H. sapiens* berücksichtigt. Die verwandtschaftliche Beziehung dieser Proteine ist gemischt. Man findet, sowohl aus der Familie der GSTs (GSTZ2) als auch aus der

Familie der humanen CLICs (HsCLIC6), sehr nahe Verwandte zu AtCLIC. Auch auf den weiter entfernten evolutionären Ästen findet man Vertreter der CLICS (Hs\_p64) und der GSTs (AtGSTF4). Die CLICs und die GSTs sind also sowohl mit AtCLIC, als auch untereinander verwandtschaftlich verbunden.



**Abb. 10:** Phylogenetischer Baum der DHARs und anderer Mitglieder der GST-Familie aus *A. thaliana* und der CLIC-Familie aus *H. sapiens*.

Der Baum wurde mit dem ClustalW-Algorithmus (NCBI) erstellt. Legende der berücksichtigten Proteine mit Genbank Nummern in Klammern:

Aus *A. thaliana*: AtCLIC (AAF98403), AtDHAR2 (AB0266619), AtDHAR3 (AC025814), AtDHAR4 (AL391147), AtGSTZ1 (AC005312), AtGSTZ2 (AC005312), AtGSTA1 (AC000348), AtGSTL1 (AJ131580), AtGSTL2 (AL132970), AtGSTTE1 (AJ131580), AtGSTF1 (X68304), AtGSTF2 (X75303), AtGSTF3 (D17672), AtGSTF4 (D17673); aus *Homo sapiens*: Hs\_p64 (AAD26136), HsCLIC1 (NM\_001288), HsCLIC2 (CAA03948), HsCLIC3 (O95833), HsCLIC4 (Q9Y696), HsCLIC5 (AAF66928), HsCLIC6 (AAL24813)

Beim Vergleich der numerischen Sequenzähnlichkeiten bietet sich allerdings ein anderes Bild (siehe Tabelle 2). Alle Vertreter der CLIC Familie besitzen Identität zwischen 25 – 21 % zu AtCLIC. Die GSTs aus dem gleichen Organismus zeigen eine geringere Identität von 21-16 %. Auf Basis der Identitäten könnte man AtCLIC daher eher der Gruppe der CLICs zurechnen, als den GSTs.

**Tab. 2:** Tabelle der prozentualen Identitäten zwischen AtCLIC und Proteinen aus den Familien der GSTs aus *A. thaliana* und der CLICs aus *H. sapiens*.

Das Alignment wurde mit dem ClustalW-Algorithmus (NCBI) erstellt. Legende der berücksichtigten Proteine mit Genbank Nummern siehe phylogenetischer Baum (Abb. 10)

| DHAR aus<br><i>A.thaliana</i> | % Identität zu<br>AtCLIC | CLIC aus<br><i>H.sapiens</i> | % Identität zu<br>AtCLIC | GST aus<br><i>A.thaliana</i> | % Identität zu<br>AtCLIC |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| AtDHAR3                       | 75                       | Hs_p64                       | 25                       | AtGSTZ2                      | 21                       |
| AtDHAR2                       | 66                       | HsCLIC2                      | 25                       | AtGSTA1                      | 20                       |
| AtDHAR4                       | 66                       | HsCLIC1                      | 24                       | AtGSTF4                      | 19                       |
|                               |                          | HsCLIC3                      | 23                       | AtGSTZ1                      | 18                       |
|                               |                          | HsCLIC4                      | 23                       | AtGSTF3                      | 17                       |
|                               |                          | HsCLIC5                      | 22                       | AtGSTL1                      | 17                       |
|                               |                          | HsCLIC6                      | 21                       | AtGSTL2                      | 17                       |
|                               |                          |                              |                          | AtGSTE1                      | 17                       |
|                               |                          |                              |                          | AtGSTF2                      | 16                       |
|                               |                          |                              |                          | AtGSTF1                      | 11                       |

### 3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung von AtCLIC

#### 3.2.1 Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC

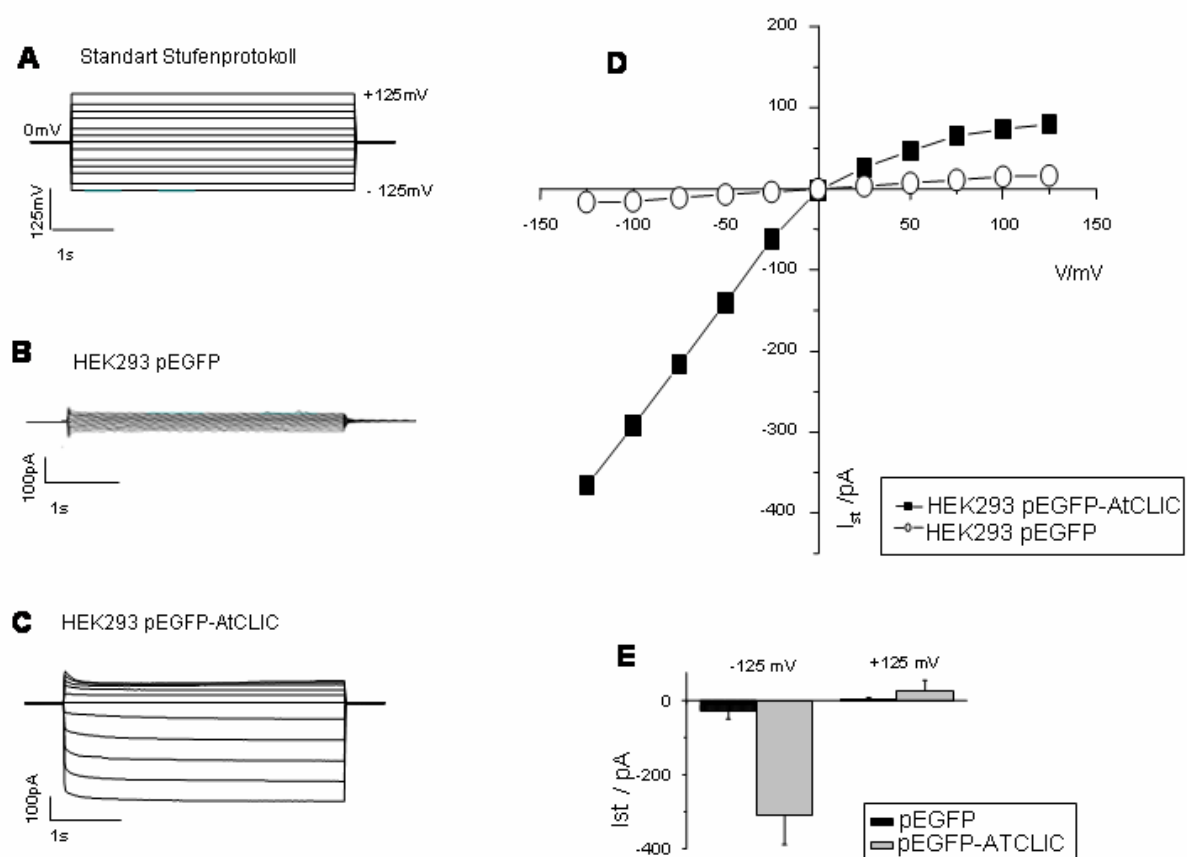
##### 3.2.1.1 Cell-attached-Messungen mit 140 mM TEA-Chlorid

Von CLIC1 ist bekannt, dass der Kanal bei transient transfizierten Säugerzellen in der Plasmamembran elektrisch zu messen ist. Um das Proteins AtCLIC auf eine mögliche Kanalaktivität zu überprüfen, wurde das heterologe System HEK293-Zellen gewählt. Dazu wurden HEK293-Zellen, die mit pEGFP- AtCLIC transfiziert waren und so das Fusionsprotein AtCLIC::GFP exprimierten, auf ihre Membranleitfähigkeit getestet. Durch das GFP im Fusionsprotein fluoreszierten diese Zellen im UV-Licht und waren so leicht von untransfizierten Zellen zu unterscheiden. Auch Kontrollzellen wurden gemessen, die mit dem leeren Vektor pEGFP transfiziert waren und somit nur GFP exprimierten. Zur Registrierung von Kanalaktivitäten wurde ein Membranpatch in der *Cell-attached*-Konfiguration mit Hilfe eines Stufenprotokolls (Haltspannung: 0 mV, in Schritten von 25 mV bis zu Testspannungen von -125 und +125 mV) vermessen (Abb.11 A). Da davon ausgegangen wurde, dass es sich bei AtCLIC um ein Homolog zu CLIC1 handelt, wurden die meisten Messungen in der vorliegenden Arbeit mit Lösungen durchgeführt, die Chlorid als einziges Anion enthalten. Ob noch weitere Anionen oder auch Kationen geleitet werden, wurde nicht untersucht. Aus

diesem Grunde können nur Aussagen über die Chloridleitfähigkeit des Proteins gemacht werden.

Abbildung 11 zeigt die Stromantworten der Kontrollzellen, die mit dem leeren Vektor pEGFP transfiziert wurden (Abb. 11 B) und der pEGFP-AtCLIC transfizierten Zellen (Abb. 11 C) auf das Standardpulsprotokoll (Abb. 11A). Der Unterschied der Stromantworten der Kontrollzellen und der AtCLIC exprimierenden Zellen ist gut zu erkennen.

Die Kontrollzellen mit freiem GFP zeigten über den gesamten Spannungsbereich einen hohen Widerstand. Dies steht mit der aus der Literatur bekannten niedrigen Leitfähigkeit der HEK293 Zellen im Einklang (Yu et al. 1998). Endogene Kaliumströme der Zellen wurden zusätzlich durch Zugabe des Kaliumkanalblockers TEA als Kation geblockt.



**Abb. 11:** *Cell-attached*-Messungen an einer repräsentativen HEK293 pEGFP-AtCLIC Zelle und einer Kontrollzelle mit 140 mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

Standard Stufenprotokoll (A): Haltespannung 0 mV, Testspannungen in Stufen von 25 mV zwischen +125 und -125 mV; Stromantworten einer HEK293-Kontrollzellen, die nur mit dem leeren Vektor pEGFP transfiziert wurde (B) und einer HEK293 pEGFP-AtCLIC-Zelle (C); Strom/Spannungs-Kennlinien (D) der Kontrollzellen und der mit AtCLIC transfizierten Zellen; E: Vergleich der mittleren stationären Ströme von HEK pEGFP (n=11) und HEK pEGFP-AtCLIC (n=15)  $\pm$  Standardabweichung (SD) bei +125 mV und -125 mV; Badlösung a, Pipettenlösung c (siehe Punkt 2.6.2)

Ein großer Teil (ca. 70 %), der mit dem Fusionsprotein AtCLIC::GFP transfizierten Zellen zeigte eine zusätzliche Leitfähigkeit (11C) im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Bei den transfizierten Zellen flossen ein geringer Strom in Auswärtsrichtung und ein größerer in Einwärtsrichtung. Die Kinetik der Leitfähigkeit ist zweiphasig. Neben dem raschen instantanen Strom zeigt sich eine träge Komponente, die mit zunehmend negativer Spannung steigt.

Die Einwärtsrektifizierung der durch AtCLIC induzierten Leitfähigkeit zeigt sich auch deutlich in den I-V-Beziehungen (Abb. 11 D). Dabei kann man erkennen, dass bei Zellen, die AtCLIC exprimieren, bei einer Spannung von -125mV ein stationärer Strom von bis zu 380 pA über die Membran fließt; bei den Kontrollzellen fließt bei der gleichen Spannung nur ein sehr geringer Strom von ca. 20 pA.

Der Unterschied der auswärts- und einwärtsgerichteten Leitfähigkeit ist in Abbildung 11 E dargestellt. Bei einer Spannung von 125 mV fließt nur 75 pA Strom, wohingegen bei -125mV die 5fache Menge an Strom (380pA) abzulesen ist.

Das gemessene Umkehrpotential des Stromes liegt bei 0 mV. Da diese Messungen jedoch in der *Cell-attached*-Konfiguration durchgeführt wurden, muss zur Testspannung noch die freilaufende Membranspannung addiert werden. Diese beträgt ca. -40 mV

(gemessen  $-41 \pm 3$  mV). Damit liegt das Umkehrpotential etwa in dem Bereich, der für Chlorid-Anionen unter den gewählten Bedingungen (140 mM in Pipettenlösung, 5-20 mM in Cytoplasma) zu erwarten war (siehe Tabelle 3).

In Tabelle 3 sind die nach Nernst berechneten Umkehrpotentiale für die in der Lösung vorhandenen Ionen angegeben.

