

**Expression und Charakterisierung  
volumenregulierter Osmolyt-Transportmoleküle  
des Gehirns**

**Dissertation**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2000**

**vorgelegt von**

**Carola Stegen**

Tag der mündlichen Prüfung:	15.06.2000
Dekan:	Prof. Dr. U. Nagel
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. S. Bröer
2. Berichterstatter:	Prof. B. Hamprecht

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Stefan Bröer am Physiologisch-Chemischen Institut und in Kooperation mit dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Priv. Doz. Dr. Stefan Bröer danke ich für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung sowie seine konstruktive Diskussionsbereitschaft und ständige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Bernd Hamprecht danke ich für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die Vertretung meiner Arbeit in der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Florian Lang danke ich für die ständige Kooperationsbereitschaft und die Bereitstellung von Messapparaturen am Physiologischen Institut.

Frau Dr. Ioulia Matskevich und Herrn Carsten A. Wagner danke ich für die Durchführung elektrophysiologischer Messungen an *Xenopus*-Oocyten und ihre ständige Kooperationsbereitschaft.

Herrn Dr. Nikita Gamper danke ich für die Durchführung elektrophysiologischer Messungen an transfizierten Zellen.

Frau Angelika Bröer möchte ich für die methodische Einarbeitung und Unterstützung, vor allem bei der Oocyten-Präparation, ihre Hilfsbereitschaft und die lebhafte Atmosphäre danken.

Herrn Dr. Björn Friedrich danke ich für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie, die Anfertigung von *Xenopus*-Oozyten-Schnitten und seine konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Frau Sophie Fillon danke ich für die Einarbeitung in die Transfektions-Methodik und ihre konstruktiven Ratschläge.

Herrn Prof. T. Jentsch danke ich für die Überlassung des CLC-2-Klons, Herrn Dr. M. Paulmichl für die Überlassung der  $I_{Clh}$ -cDNA und Herrn Dr. J. Melzig für das EGFP-Plasmid.

Herrn Prof. Dr. Heiner Wiesinger, Herrn Priv. Doz. Dr. Ralf Dringen, Frau Dr. Brigitte Pfeiffer und Herrn Dr. Dieter Handschuh danke ich für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft

Herrn Priv. Doz. Stephan Huber möchte ich für seine konstruktive Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken.

Frau Katharina Rehn, Frau Ruth Schmid, Frau Elfriede Faber, Frau Uta Hamacher und Herrn Johannes Madlung danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung.

Meinen Laborgenossen Basim Rahman, Eva Kranz, Kai-Stefan Dimmer, Mirko Gutterer und Sophie Fillon bin ich überaus dankbar für die Aufmunterungen und ihre moralische Unterstützung.

Den Kollegen Andreas Schaer, Dirk Vogel, Johannes Hirrlinger, Konrad Bode, Lothar Kußmaul und Stephan Verleysdonk danke ich nicht nur für ihre Hilfsbereitschaft sondern auch für die gemeinsamen Mensabesuche.

Allen Kollegen am Physiologisch-Chemischen Institut sowie am Physiologischen Institut danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die meinen Werdegang stets unterstützt haben. Außerdem bedanke ich mich bei meinem Freund Jan, dessen außergewöhnliche Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## I Inhalt

<b>I Inhalt</b> .....	I
<b>II Abkürzungen</b> .....	V
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Volumenregulation und Osmoregulation.....	1
1.2 Osmolyte.....	2
1.3 Volumen- und Osmoregulation im Gehirn.....	4
1.4 Osmoregulation in der Niere.....	7
1.5 Transportmoleküle.....	9
1.6 Regulation von Volumenveränderungen.....	13
1.7 Aufgabenstellung.....	16
1.7.1 Molekulare Identität des volumen-sensitiven Osmolyt/Anionen-Kanals.....	16
1.7.2 Charakterisierung des Betain/GABA-Transporters-1.....	16
<b>2 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	18
2.1 Transportmessungen an Astrogliazellen.....	18
2.1.1 Messung der Na <sup>+</sup> -unabhängigen Taurinaufnahme an astrogliareichen Primärkulturen.....	18
2.1.2 Messung des Taurineffluxes aus vorbeladenen astrogliareichen Primärkulturen.....	19
2.1.3 Messung der Taurinaufnahme und des Taurin- und <i>myo</i> -Inositol-Effluxes an C6-Rattengliomzellen.....	20
2.1.4 Hemmung des schwellungsaktivierten Taurineffluxes durch Anionenkanalblocker.....	22
2.1.5 Messung des Taurineffluxes mit und ohne hypertone Vorinkubation aus C6-Rattengliomzellen.....	23
2.2 Messungen an <i>Xenopus</i> -Oocyten.....	25
2.2.1 Bestimmung der Volumenveränderung von Oocyten durch hypotonen Schock.....	25
2.2.2 Messung der Taurinaufnahme in RNA-injizierte Oocyten.....	26
2.2.3 Messung der Substrateffluxes nach Vorbeladung durch Injektion.....	26
2.2.4 Taurinefflux aus mRNA-injizierten Oocyten.....	28