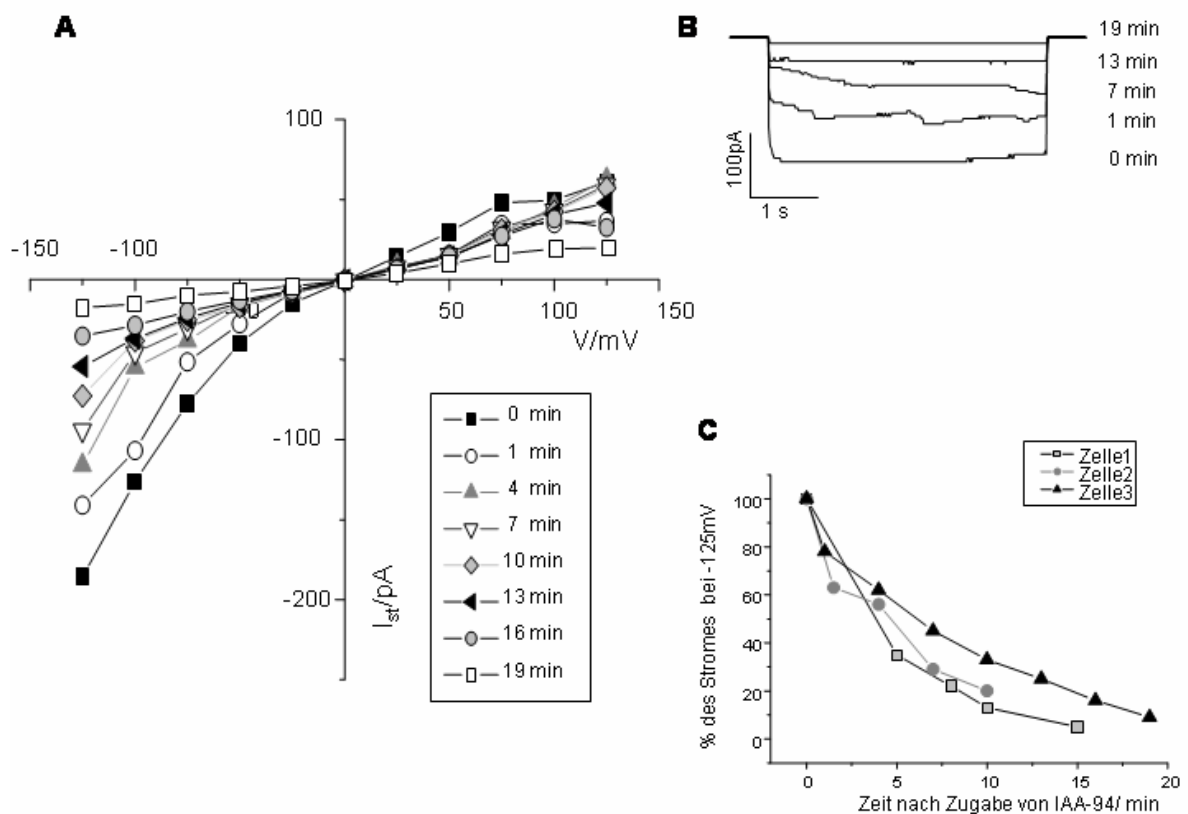
**Tab. 3:** Berechnete Umkehrpotentiale der relevanten Ionen für die benutzen Messlösungen. Die Potentiale wurden nach der Nernst-Gleichung berechnet.

|                  | Im Cytosol der Zelle<br>[mM] | In der Pipettenlösung<br>[mM] | Umkehrpotential<br>[mV] |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Cl <sup>-</sup>  | 15                           | 142,8 / 16,8                  | -59 / -2                |
| TEA <sup>+</sup> | 0                            | 140                           | + ∞                     |
| Mg <sup>2+</sup> | 2                            | 1                             | - 8,7                   |
| Ca <sup>+</sup>  | 0,001                        | 1,8                           | + 94                    |
| K <sup>+</sup>   | 100                          | 0                             | - ∞                     |

### 3.2.1.2 Inhibierung mit IAA-94

Die Kanäle der CLIC-Familie zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber dem Kanalblocker IAA-94 aus (Warton et al. 2002). Aus diesem Grunde wurde versucht, den Strom durch AtCLIC mit dieser spezifischen Substanz zu blockieren.

Dazu wurde transfizierten Zellen, die den zu untersuchenden Strom aufwiesen, 1 mM des Anionenkanalinhibitors über das Badmedium appliziert. Das Medium war auf einen leicht sauren pH von 6 eingestellt um zu gewährleisten, dass ein Teil des Inhibitors (pK 4,7) in protonierter Form durch die Plasmamembran diffundieren kann. Im Cytosol (pH 7,4) angelangt wird er dann wieder deprotoniert und kann so seine Wirkung entfalten. Nach Berechnungen mit Hilfe der Henderson-Hasselbach-Gleichung sollte sich unter den gewählten Bedingungen eine Konzentration von etwa 100  $\mu\text{M}$  der Substanz im Inneren der Zelle einstellen. Das entspricht der Konzentration, die laut Warton et al. (2002) bei CLIC1 eine deutliche Inhibierung hervorrief.



**Abb. 12:** Cell-attached-Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC Zellen unter Zugabe des Blockers IAA-94. A, Repräsentative Strom/Spannungs-Kennlinie der AtCLIC vermittelten Leitfähigkeit bei Vorhandensein des Anionenkanalinhibitors IAA-94. Die cytoplasmatische Konzentration betrug ca. 100  $\mu\text{M}$  IAA-94. Einzelne Spuren zeigen den zeitlichen Verlauf der Inhibierung an; B, Verlauf ausgewählter Spuren der originalen Stromantworten der in A gezeigten Zelle bei -125 mV nach 0, 1, 7, 13 und 19 Minuten nach Zugabe von IAA-94; C, Verlauf der Abnahme der Leitfähigkeit bei einer Spannung von -125 mV mit der Zeit. Berücksichtigt sind hier drei unterschiedliche Zellen. Badlösung b (mit 1 mM IAA-94); Pipettenlösung c

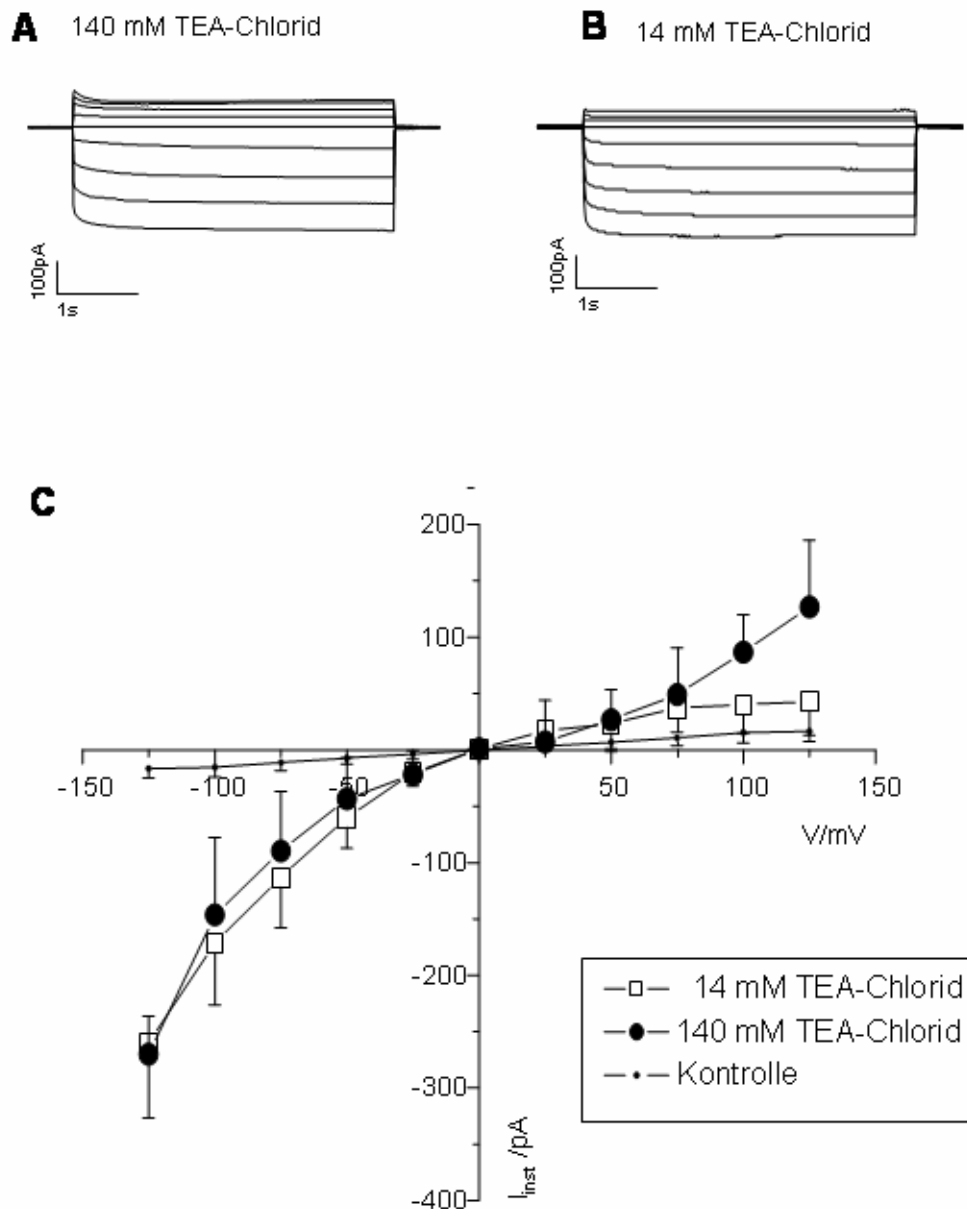
Der AtCLIC induzierte Strom in HEK293-Zellen konnte unter den beschriebenen Bedingungen deutlich inhibiert werden (siehe Abb. 12). Bei der gezeigten Messung war nach 10 min nur noch etwa 25 Prozent des Einwärtsstromes vorhanden. Der Auswärtsstrom nahm etwas schwächer ab; nach 10 min waren noch etwa 50 % des Ausgangsstromes (0 min) vorhanden. Die Leitfähigkeit nahm von 16 nS auf 9 ns ab. Diese Ergebnisse konnten durch drei weitere Versuche verifiziert werden.

### *3.2.1.3 Cell-attached-Messungen mit 14 mM TEA-Chlorid*

Beim beobachteten Anstieg der Leitfähigkeit bei AtCLIC exprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen könnte es sich theoretisch sowohl um Anionen als auch um Kationenströme handeln. Die "Auswärts"-Stromkomponente könnte durch Anionen-Influx (hier Chlorid-Einstrom) oder einen Kationen-Efflux zustande kommen.

Um dies zu überprüfen wurde die Chloridkonzentration im Pipettenmedium um den Faktor 10 (von 140 mM auf 14 mM) gesenkt. Wie in Abbildung 13 A und B zu sehen ist, war zu beobachten, dass die Einwärtsströme gleich blieben, die Auswärtsströme bei +125 mV aber um Faktor 4 (von 125 pA auf 30pA) vermindert wurden. Dies ist auch in der I-V-Beziehung der instantanen Ströme deutlich zu erkennen. Der verringerte instantane Strom in der Auswärtsrichtung bei 14 mM TEA ist noch größer als der Strom der Kontrollzellen, die mit dem leeren Vektor pEGFP transfiziert waren. Die Leitfähigkeit  $G_{out}$  nahm um den Faktor 5 (von 1,6 nS auf 0,3 nS) ab. Da sich der Ionen-Influx mit der Chlorid-Konzentration im Aussenmedium änderte, kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Strom von Anionen getragen wurde. Der Chlorid-Efflux blieb erwartungsgemäss davon unberührt. Des Weiteren war zu beobachten, dass es zu einer Verschiebung der Umkehrspannung zu positiveren Spannungen (ca. 25 mV) kommt. Unter den gewählten Versuchsbedingungen mit einer Verminderung der Chloridkonzentration um den Faktor 10 wäre nach Nernst eine Verschiebung um 60 mV zu erwarten gewesen.

Dies deutet darauf hin, dass nur eine geringe Selektivität für Chloridionen besteht.

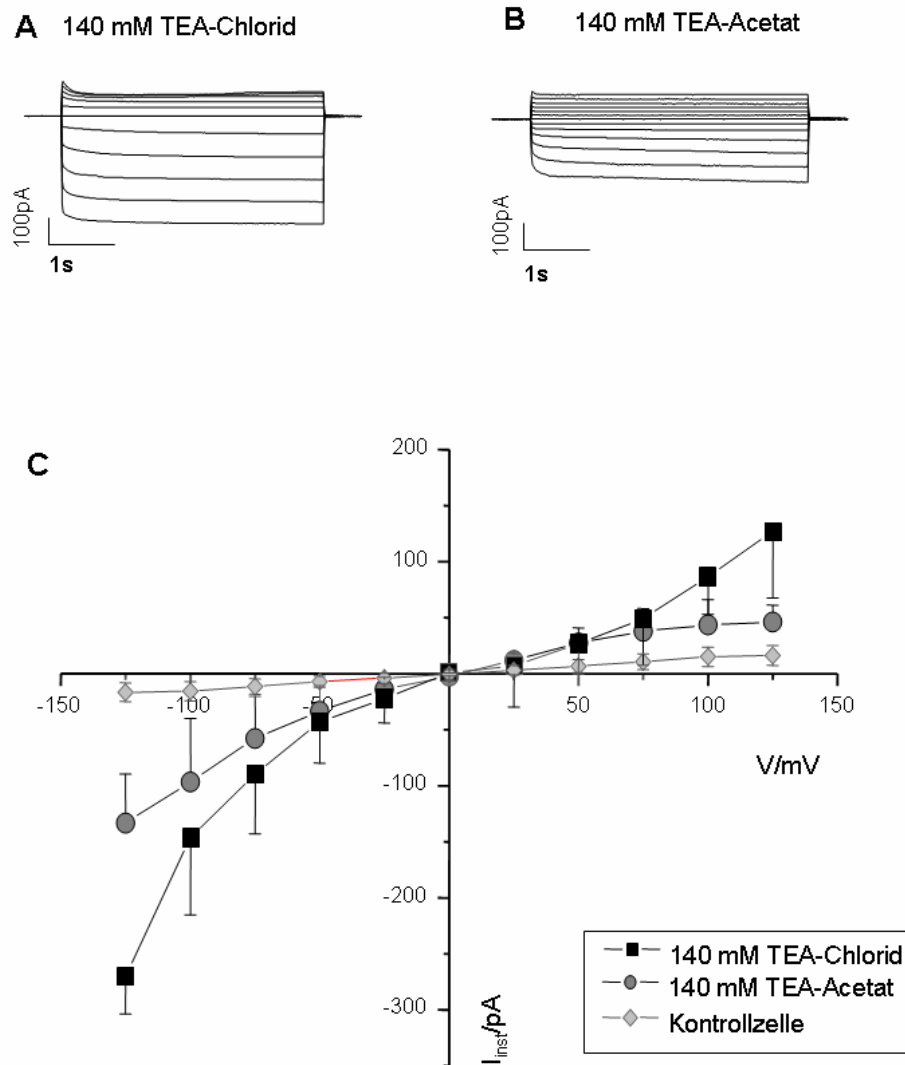


**Abb. 13.:** *Cell-attached*-Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC Zellen mit 14 bzw. 140 mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

Repräsentative Stromantwort einer HEK293 pEGFP-AtCLIC-Zelle, die mit 140 mM TEA-Chlorid (A) oder mit 14 mM TEA-Chlorid (B) in der Pipettenlösung gemessen wurde; C, Mittlere Strom/Spannungs-Kennlinien der AtCLIC vermittelten Leitfähigkeit an HEK293 pEGFP-AtCLIC-Zellen ( $\pm$  SD), gemessen mit Pipettenlösungen mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen: 14 mM ( $n=12$ ) und 140 mM TEA-Chlorid ( $n=15$ ). Die Linie mit den kleinen Symbolen zeigt die I/V-Kurve der Kontrollzellen (transfiziert mit dem leeren Vektor pEGFP) mit 140 mM Chlorid gemessen, an ( $n=11$ ). Badlösung a, Pipettenlösung c (mit 140 mM TEA-Chlorid) bzw. d (mit 14 mM TEA-Chlorid).

### 3.2.1.4 Cell-attached-Messungen mit 140 mM TEA-Acetat

Um die Selektivität des Anionenkanals AtCLIC für Chloridionen zu untersuchen, wurde das Chlorid gegen die gleiche Menge eines viel größeren Anions, Acetat, ausgetauscht. Dieses sollte aufgrund seiner Grösse schwerer durch den Kanal in die Zelle einfließen können. Als Kation diente weiterhin TEA, um die Blockierung der Kaliumkanäle zu gewährleisten.



**Abb. 14:** Cell-attached-Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC Zellen mit unterschiedlichen Anionen (Acetat und Chlorid) in der Pipettenlösung.

Repräsentative Stromantwort einer HEK293 pEGFP-ATCLIC-Zelle, die mit 140 mM TEA-Chlorid (A) oder mit 140 mM TEA-Acetat (B) in der Pipettenlösung gemessen wurde; C, Mittlere Strom/Spannungs-Kennlinien ( $\pm$  SD) der AtCLIC vermittelten Leitfähigkeit von HEK293 pEGFP-N2-AtCLIC-Zellen, gemessen mit unterschiedlichen Anionen im Pipettenmedium. Außerdem ist die Kennlinie der Kontrollzellen (transfiziert mit dem leeren Vektor pEGFP) mit 140 mM Chlorid gemessen, gezeigt. Badlösung a, Pipettenlösung c (mit 140 mM TEA-Chlorid) bzw. e (mit 140 mM TEA-Acetat).

Wie in Abbildung 14 zu sehen, ist die Stromantwort der HEK293 Zellen, die mit pEGFP-AtCLIC transfiziert waren, mit TEA-Acetat (Abb. 14 B) in der Messlösung geringer als die bei TEA-Chlorid (Abb. 14 A).

Auch in der I-V-Beziehung (Abb. 14C) ist zu erkennen, dass nur wenige Acetat-Ionen in die Zelle einfließen. Der Ionen-Influx ist im Vergleich zu den Messungen mit TEA-Chlorid bei der Spannung 125 mV um den Faktor 5 kleiner. Er übertrifft jedoch das Niveau der Kontrollzellen, die mit dem leeren Vektor pEGFP transfiziert waren.

Der Einwärtsstrom bei TEA-Acetat in der Messlösung ist im Vergleich zu Messungen mit TEA-Chlorid bei einer Spannung von -125 mV um die Hälfte verringert. Da sich in der Zelle kein Acetat befindet, handelt es sich bei diesem Strom um Efflux von Chloridionen. Die Tatsache, dass auch dieser verringert ist, könnte auf eine Blockierung der Kanäle durch das grosse Anion Acetat zurückzuführen sein.

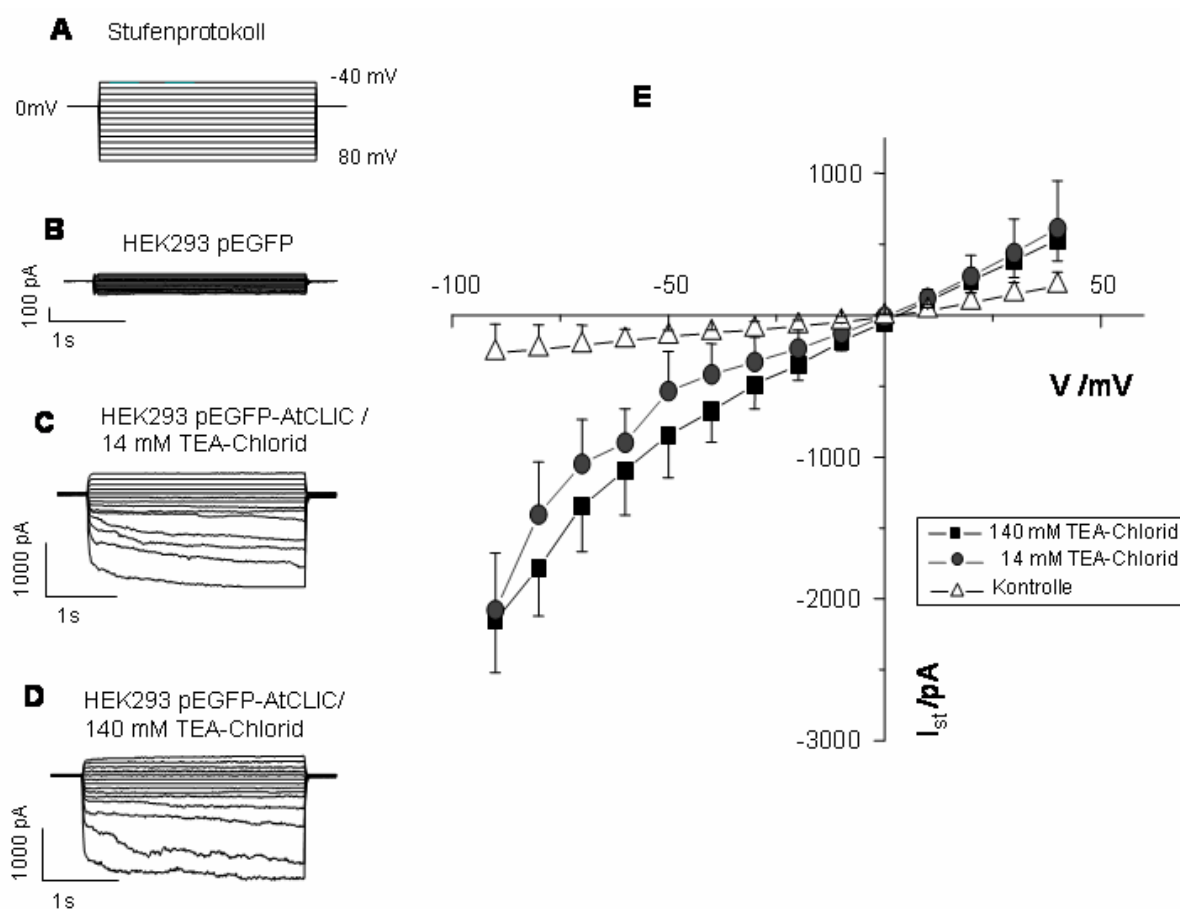
#### 3.2.1.5 Whole-cell Messungen mit 140 mM TEA-Chlorid

Der Durchmesser des Membranflecks unter der Pipette, dessen Proteine bei den *Cell-attached*-Messungen gemessen werden, beträgt ca. 1  $\mu\text{m}$ . In dieser Anordnung werden nur die Proteine gemessen, die sich auf diesem Membranareal befinden. Bei *Whole-cell*-Messungen hingegen werden alle Kanalproteine, die sich in der Plasmamembran der Zelle befinden, gleichzeitig gemessen.

Auch in der *Whole-cell*-Konfiguration wurde ein Stufenprotokoll genutzt, mit dessen Hilfe die Zellen von einer Haltspannung von 0 mV in Schritten von 10 mV zu Testspannungen zwischen -40 mV und 80 mV geclamt wurden (Abb. 15 A).

Diese Messungen wurden mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen (14 mM und 140 mM TEA-Chlorid) in der Pipettenlösung an HEK293 pEGFP-ATCLIC durchgeführt. Als Kontrollen dienten HEK293 Zellen, die mit dem leeren Vektor pEGFP transfiziert waren (Abb. 15 B). Die Kontrollzellen HEK293 pEGFP zeigten über den gesamten Spannungsbereich einen geringen, mit der Spannung leicht zunehmenden Strom von bis zu 500 pA bei 80 mV. Die AtCLIC exprimierenden Zellen zeigten eine AtCLIC vermittelte Leitfähigkeit, die mit der Spannung stark zunahm und bei 80 mV bis zu 2200 pA betrug (Abb. 15 E). Die Kinetik der Stromantwort war mit 14 mM (Abb. 15 C) und 140 mM (Abb. 15 D) TEA-Chlorid in der Pipettenlösung gleich. Auch die Höhe des Stromes ( $I_{140}$  bis zu 2200 pA,  $I_{14}$  bis zu 2000 pA) und die Leitfähigkeit ( $G_{14}=9$  nS,  $G_{140}=15$  nS) waren bei 140mM und 14mM TEA-Chlorid im Pipettenmedium sehr ähnlich.

Die Kennlinien der *Whole-cell*-Messungen ähneln stark derjenigen aus den *Cell-attached*-Messungen: Die Stromantworten beider Messkonfigurationen zeigten eine zweiphasige Kinetik, die aus einer sehr raschen Komponente und einer trägen, zeitabhängigen Komponente besteht. Die I-V-Kennlinien zeigen in beiden Fällen eine Einwärtsrektifizierung. Bei der Verringerung der Konzentration der Chloridionen von 140mM auf 14mM wäre eine Verschiebung des Umkehrpotentials um 60mV zu erwarten gewesen. Die Tatsache, dass trotz dieser Konzentrationsänderung keine Verschiebung zu finden ist, spricht dafür, dass der Kanal AtCLIC nicht selektiv für Chlorid ist.