2.2.5 Expression der mRNA der Kanalproteine CLC-2, CLC-3 und $I_{Cl}$ im Gehirn.....	30
2.2.6 Klonierung der CLC-3-cDNA von mRNA aus astrogliareicher Primärkultur.....	32
2.2.7 Chloridefflux aus cRNA-injizierten Oocyten .....	37
2.2.8 Chloridströme cRNA-injizierter Oocyten.....	40
2.2.9 Taurinefflux aus cRNA-injizierten Oocyten.....	41
2.2.10 Inulinefflux aus cRNA-injizierten Oocyten.....	44
2.2.11 Immunocytochemie CLC-3-exprimierender Oocyten.....	45
2.3 Messungen an CLC-3-transfizierten HEK-293-Zellen.....	46
2.3.1 Immunfluoreszenzuntersuchungen an CLC-3-transfizierten HEK-293-Zellen	47
2.3.2 Nachweis der Expression des Flag-Fusionsproteins in transfizierten HEK-293-Zellen mittels "Western Transfer".....	48
2.3.3 Taurinefflux aus CLC-3-transfizierten HEK-293-Zellen.....	50
2.3.4 Chloridströme CLC-3-transfizierter HEK-293-Zellen.....	51
2.4 Diskussionen zu 2.1 bis 2.3.....	53
2.5 Charakterisierung des Betain-GABA-Transporters-1 im <i>Xenopus</i> - Oocyten-Expressionssystem.....	63
2.5.1 GABA-Aufnahme durch den Betain-GABA-Transporter BGT-1.....	63
2.5.2 Messung substrat-induzierter Ströme.....	64
2.5.3 Abhängigkeit der GABA-Aufnahme durch BGT-1 von der Ionenzusammensetzung des Transportpuffers.....	67
2.5.4 Untersuchung der stöchiometrischen Kopplung von GABA/Betain, $Na^+$ - und $Cl^-$ -Transport.....	68
2.5.4.1 Aufnahme von GABA, $Na^+$ und $Cl^-$ durch BGT-1.....	68
2.5.4.2 Vergleich der Flux-Daten mit elektrophysiologischen Daten.....	70
2.5.4.3 Gekoppelte Aufnahme von Betain, $Na^+$ und $Cl^-$ .....	71
2.5.4.4 Bestimmung der GABA- und $Na^+$ -Affinität des BGT-1.....	71
2.5.4.5 Einfluss der $Na^+$ - und $Cl^-$ -Konzentrationen auf den GABA Transport.....	73
2.5.4.6 Vergleich der Hill-Koeffizienten des BGT-1 für GABA, $Na^+$ und $Cl^-$ .....	74
2.6 Diskussion zu 2.5.....	76