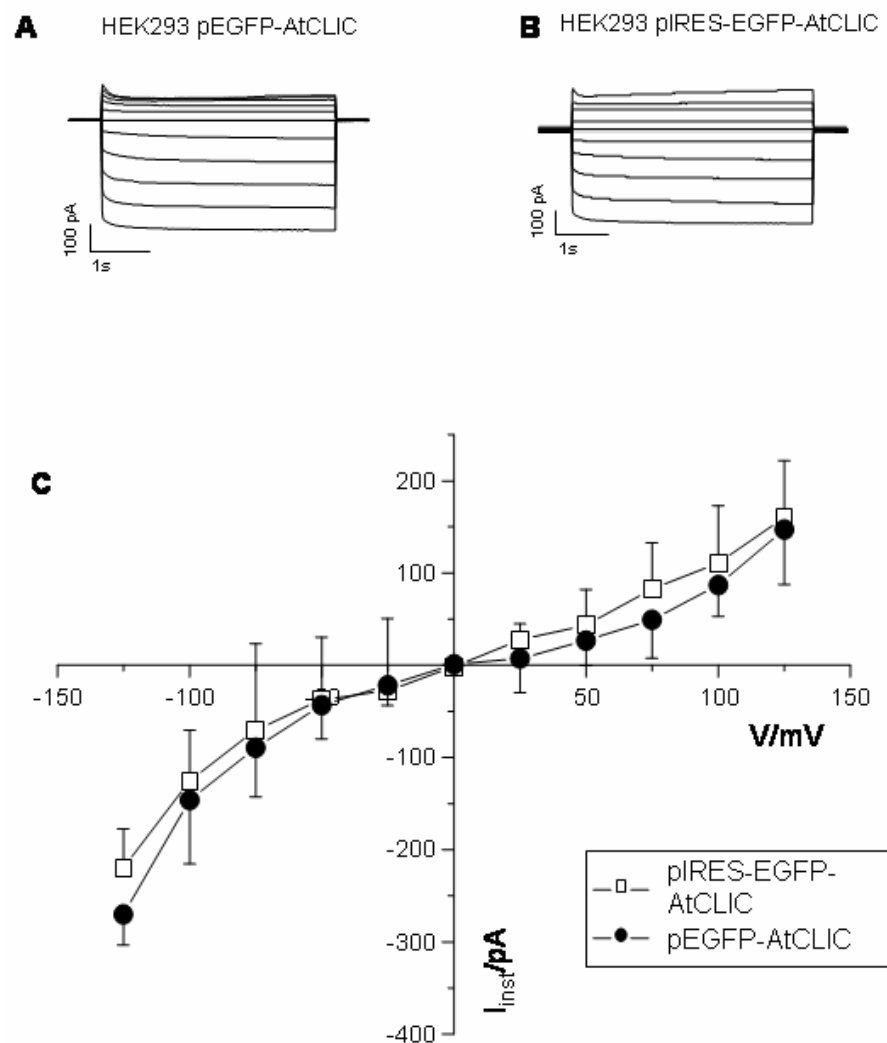


**Abb. 15:** *Whole-cell*-Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC Zellen mit 14 mM bzw. 140 mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

A, Stufenprotokoll. Haltespannung 0 mV, Testspannungen in Stufen von 10 mV zwischen -40 und 80 mV; Stromantwort von HEK293-Kontrollzellen, die nur mit dem leeren Vektor pEGFP transfiziert waren (B); Stromantworten einer repräsentativen HEK293 pEGFP-AtCLIC-Zelle, die mit 14 mM TEA-Chlorid (C) oder mit 140 mM TEA-Chlorid (D) in der Pipettenlösung gemessen wurden; E, Mittlere Strom/Spannungs-Kennlinien der AtCLIC vermittelten Leitfähigkeit von HEK293 pEGFP-N2-AtCLIC-Zellen ( $\pm$ SD). Gemessen wurden HEK293-Zellen, die mit pEGFP-AtCLIC und Kontrollzellen ( $n=17$ ), die mit dem leeren Vektor transfiziert waren. Die Pipettenlösung enthielt 14 mM ( $n=5$ ) bzw. 140 mM ( $n=7$ ) TEA-Chlorid. Badlösung a, Pipettenlösung g (mit 140 mM TEA-Chlorid) bzw. f (mit 14 mM TEA-Chlorid)

### 3.2.2 Cell-attached-Messungen an HEK293 pIRES-EGFP-AtCLIC

Um neben den Kontrollzellen mit freiem GFP einen weiteren Nachweis zu haben, dass es sich bei der beobachteten Zunahme der Leitfähigkeit nicht um ein Artefakt des Vektors oder eine Reaktion auf ein fehlgefaltetes Protein handelt, wurde das Gen für AtCLIC in einen weiteren Säugervektor kloniert. Es handelte sich dabei um pIRES-EGFP, einen bicystronischen Vektor. Durch dessen speziellen Aufbau werden die auf dem Vektor vorhandenen Gene (AtCLIC und GFP) zusammen abgelesen, aber einzeln exprimiert.



**Abb. 16:** Cell-attached Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC und HEK293 pIRES-AtCLIC Zellen mit 140 mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung. Repräsentative Stromantworten einer HEK293-Zelle, die mit pEGFP-ATCLIC (A) oder mit pIRES-EGFP-AtCLIC (B) transfiziert waren; C, : Mittlere Strom/Spannungs-Kennlinien ( $\pm$ SD) von HEK293-Zellen, die mit pIRES-EGFP-AtCLIC (n=9) oder pEGFP-ATCLIC (n=15) transfiziert waren. Badlösung a, Pipettenlösung c.

Dadurch ist in transfizierten Zellen GFP als Marker für die Transfektion vorhanden, jedoch nicht mit dem Zielprotein AtCLIC fusioniert.

Dies hat den Vorteil, dass eine mögliche sterische Behinderung der korrekten Faltung durch die Fusion mit dem doch sehr grossen Protein GFP vermieden wird. Dieser Vektor wurde dann in HEK293-Zellen gebracht und die Leitfähigkeit dieser Zellen gemessen.

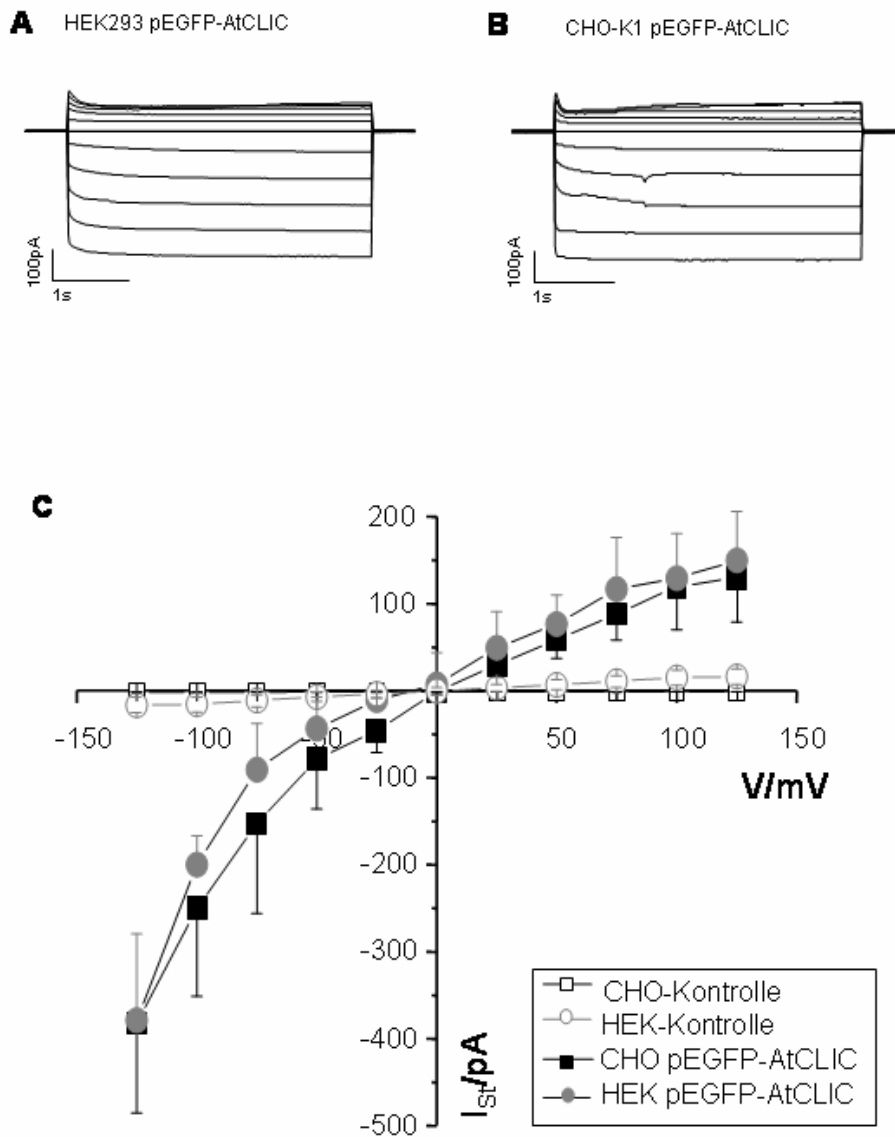
Dabei kann, wie in Abbildung 16 gezeigt ist, beobachtet werden, dass die Strom-Spannungskennlinien, die bei der Transfektion mit pIRES-EGFP-AtCLIC entstehen, denen mit pEGFP-AtCLIC sehr ähnlich sind. Man kann also ausschließen, dass das Protein AtCLIC durch die Fusion mit GFP eine Veränderung in seiner Sekundärstruktur und damit der Funktion erfährt.

### *3.2.3 Cell-attached-Messungen an CHO-K1 pEGFP-AtCLIC*

Bei der bisher gezeigten Erhöhung der Ströme in AtCLIC exprimierenden Zellen könnte es sich neben der AtCLIC vermittelten Leitfähigkeit auch um Verstärkung endogene Ströme der HEK293-Zellen handeln. Überexpression eines heterologen Proteins kann zu einer Stimulation von endogen vorhandenen Kanälen führen. Allerdings wurde eine Leitfähigkeitsänderung, wie sie mit AtCLIC zu sehen ist, bei HEK293-Zellen mit noch keinem anderen Protein beobachtet, obwohl in unserem Labor zahlreiche Kanäle in HEK293-Zellen exprimiert und untersucht worden sind.

Um die Möglichkeit eines Zelllinien-spezifischen Artefakts der HEK-Zellen auszuschließen, wurde das Fusionsprotein AtCLIC::GFP auch in CHO-K1-Zellen exprimiert. Handelt es sich um eine Verstärkung von endogenen Strömen, so sollten diese aufgrund der verschiedenen Zellsysteme unterschiedlich ausgeprägt sein. Wird die Leitfähigkeit durch AtCLIC direkt verursacht, so sollten in beiden Zellsystemen die gleichen Ströme detektierbar sein.

Die Messungen zeigen, dass AtCLIC transfizierte CHO-K1-Zellen Ströme zeigen, die hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit und Kinetik den Strömen in transfizierten HEK-Zellen sehr ähnlich sind (siehe Abbildung 17). Es scheint sich hier also offenbar um AtCLIC induzierte Ströme zu handeln.



**Abb. 17:** Cell-attached-Messungen an HEK293 pEGFP-AtCLIC und CHO-K1 pEGFP-AtCLIC Zellen mit 140 mM TEA-Chlorid in der Pipettenlösung.

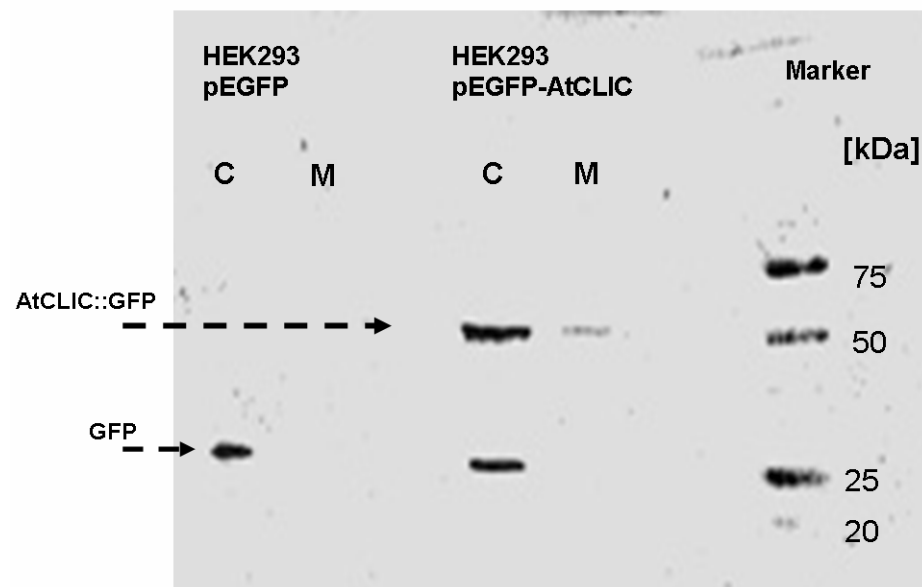
Repräsentative Stromantworten einer HEK293-Zelle (A) und einer CHO-K1-Zelle (B), die mit pEGFP-ATCLIC transfiziert waren; C, Mittlere Strom/Spannungs-Kennlinien ( $\pm$ SD) von HEK293- und CHO-K1-Zellen die mit pEGFP-AtCLIC oder dem leeren Vektor (Kontrollen) transfiziert wurden. Badlösung a, Pipettenlösung c.

### 3.3 Proteinbiochemische Detektion von AtCLIC in HEK293-Zellen

Um das Vorhandensein des Proteins AtCLIC in der Zelle nachzuweisen und dessen grobe zelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurde die Proteinverteilung mit Hilfe eines Western-Blots untersucht. Dazu wurden die Plasmide pEGFP-AtCLIC und pEGFP in HEK293-Zellen eingebracht. Die Zellen mit pEGFP-AtCLIC exprimierten das Fusionsprotein AtCLIC::GFP, die mit dem leeren Vektor pEGFP dagegen nur GFP.

Durch differenzielle Zentrifugation wurde die cytosolische Fraktion, die die löslichen Proteine enthält, von der Membranfraktion mit den membrangebundenen Proteinen getrennt. Beide Fraktionen (cytosolische und Membran-Fraktion) wurden über SDS-Elektrophorese aufgetrennt.

Der nachfolgende Western-Blot (Abb. 18) mit Anti-GFP-Antikörpern zeigte bei Konstrukt pEGFP-AtCLIC eine deutliche Kreuzreaktion mit freiem GFP (27kDa) und einem Protein, dessen apparente Molmasse mit der berechneten Molmasse des AtCLIC::GFP (50,5kDa) übereinstimmte. Der GFP-Antikörper erkannte das Fusionsprotein sowohl in der cytosolischen, als auch in der Membranfraktion, was den Schluss zulässt, dass das Protein, wie auch für CLIC1 beschrieben, sowohl in gelöster als auch in membranständiger Form vorliegt.



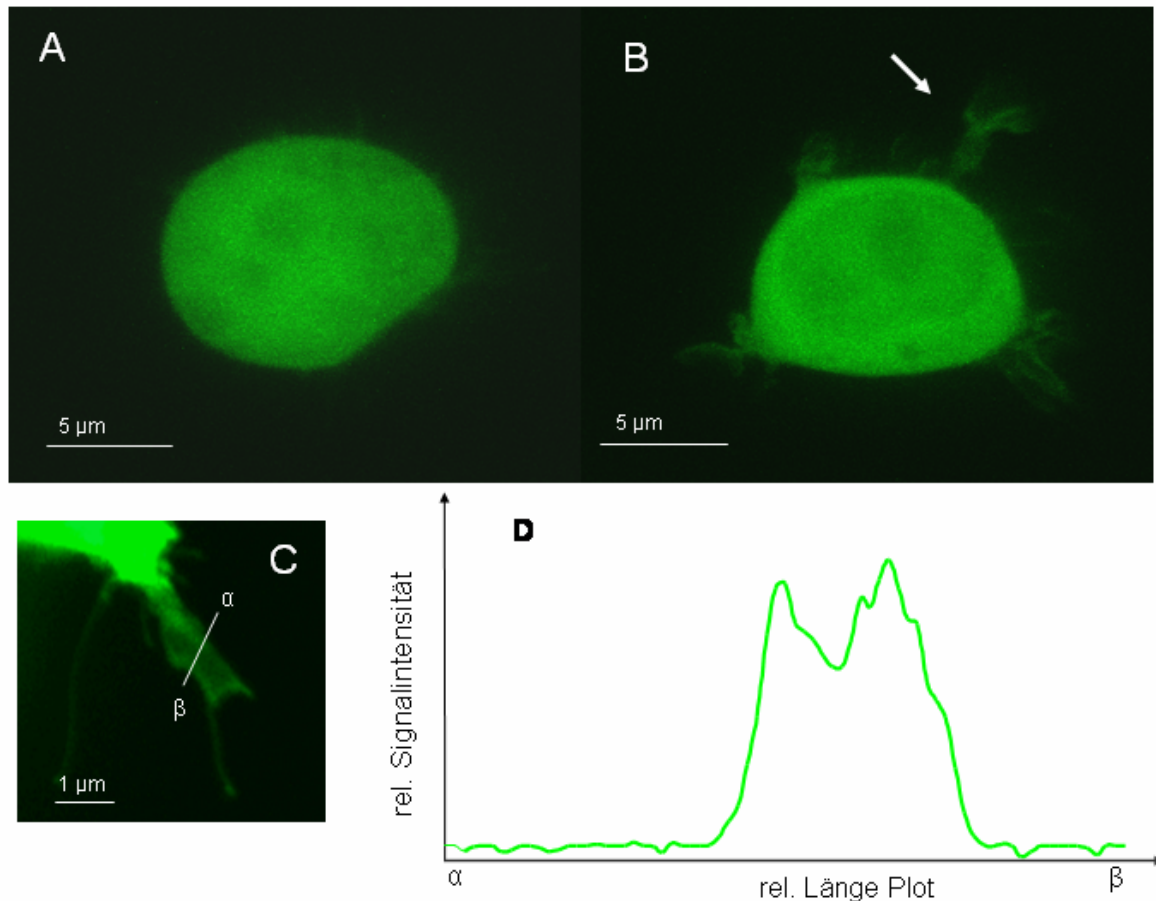
**Abb. 18:** Western-Blot der cytosolischen Fraktion (C) und der Membranfraktion (M) aus HEK293 Zellen, die mit den Konstrukten pEGFP (freies cytosolisches GFP) und pEGFP-AtCLIC (Fusionsprotein AtCLIC::GFP) transfiziert wurden. Nachweis mit GFP-Antikörper.

Man kann auch erkennen, dass ein recht grosser Teil des Fusionsproteins in der Zelle in die Einzelproteine gespalten wurde. In den Fraktionen der Zellen, die nur GFP exprimierten, ist eine Bande in der Grösse des freien GFPs in der cytosolischen Fraktion zu erkennen, in der Membran erwartungsgemäß nicht.

### **3.4 Zelluläre Lokalisation von AtCLIC in HEK293-Zellen**

#### **3.4.1 Lokalisation mit GFP**

Eine weitere Untersuchung zur Membranlokalisierung des Fusionsproteins AtCLIC::GFP wurde mit Hilfe des Confokalen Laserscanning Mikroskops (CLSM) gemacht. Die Abbildungen 18A und B zeigen den Vergleich zweier HEK293-Zellen, wovon die eine freies GFP, die andere AtCLIC::GFP exprimierte. Bei beiden Zellen ist der Zellkörper stark mit GFP markiert, was bedeutet, dass sowohl das GFP als auch ein grosser Teil des Fusionsproteins gelöst im Cytosol vorliegen. Durch die starke Fluoreszenz ist es nicht möglich, subzelluläre Strukturen zu erkennen. Allerdings zeigt sich bei Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren, ein markanter Unterschied zu den Kontrollzellen mit freiem GFP. Bei Zellen mit dem Fusionsprotein sind die Filopodien regelmäßig und stark markiert. Da Filopodien membranöse Strukturen mit sehr wenig Cytosol sind, ist das von uns berechnete Verhältnis von Membran zu Cytosol höher ( $PM/Cyt=2,25$ ) als beim Zellkörper ( $PM/Cyt=0,15$ ). Dieses höhere Verhältnis zugunsten der Plasmamembran ist besser für eine Lokalisation geeignet, da im Zellkörper die Fluorophore im Cytosol die Fluoreszenz derjenigen überstrahlen, die in der Plasmamembran oder intrazellulären Membranen sind. Nach Berechnungen, die diese Verhältnisse berücksichtigen, ist ein einzelnes GFP-Molekül in den Filopodien 15fach besser zu detektieren, als in der Plasmamembran des Zellkörpers. Die Membranlokalisierung des Fusionsproteins wird weiterhin durch Ergebnisse aus Intensitätsplots entlang des Durchschnitts durch ein Filopodium bestätigt. Die Fluoreszenz in Filopodien zeigt eine zweigipfelige Verteilung (Abb. 19D), deren Maxima wahrscheinlich mit der Lage der Plasmamembran zusammen fallen. Man kann also aufgrund der markierten Filopodien schliessen, dass, wie schon auf Proteinebene gesehen, zumindest ein Teil des Fusionsproteins AtCLIC::GFP in der Membran vorhanden ist.



**Abb. 19:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HEK293-Zellen, die cytosolisches GFP oder das Fusionsprotein AtCLIC::GFP exprimieren.

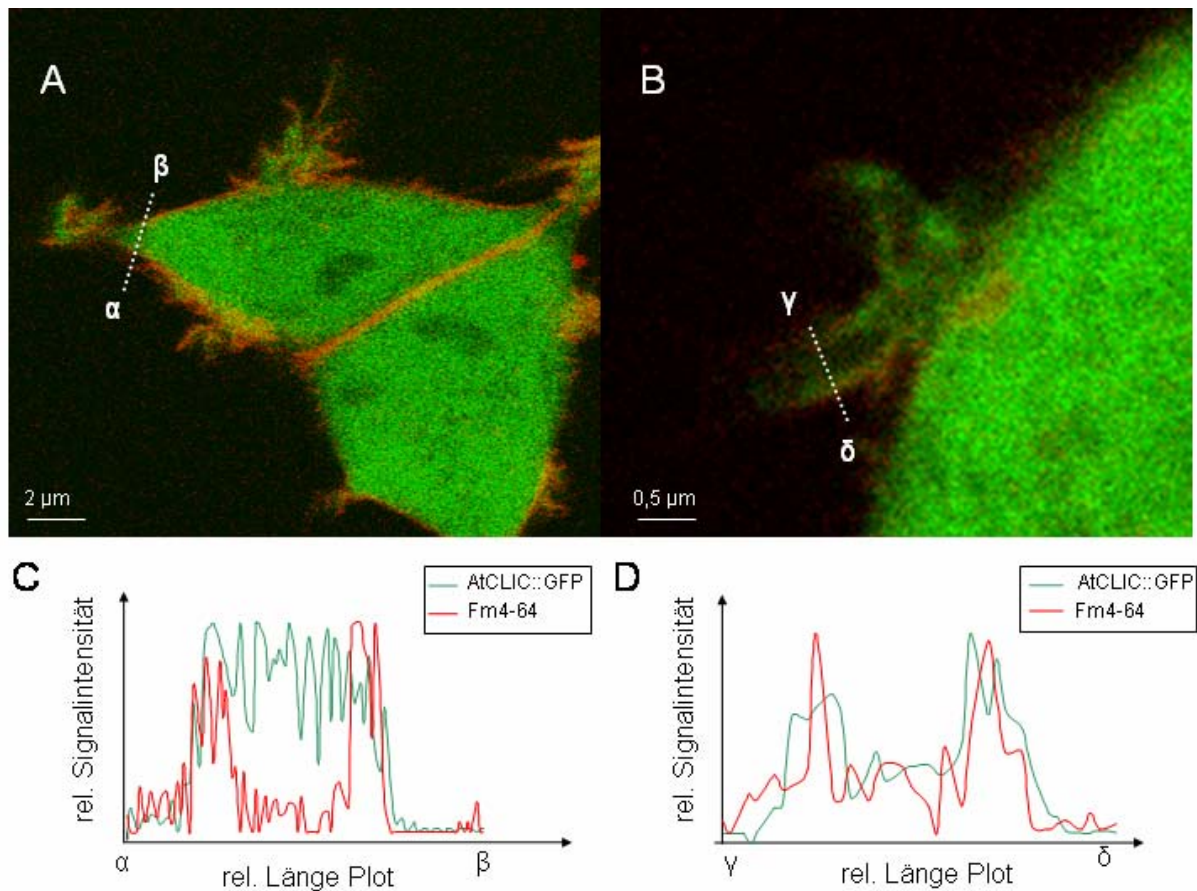
A, Zelle, die mit pEGFP transfiziert wurde (cytosolisches GFP); B, Zelle, die mit pEGFP-AtCLIC transfiziert wurde (Fusionsprotein AtCLIC::GFP), der Pfeil zeigt die Lage der Filopodien an;

C, Vergrößerung eines Filopodiums. Die Markierung zeigt den Verlauf des Intensitätsplotes ( $\alpha - \beta$ ) in D an;

### 3.4.2 Colokalisation von GFP und Fm4-64

Um zu zeigen, dass es sich bei den Orten mit hohem GFP-Gehalt wirklich um die Zellmembranen handelt, wurde eine weitere Versuchsanordnung gewählt. Zu HEK293-Zellen, die das Fusionsprotein AtCLIC::GFP exprimierten, wurde der Styrylfarbstoff Fm4-64 in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gegeben. Dieser Farbstoff zeigt im wässrigen Milieu keine Fluoreszenz. Nach Insertion in die Membran ist er durch starken Gewinn an Fluoreszenz gut zu sehen (Betz et al. 1992). Deshalb kann er als Membranmarker und zur Colokalisation mit GFP dienen (Meckel et al. 2004). Bei den Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass sich das Grün des GFP und das Rot des Fm4-64 in der Zellmembran des Zellkörpers und an den Filopodien überlagerte (Abb. 20A und B). Auch Intensitätsprofile durch die genannten Bereiche zeigten eine deutliche Colokalisation der beiden Fluoreszenzen (Abb. 20C und D).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestärken die Vermutung, dass AtCLIC zum Teil in der Membran lokalisiert ist.



**Abb.20:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer HEK293 pEGFP-AtCLIC Zelle, die mit dem Styrylfärbstoff Fm4-64 comarkiert wurden und deren Intensitätsplots.