<b>3 Material und Methoden</b> .....	79
3.1 Geräte.....	79
3.2 Reagenzien und Materialien.....	80
3.3 Medien, Lösungen und Puffer.....	82
3.4 Kultivierung von Säugetierzellen und Bakterien.....	83
3.4.1 Säugetierzellen.....	83
3.4.1.1 Lösungen und Medien.....	83
3.4.1.2 Anlegen von astrogliareichen Primärkulturen.....	83
3.4.1.3 Kultivierung von Zelllinien.....	84
3.4.2 Bakterien.....	84
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	84
3.5.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	85
3.5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	85
3.5.1.2 Extraktion von DNA mittels Phenol/Chloroform.....	85
3.5.1.3 Fällern, Waschen und Trocknen von DNA und RNA.....	85
3.5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA.....	86
3.5.1.5 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonucleasen .....	86
3.5.1.6 Agarosegelelektrophorese.....	86
3.5.1.7 Gelextraktion.....	87
3.5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	87
3.5.1.9 Transformation elektrokompenter E.coli-Zellen.....	87
3.5.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	87
3.5.1.11 RNA-Isolierung.....	88
3.5.1.12 mRNA-Isolierung.....	88
3.5.1.13 Reverse Transcription.....	89
3.5.1.14 Klonierung von PCR-Produkten.....	89
3.5.1.15 DNA-Sequenzierung.....	89
3.5.1.16 <i>in vitro</i> -Transcription.....	90
3.5.1.17 RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von CLC-2, CLC-3 und I <sub>CLN</sub> .....	91
3.5.1.18 Klonierung der CLC-3-codierenden Sequenz aus astrogliareicher Primärkultur.....	92
3.6 Expressionssysteme.....	94
3.6.1 <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten.....	94

# I Inhalt

---

3.6.1.1 Präparation der Oocyten.....	94
3.6.1.2 Expression von cRNA und mRNA in Oocyten.....	95
3.6.2 Transfektion von HEK-293-Zellen.....	95
3.7 Transportmessungen.....	96
3.7.1 Transportmessungen an adhärenen Zelllinien.....	96
3.7.2 Transportmessungen an Oocyten.....	96
3.7.2.1 Wahl der Kontrollloocyten.....	97
3.8 Immunologische und Proteinbiochemische Methoden.....	98
3.8.1 Immunanfärbung intrazellulärer Antigene in adhärenen Zellen.....	98
3.8.2 Anreicherung membranständiger Proteine.....	99
3.8.3 Natriumdodecylphosphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	100
3.8.4 Elektrotransfer der Proteine (Western Transfer) .....	100
3.8.5 Detektion der Proteine mit Antikörpern.....	100
<b>4 Literatur</b> .....	<b>102</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>123</b>



## II Abkürzungen

Abkürzungen, die in den "Instructions to Authors 1999" des "Journal of Neurochemistry" bereits definiert wurden, wurden nicht in das Abkürzungsverzeichnis aufgenommen.

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AQP	Aquaporin
AS	Aminosäure(n)
BES	N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BGT-1	Betain-GABA-Transporter 1
Cap-Analog	N-7-Methylguanosyl-5'-triphosphatidyl-5'-guanosin
CLC	Chloride Channel
CSF	Cerebrospinal-Flüssigkeit
d	Tag/Tage
DABA	2,4-Diaminobuttersäure (2,4-Diaminobutyric acid)
DCT	Distaler gewundener Tubulus (Distal Convoluted Tubule)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFP	Verstärkt grünfluoreszierendes Protein (Enhanced Green Fluorescent Protein)
ENaC	Epithelialer Na <sup>+</sup> -Kanal (Epithelial Na <sup>+</sup> Channel)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GAT	GABA-Transporter
GPC	Glycerophosphorylcholin
I <sub>Cl,swell</sub>	Schwellungs-induzierter Chloridstrom
I <sub>Clh</sub>	Chloridstrom-assoziiertes Protein
I <sub>max</sub>	Maximalstrom

## II Abkürzungen

---

ISF	Interstitielle Flüssigkeit
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
M	Mittelwert
mAPK	Astrogliareiche Primärkultur aus Maus
Mittlg.	Mitteilung
MBSH	Oocytenringer (Modified Barth's Solution High Salt)
MCS	Subklonierungsbereich eines Vektors (Multiple Cloning Site)
MDCK	Zelllinie aus Madin-Darby Hunde-Nierenzellen (Madin-Darby Canine Kidney)
MG	Molekulargewicht
ND44	Transportpuffer für Oocyten, 44 mM NaCl
ND44/Gluc	Transportpuffer für Oocyten, NaCl durch Natriumgluconat ersetzt
ND96	Transportpuffer für Oocyten, 96 mM NaCl
ND96/Gluc	Transportpuffer für Oocyten, NaCl durch Natriumgluconat ersetzt
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure
NTR	Nichttranslatierte Region
OD	Optische Dichte
OR2 <sup>-/+</sup>	Oocytenringer ohne /mit Calcium
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
pers.	Persönlich
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
rAPK	Astrogliareiche Primärkultur aus Ratte
rMCT1	Monocarboxylattransporter 1 aus Ratte
RVD	Regulatorische Volumenabnahme (regulatory volume decrease)
RVI	Regulatorische Volumenzunahme (regulatory volume increase)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SGK	Serum-Glucocorticoid-sensitive Kinase
SMIT	Inositol-Transporter (Sodium-coupled <i>myo</i> -Inositol Transporter)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

## II Abkürzungen

---

TAL	Dicker aufsteigender Schenkel der Henleschen Schleife (Thick Ascending Limb)
TAUT	Taurin-Transporter
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TPH	Transportpuffer, hyperton, Bicarbonat-gepuffert
TPI	Transportpuffer, isoton, Bicarbonat-gepuffert
TPIa	Transportpuffer, isoton, Hepes-gepuffert
TPO	Transportpuffer, hypoton, Bicarbonat-gepuffert
Upm	Umdrehungen pro min
VBH	Vorbeladungspuffer, hyperton, Bicarbonat-gepuffert
VBI	Vorbeladungspuffer, isoton, Bicarbonat-gepuffert
VBIa	Vorbeladungspuffer, isoton, Hepes-gepuffert
VDAC	Spannungsabhängiger Anionenkanal (Voltage Dependent Anion Channel)
$V_{\max}$	Maximalgeschwindigkeit
VSOAC	Volumen-sensitiver Kanal für Organische Osmolyte und Anionen (Volume-Sensitive Organic Osmolyte/Anion Channel)
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Volumenregulation und Osmoregulation

Die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen hängt entscheidend von der optimalen Regulation des Gehalts an gelösten Teilchen in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle ab. Neben der Osmo- und Volumenregulation spielt auch die pH-Regulation in dieser Homöostase eine große Rolle. Die Plasmamembran fast aller tierischen Zellen ist hochdurchlässig für Wasser. Daraus ergibt sich, dass das Zellvolumen auch durch die intrazellulären Konzentrationen osmotisch aktiver Substanzen bestimmt wird. Zellen regulieren ihr Volumen durch Anpassung ihres Gesamtgehalts an gelösten Teilchen. Dafür besitzen sie eine Reihe von Mechanismen, wie zum Beispiel Ionen-Transport (Cserr et al., 1987; Hoffmann und Simonsen, 1989), Aufbau oder Abbau von Makromolekülen (Baquet et al., 1990) und die Akkumulation oder Freisetzung von Osmolyten (Kimmelberg et al., 1990; Banderali und Roy, 1992; Handler and Kwon, 1993).

Man unterscheidet zwei Arten von Volumenänderung: Die anisotone Volumenänderung erfolgt bei einer Veränderung der extrazellulären Osmolarität. Die isotone Volumenänderung tritt bei einer Veränderung des zellulären Gehalts an osmotisch aktiven Substanzen auf. Durch Verringerung der extrazellulären Osmolarität oder durch erhöhte Netto-Aufnahme von osmotisch aktiven Substanzen in die Zelle kann es zu einem verstärkten Wassereinstrom kommen, der zur Schwellung der Zelle führt. Durch Freisetzung von Ionen und organischen Osmolyten in den Extrazellulärraum kann die Zelle diesem Vorgang entgegenwirken, sodass die Zelle wieder schrumpft (regulatorische Volumenabnahme; "Regulatory Volume Decrease", RVD). Eine Erhöhung der extrazellulären Osmolarität führt dagegen zu einem Wasserausstrom und somit zu einem Schrumpfen der Zelle. Diesem Schrumpfen kann durch eine verstärkte Aufnahme von Osmolyten und somit auch von Wasser entgegengewirkt werden (regulatorische Volumenzunahme; "Regulatory Volume Increase", RVI). Manche Zelltypen zeigen diesen RVI erst, nachdem sie hypotonen Bedingungen ausgesetzt worden sind und einen RVD vollzogen haben (Hoffmann und Simonsen, 1989).

Unter physiologischen Bedingungen werden die meisten Säugetierzellen kaum schwankender Osmolarität ausgesetzt. Eine Ausnahme bilden jedoch z.B. Darmepithelzellen, Zellen des Nierenmarkes und die Blutzellen in den Kapillaren von Darm und Niere. Von großer Bedeutung ist die Zellvolumenregulation auch für das Gehirn, da wegen der Einschränkung durch die Schädelknochen keine Volumenvergrößerung toleriert werden kann. Im Gegensatz zu Niere und Darm unterliegen Gehirnzellen jedoch isotonen Zellvolumenänderungen (s. Abschnitt 1.3).