A, HEK293 pEGFP-AtCLIC Zelle, Overlay des roten (FM4-64) und grünen (GFP) Kanals; B zeigt die Vergrößerung eines einzelnen Filopodiums der Zelle in A. Die Linien ( $\alpha - \beta / \gamma - \delta$ ) zeigen den Verlauf der Intensitätsplots in C und D an; C, Intensitätsplot durch die Zelle in A; D, Intensitätsplot durch Filopodium in B

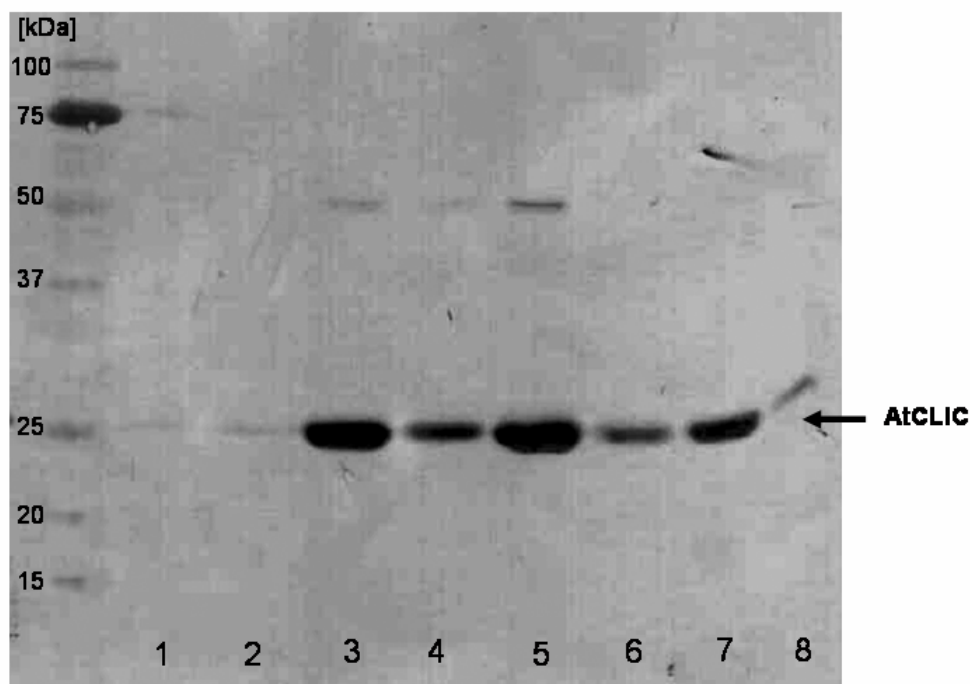
### 3.5 Aufreinigung von AtCLIC aus *Escherichia coli*

Zur Expression und Aufreinigung des Proteins AtCLIC wurde das codierende Gen in den *E.coli*-Expressionsvektor pQE31 kloniert. Dieser Expressionsvektor trägt die Codierungssequenz für einen His-Tag, der für die Aufreinigung des Proteins benötigt wird. Mit diesem Konstrukt wurde dann der Expressionsorganismus JM101 transformiert. Die Aufreinigung geschah in zwei getrennten Ansätzen, nativ und denaturierend (siehe Material und Methoden). Bei beiden Vorgehensweisen wurden die Zellmembranen aufgelöst und die löslichen Proteine aus dem Cytosol wurden zusammen mit den gelösten membranständigen

Proteinen von den Membranresten getrennt. Aus den Membranresten wurden dann mit Hilfe einer denaturierenden Behandlung mit dem Detergenz Triton X100 die Proteine solubilisiert. Alle Schritte wurden zweimal durchgeführt. Die 8 Fraktionen wurden über ein SDS-PAGE-Gel getrennt und auf einer Membran geblottet. Das Protein wurde mit einem Anti-His-Antikörper sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, konnten mit dem nativen Ansatz nur Spuren des Proteins aufgereinigt werden. Der grössere Teil befand sich noch in den Resten der Membran und konnte mit dem Detergenz Triton X100 denaturierend herausgelöst werden.

Die Aufreinigung mit denaturierenden Lösungen dagegen zeigte schon in der cytosolischen Fraktion Proteinbanden in der Grösse des Monomers und weitere Proteinbanden, deren apparente Molmasse genau das Doppelte der AtCLIC-Bande zeigte. Ein Teil des Proteins blieb auch hier im Pellet zurück und konnte mit Triton X100 herausgelöst werden.



**Abb. 21:** Western-Blot mit Proteinisolation aus AtCLIC transformierten *E.coli*-Bakterien. Eluat (Cytosol. Fraktion und gelöste Membranproteine) der nativen Präparation (1 & 2), Eluat (Cytosol. Fraktion und gelöste Membranproteine) der denaturierenden Präparation (3 & 4), Eluat der Membranreste der nativen Präparation nach Behandlung mit Triton X100 (5 & 6), Eluat der Membranreste der denaturierenden Präparation nach Behandlung mit Triton X100 (7 & 8).

Man kann also sagen, dass im heterologen, prokaryontischen Expressionssystem *E.coli*-Zellen der grösste Teil des Proteins membrangebunden vorliegt und nicht, wie bei den eukaryontischen HEK293-Zellen, im Cytosol. Die Identität der Proteine in den markierten Banden wurde durch MALDI-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Protein mit der apparenten Molmasse von 50 kDa nicht das Dimer von AtCLIC darstellt. Dass die Proteinbande bei 25 kDa aus AtCLIC besteht, konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden.

#### **4.Diskussion:**

##### ***Struktur und Sequenzvergleiche zeigen Ähnlichkeiten zwischen AtCLIC und CLIC1***

Mitglieder der Glutathion-S-Transferase (GST) -Superfamilie, zu der auch das untersuchte Protein AtCLIC gehört, haben eine sehr grosse funktionelle Diversität. Neben ihren Funktionen in der Detoxifikation der Zelle spielen sie ebenfalls eine Rolle beim Transport einiger Stoffe und fungieren außerdem als Peroxidasen, Isomerasen, Carrierproteine, Regulatoren und Inhibitoren. Auch eine Funktion als NO-Carrier und Modulator von Calciumkanälen (Ryanodin Rezeptoren) hat man nachgewiesen (zusammengefasst in Cromer et al. 2002). Bei einer solchen Diversität der Funktionen, die GSTs ausüben können, und der Menge an konstitutiv exprimiertem Protein (10 % der Proteinmenge im Cytosol) wäre es durchaus nicht erstaunlich, wenn auch die Funktion als Ionenkanal darunter wäre. Durchmusterungen des Genoms von *A. thaliana* zeigen, dass es mehrere Gene aus der GST-Superfamilie gibt, die Ähnlichkeiten mit den tierischen CLIC-Kanälen aufweisen. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte AtCLIC ist eines von ihnen. Bei der Untersuchung der Sequenz von AtCLIC findet man konservierte Schlüsseldomänen die AtCLIC, ebenso wie alle Mitglieder der GST- und der CLIC-Familie besitzt. Diese, für die Funktion der Proteine wichtigen (Cromer et al. 2002) Domänen sind:

- cis-Prolin Domäne, die die richtige Geometrie der Bindestelle garantiert,
- eine Asparaginsäure, für N-Terminale Helix Capping Interaktion,
- ein Glycin mit strukturellen Funktionen,
- Cystein-Prolin-Phenylalanin-Motiv das das aktive Cystein oder Serin der Glutathion Bindestelle beinhaltet,
- Ser/Thr am terminalen Ende der Helix 6, das die Thiolat-Form des gebundenen GSH stabilisiert.

Im genannten konservierten Cystein-Prolin-Phenylalanin-Motiv besitzen die pflanzlichen DHARs, darunter AtCLIC, im Gegensatz zu den anderen pflanzlichen GSTs ein Cystein statt eines Serins. Diese strukturelle Besonderheit weisen nur noch die tierischen CLICs und die Mitglieder der Omega GSTs auf (Dixon et al. 2002b).

Bei einem direkten Vergleich zwischen AtCLIC aus *A. thaliana* und CLIC1 aus *H. sapiens* findet man neben diesen konservierten Domänen noch weitere Gemeinsamkeiten, wie beispielsweise eine prolinreiche Region in der Mitte der Proteine. Auch eine hydrophobe Region, die vermutlich bei CLIC1 die Pore formt, ist bei AtCLIC zu finden.

Andere Strukturen, deren Funktionen bei CLIC1 noch diskutiert werden, fehlen bei AtCLIC gänzlich. Zu nennen ist dabei beispielsweise der negative Loop (siehe Abb. 1: Pro147-Gln164, zwischen  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ ), dessen Funktionen beim Einbau der CLICs in die Plasmamembran diskutiert wird. Obwohl dieser eine wichtige Struktur zu sein scheint, ist er auch innerhalb der Familie der CLICs nicht überall voll zu finden, sondern teilweise bis auf 3 Aminosäuren verkürzt (Cromer et al. 2002).

### ***AtCLIC zeigt Homologien zu der Familie der tierischen CLICs und den pflanzlichen GSTs***

Bei Sequenzvergleichen über das ganze Protein findet man zwischen AtCLIC und CLIC1 61 % Ähnlichkeit bzw. 27 % Identität. Die angegebene Identität von 27 % scheint nicht sehr hoch zu sein, aber auch in der Familie der tierischen CLICs ist die Heterogenität zwischen den einzelnen Mitgliedern sehr groß. So beträgt die Identität zwischen CLIC1 und CLIC5 aus dem Menschen beispielsweise auch nur 50 %. Vergleicht man CLICs aus Vertebraten wie das humane CLIC1 mit denen aus Invertebraten wie ECX-4 aus *Caenorhabditis elegans*, so beträgt die Identität sogar nur noch 17 %. Innerhalb der Familie der GSTs ist ebenfalls eine Homologie von nur 10-30 % die Regel (Sheehan et al. 2001).

Als nächste verwandte Proteine der CLICs gelten die pflanzlichen GSH-abhängigen Dehydroascorbat Reduktasen (DHAR). Unter diesen gelten die GSTs aus *Zea mays* L. mit 21 % Identität als die nächsten CLIC-Verwandten mit bekannter Struktur (Harrop et al. 2001). Das hier untersuchte Protein AtCLIC zeigt sogar noch eine etwas höhere Identität zu CLIC1. Zu zwei weiteren humanen Vertretern, CLIC2 und p64, hat AtCLIC sogar 25 % Identität. Die geringste Homologie zu einem Vertreter der humanen CLICs hat AtCLIC zu CLIC6 mit 21 %. Dieser Wert gibt gleichzeitig auch die höchste Homologie an, die AtCLIC zu einem Vertreter der GSTs aus *A. thaliana* hat (siehe Tabelle 2).

Das pflanzliche AtCLIC aus *A. thaliana* zeigt also eine höhere Homologie zu den CLIC-Proteinen aus dem Menschen, als zu den anderen GSTs aus *A. thaliana*. Dies spricht für eine sehr nahe Verwandtschaft und so eine mögliche Kanalfunktion dieses Proteins.

Im phylogenetischen Baum der im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist (Abb. 9) kann man erkennen, dass, neben den anderen drei DHARs aus *A. thaliana*, sowohl vier Vertreter der GSTs aus *Arabidopsis* als auch zwei der menschlichen CLICs zu den sehr nahe verwandten Proteinen von AtCLIC gerechnet werden können. Bei Untersuchungen der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den DHARs und den Vertretern der anderen pflanzlichen und tierischen GST-Klassen kamen Dixon et al. (2002) zu einem sehr ähnlichen Ergebnis. Die

Daten der vorliegenden Arbeit geben daher einen Hinweis darauf, dass es einen gemeinsamen Vorfahren der pflanzlichen DHARs und tierischen GSTs geben könnte.

Als einer der größten Unterschiede zwischen der GST- und der CLIC-Familie wurde lange angeführt, dass CLICs als Monomere vorliegen, GSTs dagegen Dimere bilden. Allerdings wurden in zwei Fällen auch monomere GSTs gefunden, eine Maleylacetoacetat Isomerase aus der Klasse der Zeta GSTs (Polekhina et al. 2001) und die Tetrachlorohydroquinon Dehalogenase (McCarthy et al. 1996). Die GSTs der Beta und Sigma Klasse liegen zwar dimerisiert vor, jedoch ist die Dimerverbindung extrem polar. Das gilt als Überbleibsel der Entwicklung der GSTs aus den monomeren Vorfahren der Thioredoxin-Superfamilie (Cromer et al. 2002). Nach neuesten Untersuchungen (Littler et al. 2003) kann in der CLIC-Familie zumindest CLIC1 dimerisieren. Diese Dimere können dann einen aktiven Kanal bilden. Ob AtCLIC ein Dimer bildet, ist noch ungeklärt. Es wurde gezeigt, dass AtCLIC unter Gelfiltrations-Bedingungen nur als Monomer vorliegt (Dixon et al. 2002b).

Eine mögliche Dimerisierung von AtCLIC könnte auf jeden Fall nicht nach demselben Mechanismus verlaufen wie bei CLIC1: Es wurde nachgewiesen, dass eine Mutation von Cys24 oder Cys59 zu Serin in CLIC1 einen Verlust der Funktion und Dimerisierungsfähigkeit (Littler et al. 2003) bedingt. AtCLIC besitzt an der entsprechenden Stelle von vornherein ein Serin. Das schließt eine Funktionsfähigkeit jedoch nicht aus, denn Cys59 ist nur bei CLIC1 zu finden. In allen anderen CLICs befindet sich an dieser Stelle ein Alanin (Littler et al. 2003), das ebenfalls nicht in der Lage ist, mit Cystein eine Disulfidbrücke zu bilden.