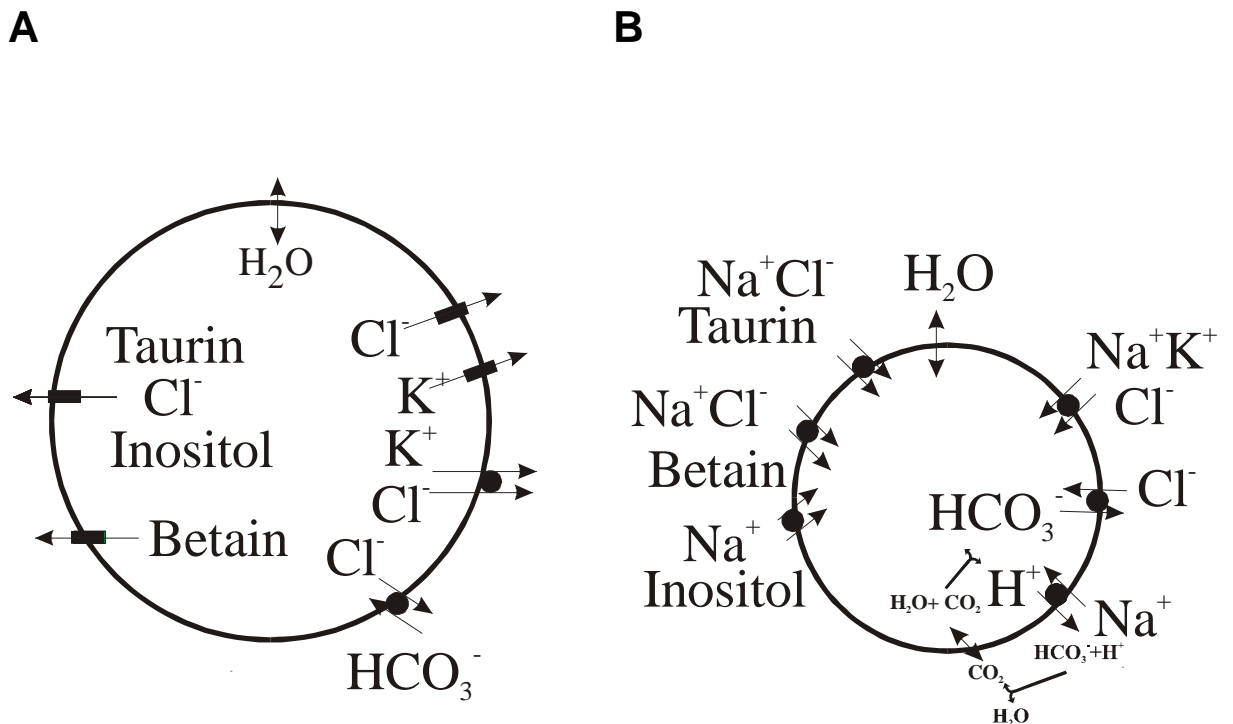
### 1.2 Osmolyte

#### *Anorganische Osmolyte*

Bei der Volumenregulation spielen vor allem die Ionen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  eine Rolle. So ist die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe essentiell zur Aufrechterhaltung des einwärtsgerichteten elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten an der Membran. Dieser Gradient ermöglicht die Aufnahme von Elektrolyten und Osmolyten mittels  $\text{Na}^+$ -abhängiger Transport-Systeme. Dadurch kann eine rasche Volumenzunahme erreicht werden. Zwei dieser Transporter werden in nahezu allen Säugetierzellen nach Zellschrumpfung aktiviert: Der  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Antiporter und der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransporter. Die Aktivierung des  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransportes führt zur Akkumulation von Ionen im Cytosol. In Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wird während des RVI ein  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransport-System (NCC) aktiviert und das aufgenommene  $\text{Na}^+$  anschließend durch die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe gegen  $\text{K}^+$  ausgetauscht (Hoffmann et al., 1984). In diesen Zellen wird ebenso wie in Astrocyten (Kimmelberg und Frangakis, 1985) und Nieren-Medullazellen (Eveloff und Warnock, 1987) sowohl der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC) als auch der NCC aktiviert. Die Aktivierung des  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austausches führt indirekt über den Einstrom von  $\text{CO}_2$  zum Ausgleich des  $\text{H}^+$ -Effluxes auch zur Zunahme des Zellvolumens ( Abb. 1B).