### ***Zellen, die AtCLIC exprimieren, zeigen eine erhöhte Membranleitfähigkeit.***

Aus den Daten ist zu ersehen, dass AtCLIC eine Membranleitfähigkeit in der Säugerzelllinie HEK293 induziert. Die Leitfähigkeit besitzt eine starke einwärtsgerichtete Komponente. Die Kinetik der Stromantworten zeigt Zweiphasigkeit mit einer schnellen und einer trägen, zeitabhängigen Komponente.

Die gleiche Leitfähigkeit zeigte sich auch bei Transfektion der Zellen mit einem weiteren Vektor (pIRES-AtCLIC) der ebenfalls AtCLIC trug. Bei Kontrollzellen, die nur mit GFP transfiziert wurden, zeigte sich eine solche Membranleitfähigkeit nie. Auch Transfektion einer weiteren Zelllinie (CHO-K1) mit AtCLIC führte zu einer erhöhten Leitfähigkeit, die der in HEK293-Zellen entsprach. Diese Versuche legen nahe, dass es sich bei der AtCLIC induzierten Leitfähigkeit nicht um ein Artefakt von GFP, des Vektors oder der Zelllinie

handelt. Allerdings konnte nicht vollständig geklärt werden, ob AtCLIC alleine den Kanal bildet. Es wäre auch möglich, dass das Protein nur Teil eines Kanals ist oder endogene Kanäle aktiviert. Dies ist zwar aufgrund der sehr ähnlichen Stromantworten in unterschiedlichen Zelllinien unwahrscheinlich, jedoch nicht unmöglich. Bis vor kurzem war auch bei der CLIC Familie nicht klar, ob die Proteine selbst eine Ionenleitfähigkeit aufweisen, oder nur die Aktivität endogener Kanäle modulieren. Die Kanalaktivität von CLIC1 wurde erst durch Messungen an planaren Bilayern gezeigt, wo die rekonstituierten Proteine in Phospholipidvesikeln funktionelle Kanäle bilden können, deren Ströme denen in Zellen, die CLIC natürlich exprimieren, sehr ähnlich sind (Warton et al. 2002; Ashley 2003). Eine solche Vorgehensweise könnte auch bei AtCLIC sicher klären, ob die beobachtete Erhöhung der Leitfähigkeit in HEK293- und CHO-K1-Zellen bei Expression von AtCLIC wirklich auf einer Kanalfunktion dieses Proteins begründet ist.

Die Stromantworten von AtCLIC exprimierenden Zellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl in der *Cell-attached*- als auch in der *Whole-cell*-Konfiguration gemessen. Da in den *Cell-attached*-Messungen nur die Kanäle im Zellpatch unter der Pipette gemessen werden, sollte bei der Messung in der Ganzzell-Konfiguration entsprechend mehr Strom fließen, da alle Kanäle, die sich in der Zellenmembran befinden, bei dieser Messung erfasst werden.

Die Steigerung des Stromes zwischen dem gemessenen Zellpatch (ca. 350 pA) in der *Cell-attached*-Konfiguration und der ganzen Zelle (2500 pA) in der *Whole-cell*-Konfiguration beträgt etwa das 7fache. Die Fläche der gemessenen Membran der ganzen Zelle beträgt annähernd das 100-200fache des Patches. Für diese Erhöhung der Membranfläche ist die Stromzunahme ungewöhnlich gering. Dies spricht, genau wie die Tatsache, dass bei den *Cell-attached*-Messungen nur bei etwa 70 % der Zellen Ströme gemessen wurden dafür, dass es nur wenige Kanäle gibt oder diese in der Membran geclustert vorliegen und sich so in 30 % der Fälle kein Kanal im gemessenen Zellpatch befand. Aber auch unter Berücksichtigung dieser Möglichkeiten, ist die 7fache Zunahme des Stromes bei einer so grossen Zunahme der berücksichtigten Membranfläche recht gering. Es besteht auch die Möglichkeit, dass, ähnlich wie bei CLIC1, der Kanal bei *Whole-cell*-Messungen aufgrund von fehlenden Faktoren, die bei der Perfusion mit der Pipettenlösung ausgewaschen wurden, nicht mehr in die Membran eingebaut wird (M. Mazzanti, persönliche Mitteilung) oder sogar ein Ausbau erfolgt.

AtCLIC exprimierende Zellen zeigen Membranleitfähigkeit. Die *Cell-attached*-Messungen lassen jedoch nur auf eine sehr geringe, die *Whole-cell*-Messungen auf keinerlei Chloridselektivität schließen. Der humane Kanal CLIC1 ist jedoch selektiv für Chlorid (Tulk et al. 2000). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten wäre jedoch auch eine funktionelle Ähnlichkeit zu erwarten. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Selektivität des tierischen Kanals erst im Laufe der Evolution entwickelt hat, während diese Spezialisierung bei dem pflanzlichen Protein AtCLIC unterblieben ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine Selektivität besteht, diese aber von Zellfaktoren abhängig ist, die durch die Versuchsanordnung der *Whole-cell*-Messungen bei der Perfusion der Zelle ausgewaschen wurden. Dafür würde sprechen, dass in der *Cell-attached*-Konfiguration eine geringe Chloridselektivität zu erkennen ist, die bei der *Whole-cell*-Konfiguration völlig verschwindet. Um die Selektivität des Proteins AtCLIC näher zu untersuchen, wären Einzelkanaluntersuchungen notwendig, bei denen auch bestimmte Zellfaktoren einzeln zugeführt werden können. Ein weiterer Gegensatz zwischen den beiden Proteinen ist die einwärtsgerichtete Funktion des Proteins AtCLIC, während CLIC1 zu den Auswärtsgerichteten gezählt wird (Valenzuela et al. 1997; Tonini et al. 2000).

#### ***AtCLIC zeigt Ähnlichkeiten mit einem nativen Anionenkanal***

AtCLIC zeigt nicht nur gewisse Ähnlichkeiten mit CLIC1, sondern auch zu nativen, pflanzlichen Anionenkanälen auf. Die Kinetik und die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit die bei AtCLIC-exprimierenden Zellen beobachtet werden kann, ähnelt stark den Eigenschaften des Malatkanals am Tonoplasten von Pflanzenzellen (Hafke et al. 2001; Epimaskho et al. 2004). Die zweiphasige Aktivierung mit träger Komponente wurde auch für diesen schon beschrieben.

Die AtCLIC induzierte Leitfähigkeit in HEK293-Zellen kann mit dem Anionenkanalinhibitor Indanyloxyameisensäure (IAA-94) inhibiert werden. Mit diesem wurde auch schon die Blockierung von Mitgliedern der CLIC-Familie mit hoher Affinität (Tulk et al. 2002; Harrop et al. 2001) beschrieben. IAA-94 ist eine homologe Substanz zum GST-Inhibitor Ethacrynsäure (Cromer et al. 2002), was wiederum die Ähnlichkeit der GST- und CLIC-Familie unterstützt. Der Malatkanal am Tonoplasten von Pflanzen (Epimaskho et al. 2004) zeigte ebenfalls eine Empfindlichkeit gegen IAA-94.

Es ist anzumerken, dass sich AtCLIC und der einwärtsgerichtete Malatkanal aus *M. crystallinum* nicht nur im Bezug auf ihre Kinetiken und der Inhibition durch IAA-94 ähneln. Der tonoplastidäre Malatkanal von *M. crystallinum* zeigt außerdem

Redoxempfindlichkeit (Epimashko et al. 2004). Dies wurde für AtCLIC zwar nicht direkt nachgewiesen, es gibt jedoch Hinweise, dass das strukturell verwandte Protein CLIC1 eine solche Eigenschaft besitzt (Littler et al. 2003). Die hohe Ähnlichkeit der Proteine lässt vermuten, dass dies auch für AtCLIC der Fall sein könnte.

### ***Das Protein AtCLIC ist sowohl im Cytosol als auch in der Membran lokalisiert***

Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde im heterologen System HEK293-Zelle nachgewiesen, dass sich das Protein AtCLIC sowohl in Cytosol als auch in der Zellmembran befindet. Dies zeigten mikroskopische Studien am CLSM, bei denen besonderen Wert auf die Lokalisation des Proteins in den membranösen Filopodien gelegt wurde. In einer Colokalisationsstudie mit Hilfe des Membranmarkers Fm4-64 konnte weiterhin belegt werden, dass AtCLIC an den gleichen Regionen (Zellmembran und Filopodien) zu finden ist, in der sich der Membranmarker anreicherte. Daneben zeigte sich aber sowohl in den mikroskopischen als auch bei proteinbiochemischen Lokalisationsstudien, dass sich der größte Teil des Proteins in HEK293-Zellen im Cytosol aufhält. Dixon et al. (2002b) haben bei Lokalisationsstudien gezeigt, dass von den vier DHARs aus *A. thaliana*, drei im Cytosol der Zelle vorliegen, darunter auch AtCLIC.

Ob AtCLIC wie CLIC1 noch in weiteren intrazellulären Membranen wie im endoplasmatischen Retikulum, in Trans-Golgi-Vesikeln, in der nuklearen Membran, in Mitochondrien oder in sekretorischen Vesikeln (Harrop et al. 2001; Warton et al. 2002; Tonini et al. 2000) lokalisiert ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Es zeigte sich jedoch bei Western-Blot Analysen, dass das Protein bei Expression in den prokaryontischen *E.coli*- Zellen hauptsächlich in der Zellmembran akkumuliert. Dies könnte an den Unterschieden im Translationsapparat und Proteintargeting zwischen Prokaryonten und Eukaryonten liegen.

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass durch die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise vorliegen, dass AtCLIC eine Doppelfunktion in der pflanzlichen Zelle erfüllt. Dabei liegt die Vermutung nahe, dass das Protein unter Standardbedingungen gelöst im Cytosol vorliegt und dort als Dehydroascorbatreduktase fungiert. Auf einen Stimulus hin wird AtCLIC in eine Membran, eingebaut und übernimmt dort seine Funktion als Kanal. Da AtCLIC in vielen Punkten homolog zum intrazellulären Kanal CLIC1 ist, sollte als wahrscheinlichste native Lokalisation von AtCLIC der Tonoplast der Pflanzenzelle in Betracht gezogen werden.

## 5. Zusammenfassung:

Anionenkanäle sind in den Membranen aller Eukaryonten vorhanden und wichtig für viele physiologische Prozesse. Pflanzliche Anionenkanäle wurden in den vergangenen Jahren intensiv mit elektrophysiologischen Methoden untersucht, über die molekularen Eigenschaften der pflanzlichen Anionenkanäle ist jedoch nach wie vor sehr wenig bekannt. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag deshalb in der Untersuchung, ob ein Homolog zu den tierischen "Chloride Intracellular Channels" (CLICs), das pflanzliche Protein AtCLIC, als Anionenkanal funktionieren kann.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden insbesondere spezielle elektrophysiologische, proteinbiochemische und mikroskopische Methoden angewendet. Die wesentlichen Ergebnisse aus diesen Untersuchungen können wie folgt zusammengefasst werden:

Es konnte aufgezeigt werden, dass im Genom von *Arabidopsis thaliana* ein Protein codiert ist, das eine grosse Ähnlichkeit mit dem intrazellulären Chloridkanal CLIC1 aus *Homo sapiens* aufweist. Dieses Protein, im folgenden AtCLIC genannt, gehört zur Klasse der Dehydroascorbat-Reduktasen (DHARs) aus der Familie pflanzlicher Gluthathion-S-Transferasen (GSTs). AtCLIC zeigt jedoch deutlich höhere Sequenzidentitäten zu Vertretern der tierischen CLIC-Familie, als zu den pflanzlichen GSTs aus *A. thaliana*. Vergleiche der Phylogenie gaben einen Hinweis darauf, dass beide Familien, die der GSTs und der CLICs, einen gemeinsamen Vorfahren haben könnten.

Weiterhin wurde mit Hilfe der "Patch-Clamp-Technik" nachgewiesen, dass das Protein AtCLIC in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) und Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1) eine einwärtsgerichtete Leitfähigkeit mit geringer Chloridselektivität induziert.

Bei Inhibierungsexperimenten wurde deutlich, dass der untersuchte Kanal sensitiv auf den Anionenkanal-Inhibitor IAA-94 reagiert.

Mittels Lokalisationsstudien durch confokale Laserscanning Mikroskopie wurde mit Hilfe des Fusionsproteins AtCLIC::GFP die Verteilung von AtCLIC im heterologen System HEK293-Zelle untersucht. Dabei wurde die Vermutung bestätigt, dass sich das Protein sowohl gelöst im Cytosol als auch in der Plasmamembran aufhält. Dies zeigte sich besonders an hoch membranösen Zellstrukturen, den Filopodien. Durch Colokalisation mit dem Membranfarbstoff Fm4-64 konnte eine Membranlokalisierung des Proteins AtCLIC bestätigt werden.

Auch bei einer proteinbiochemischen Lokalisationsstudie wurde das Fusionsprotein AtCLIC::GFP sowohl im Cytosol als auch in der Membran der Zellen nachgewiesen. Das pflanzliche Protein AtCLIC aus *A. thaliana* ist also strukturell nah mit dem tierischen Anionenkanal CLIC1 verwandt und induziert eine erhöhte Membranleitfähigkeit, wenn es in einer Zelle exprimiert wird. Die Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen und Experimenten legen die Vermutung nahe, dass das pflanzliche Protein AtCLIC ein Kanal ist, der ein Anionenkanal am Tonoplasten von Pflanzen sein kann.

**Literaturverzeichnis:**

- Ashley, R.H. (2003): Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins.  
Mol. Membr. Biol. 20, 1-11.
- Barbier-Brygoo, H.; Vinauger, M.; Colcombet, J.; Ephritikhine, G.; Frachisse, J.; Maurel, C. (2000): Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role.  
Biochim. Biophys. Acta. 1465, 199-218.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Betz, W.J.; Mao, F.; Bewick, G.S. (1992): Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals.  
J. Neurosci. 12, 363-375.
- Carpaneto, A.; Cantu, A.M.; Gambale, F. (1999): Redox agents regulate ion channel activity in vacuoles from higher plant cells.  
FEBS Lett. 442, 129-132.
- Cerana, R.; Giromini, L.; Colombo, R. (1995): Malate regulated channels permeable to anions in vacuoles of *Arabidopsis thaliana*.  
Aust. J. Plant Physiol. 22, 115-121.
- Cromer, B.A.; Morton, C.J.; Board, P.G.; Parker, M.W. (2002): From glutathione transferase to pore in a CLIC.  
Eur. Biophys. J. 31, 356-364.

- Curmi, P.M. (2004): The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition.  
J. Biol. Chem. 279, 9298-9305.
- Debska, G.; Kicinska, A.; Skalska, J.; Szewczyk, A. (2001): Intracellular potassium and chloride channels: an update.  
Acta Biochim. Pol. 48, 137-144.
- Dixon, D.P.; Laphorn A.; Edwards R. (2002a): Plant Glutathione Transferases.  
Genome Biol. 3, 30004.1-3004.10.
- Dixon, D.P.; Davis B.G.; Edwards R. (2002b): Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants.  
J. Biol. Chem. 277, 30859-30869.
- Duncan R.R.; Westwood P.K.; Boyd A.; Ashley R.H. (1997): Rat brain p64H1: expression of a new member of the p64 chloride channel protein family in endoplasmatic reticulum.  
J. Biol. Chem. 271, 23880-23886.
- Epimashko S.; Meckel T.; Fischer-Schliebs E.; Luttge U.; Thiel G. (2004): Two functionally different vacuoles for static and dynamic purposes in one plant mesophyll leaf cell.  
Plant J. 37, 294-300.
- Gouaux E. (1997): Channel-forming toxins: tales of transformation.  
Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 566-573.
- Hafke J.B.; Hafke Y.; Smith J.A.; Luttge U.; Thiel G. (2003): Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier.  
Plant J. 35, 116-128.

- Harrop, S.J.; DeMaere, M.Z.; Fairlie, W.D.; Reztsova, T.; Valenzuela, S.M.; Mazzanti, M.; Tonini, R.; Qiu, M.R.; Jankova, L.; Warton, K.; Bauskin, A.R.; Wu, W.M.; Pankhurst, S.; Campbell, T.J.; Breit, S.N.; Curmi, P.M. (2001): Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 276, 44993-50000.
- Hechenberger, M.; Schwappach, B.; Fischer, W.N.; Frommer, W.B.; Jentsch, T.J.; Steinmayer, K. (1996): A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J. Biol. Chem.* 271, 33632-33638.
- Hedrich, R.; Becker, D. (1994): Green circuits--the potential of plant specific ion channels. *Plant Mol. Biol.* 26, 1637-50.
- Hossain, M.A.; Asada, K. (1984): Purification of Dehydroascorbate Reductase from Spinach and its characterization as a Thiol Enzyme. *Plant & Cell Physiol.* 25, 85-92.
- Kourie, J.I. (1998): Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *J. Physiol.* 275, 1-24.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landry, D.W.; Akabas, M.H.; Redhead, C.R.; Edelmann, A.; Cragoe, E.J. Jr.; al-Awqati, Q. (1989): Purification and reconstitution of chloride channels from Kidney and trachea. *Science* 244, 1469-1472.

- Littler, D.R.; Harrop, S.J.; Fairlie, W.D.; Brown, L.J.; Pankhurst, G.J.; Pankhurst, S.; DeMaere, M.Z.; Campbell, T.J.; Bauskin, A.R.; Tonini, R.; Mazzanti, M.; Breit, S.N.; Curmi, P.M. (2004): The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition.  
J. Biol. Chem. 279, 9298-9305.
- Lurin, C.; Geelen, D.; Barbier-Brygoo, H.; Guern, J.; Maurel, C. (1996): Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel.  
Plant Cell 8, 701-11.
- McCarty, D.L.; Narvarrete, S.; Babbitt, P.C.; Copley, S.D. (1996): Exploration of the Relationship between Tetrachlorohydroquinone Dehalogenase and the Glutathione S-transferase Superfamily.  
Biochemistry 35, 14634-14642.
- Meckel, T.; Hurst, A.; Thiel, G.; Homann, U. (2004): Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K-channel KAT1.  
Plant Journal 39, 182-193.
- Nilius, B.; Droogmans, G. (2003) Amazing chloride channels: an overview.  
Acta Physiol. Scand. 177, 119-147.
- Pei, Z.M.; Ward, J.M.; Harper, J.F.; Schroeder, J.I. (1996): A novel chloride channel in *Vicia* guard cell vacuoles activated by the seronine/ threonine kinase, CDPK.  
EMBO J. 15, 6564-6574.
- Polekhina, G.; Boeard, P.G.; Blackburn, A.C.; Parker, M.W. (2001): Crystal Structure of Maleylacetoacetate Isomerase/Glutathione Transferase Zeta Reveals the Molecular Basis for Its Remarkable Catalytic Promiscuity.  
Biochemistry 40, 1567-1576.

- Ratajczak, R.; Kemna, I.; Lüttge, U. (1994): Characteristica, partial purification and reconstitution of the vacuolar malate transporter of the CAM plant *Kalanchoe diargremontiana* Hamet et Perrier de la Bathie.  
*Planta* 195, 226-236.
- Redhead, C.R.; Edelman, A.E.; Brown, D.; Landry, D.W.; al-Awqati, Q. (1992):  
A ubiquitous 64-kDa protein is a component of a chloride channel of plasma and intracellular membranes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89, 3716-3720.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*  
2nd edition. Plant & Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,  
New York.
- Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V.M.; Dowd, C.A. (2001): Structure, function and evolution  
of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members  
of an ancient enzyme superfamilyfamily.  
*Biochem. J.* 360, 1-16.
- Shorning, B.Y.; Wilson, D.B.; Meehan, R.R.; Ashley, R.H. (2003): Molecular cloning and  
developmental expression of two Chloride Intracellular Channel (CLIC) genes in  
*Xenopus laevis*.  
*Dev. Genes Evol.* 213, 514-518.
- Thiel, G. (1995): Dynamics of chloride and potassium currents during action potential in  
*Chara* studied with action potential clamp.  
*Europ. Biophys. J.* 24, 85-92.

- Tonini, R.; Ferroni, A.; Valenzuela, S.M.; Warton, K.; Campbell, T.J.; Breit, S.N.; Mazzanti, M. (2000): Functional characterization of the NCC27 nuclear protein in stable transfected CHO-K1 cells.  
FASEB J. 14, 1171-1178.
- Tulk, B.M.; Kapadia, S.; Edwards, J.C. (2002): CLIC1 inserts from the aqueous phase into phospholipid membranes, where it functions as an anion channel.  
Am. J. Cell Physiol. 282, 1103-1112.
- Valenzuela, S.M.; Martin, D.K.; Por, S.B.; Robbins, J.M.; Warton, K.; Bootcov, M.R.; Schofield, P.R.; Campbell, T.J.; Breit, S.N. (1997): Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei.  
J. Biol. Chem. 272, 12575-12582.
- Valenzuela, S.M.; Mazzanti, M.; Tonini, R.; Qiu, M.R.; Warton, K.; Musgrove, E.A.; Campbell, T.J.; Breit, S.N. (2000): The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle.  
J. Physiol. 529, 541-552.
- Wang, S.; Hazelrigg, T. (1994): Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis.  
Nature 369, 400-403.
- Warton, K.; Tonini, R.; Fairlie, W.D.; Matthews, J.M.; Valenzuela, S.M.; Qiu, M.R.; Wu, W.M.; Pankhurst, S.; Bauskin, A.R.; Harrop, S.J.; Campbell, T.J.; Curmi, P.M.; Breit, S.N.; Mazzanti, M. (2002): Recombinant CLIC1 (NCC27) assembles in lipid bilayers via a pH-dependent two-state process to form chloride ion channels with identical characteristics to those observed in Chinese hamster ovary cells expressing CLIC1.  
J. Biol. Chem. 19, 26003-26011.

Wendehenne, D.; Lamotte O.; Franchisse, J.-M.; Barbier-Brygoo, H.; Pugin, A. (2002):  
Nitrate Efflux Is an Essential Component of the Cypytogein Signaling Pathway  
Leading to Defense Responses and Hypersensitive Cell Death in Tobacco.  
The Plant Cell 14, 1937-1951.

Yu, S.P.; Kerchner, G.A (1998): Endogenous Voltage-Gated Potassium Channels in Human  
Embryonic Kidney (HEK293) Cells.  
J. Neurosci. Res. 52, 612-617.

***Eidesstattliche Erklärung***

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Darmstadt, den 24. August 2005

Astrid Elter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Gerhard Thiel am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt durchgeführt und unter dem Geschäftszeichen TH 558/9-1 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

***Herzlich danken möchte ich allen, die an der Entstehung dieser Arbeit  
beteiligt sind:***

Herrn Professor Gerhard Thiel für ein interessantes Thema, freundschaftliche Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Ulrich Lüttge für die Übernahme des Koreferats und viele wertvolle Hinweise.

Den Kollegen in der Arbeitsgruppe:

Jörg Balß, Cristian Cosentino, Uta Frieling, Florian Frohns, Lars Gall, Brigitte Hertel, Jenny Hewing, Ulrike Homann, Annette Hurst, Bettina Keilmann, Tobias Meckel, Mario Mehmel, Melanie Mikosch, Cinzia Pagliuca, Muriel Reuff, Sascha Tayefeh und Henrik von Rosenberg für das angenehme Arbeitsklima und Unterstützung bei theoretischen und praktischen Problemen, aber auch netten Pausen, kleinen und größeren Feiern und so manches Gespräch.

Frau Gisela Marx für Hilfe bei allen Problemen im Labor.

Frau Anna-Luise Christian für die Unterstützung bei der Proteinaufreinigung.

Frau Barbara Reinhardt für ein stets offenes Ohr und Korrekturlesen.

Meinen Eltern für ihre Liebe, den Glauben an meine Fähigkeiten und Hilfe in allen Lebenslagen. Meinen Geschwistern Birgit, Florian und Sonja und meinem Schwager Frank, weil Familie unersetzlich ist.

Henrik Schweizer für die liebevolle Unterstützung, Hilfe bei Formulierungs- und Formatierungsproblemen und den Antrieb, der manchmal nötig war.

**Curriculum vitae**

|                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| Name:                | <b>Elter</b>        |
| Vornamen:            | <b>Astrid Beate</b> |
| Geburtsdatum:        | 27.Dezember 1977    |
| Geburtsort:          | Aschaffenburg       |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch             |
| Familienstand:       | ledig               |

*Promotion*  
2002 bis 2005

*Technische Universität Darmstadt,*  
Fachbereich Biologie, Botanisches Institut,  
**Promotionsstudium**

Promotion in der Fachgruppe Elektrophysiologie  
(Prof. Dr. Gerhard Thiel) mit dem Thema:  
Untersuchung zur Ionenleitfähigkeit eines pflanzlichen Proteins  
mit Homologie zu den tierischen "Chloride Intracellular  
Channels" (CLIC)"

*Studium*  
1997 bis 2002

*J.W.Goethe-Universität Frankfurt am Main,*  
**Studium der Biologie**  
Hauptfächer Genetik, Zellbiologie und Pflanzenphysiologie

Diplomarbeit in der Fachgruppe Carotinoid-Biosynthese  
(Prof. Dr. Gerhard Sandmann) mit dem Thema:  
„Kombinatorische Biosynthese von Flexixanthin und Isolierung  
beteiligter Gene“  
Abschluss: **Diplom-Biologin**

*Schulausbildung*  
1988 bis 1997

Maria-Ward Gymnasium, Aschaffenburg  
Abschluss **Abitur**

1984 bis 1988

Brentano-Grundschule, Aschaffenburg