Bei Schwellung von Zellen kommt es während des RVD zu einem Efflux von  $\text{KCl}$ , der u.a. durch Öffnung von  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Kanälen ausgelöst wird (Hoffmann et al., 1984). Für Erythrocyten (Hall und Ellory, 1986) und für Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (Thornhill und Laris, 1984) ist außerdem ein elektroneutraler  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransport beschrieben worden (Hoffmann und Simonsen, 1989). Im Nierenmark spielt die Umkehrung des  $\text{K}^+$ - $\text{H}^+$ -Austausches bei der Volumenzunahme eine Rolle. Die

Kopplung mit dem  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austausch ermöglicht während des RVD die Freisetzung von KCl ohne pH-Veränderungen (Eveloff und Warnock, 1987) (s. Abb. 1 A).



**Abb. 1.** Modelle der zellulären Volumenregulation unter Beteiligung von Transportern (●) und Kanälen (—). A: Volumenabnahme (RVD); B: Volumenzunahme (RVI)

### Organische Osmolyte

Die organischen Osmolyte stellen Substanzen dar, die entweder Endprodukte des Metabolismus sind oder kaum weiter metabolisiert werden. Im Gegensatz zu anorganischen Ionen, die in hohen Konzentrationen manche Proteine destabilisieren können, wirken sich organische Osmolyte auch in hohen Konzentrationen nicht nachteilig auf die zellulären Proteinfunktionen aus und wirken eher stabilisierend (Burg, 1994, 1996), daher auch die Bezeichnung als "kompatible" oder "nicht störende" Osmolyte. Unter den wichtigsten organischen Osmolyten von Säugetierzellen sind sowohl Polyole, wie Sorbitol und *myo*-Inositol, nicht essentielle Aminosäuren (Glycin, Alanin, Glutamat, Glutamin, Aspartat) (Hoffmann und Simonsen, 1989; Kimelberg et al., 1990; Roy, 1995) und Aminosäurederivate, wie Taurin, als auch Methylamine, wie Glycerophosphorylcholin und Betain zu finden (Burg, 1995; Handler und Kwon, 1993). Die Methylamine sind außerdem als "kompensatorische Osmolyte" in der Niere bekannt (s. Abschnitt 1.4). Die organischen Osmolyte werden während und nach dem RVI akkumuliert und während des RVD rasch freigesetzt (s. Abb. 1).

Betain wird aus der Nahrung aufgenommen, kann aber auch in Leber, Darmschleimhaut und Niere durch Oxidation von Cholin gebildet werden (Garcia-Perez und Burg, 1991). Unter hyperosmotischen Bedingungen wird Betain in der Zelle aber hauptsächlich durch Aufnahme mittels  $\text{Na}^+$ -Cotransport akkumuliert (Grossman und Hebert, 1989; Handler und Kwon, 1993; Burg, 1994). Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) ist in fast allen tierischen Geweben zu finden und kommt insbesondere im Gehirn in hohen Konzentrationen vor. Diese nicht proteinogene Aminosäure wurde sogar als Neurotransmitter diskutiert (Liu et al, 1992). Taurin kann auf mehreren Wegen aus Cystein synthetisiert werden (Huxtable, 1989). Dennoch stammt der größte Teil des Taurins im Körper aus der Nahrung. Ein hoch-affiner,  $\text{Na}^+$ -abhängiger Taurintransport wurde sowohl im Gehirn als auch in peripheren Geweben nachgewiesen (Huxtable, 1989; Smith et al., 1992). Sowohl der  $\text{Na}^+$ -Taurin-Cotransporter TAUT als auch der Betain-Transporter BGT-1 gehören zur Familie der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Neurotransmitter-Transporter (Smith et al, 1992; Uchida et al., 1992). *Myo*-Inositol ist normalerweise im Serum enthalten und kann von dort aus in den Zellen akkumuliert werden. Ob es hauptsächlich aus der Nahrung aufgenommen wird oder im Körper synthetisiert wird, ist noch unklar (Burg, 1995). In geringem Maße wird es sicher durch Recycling von Inositolphosphaten oder durch Synthese aus Glucose bereitgestellt (Biden und Wollheim, 1986). Die Aufnahme von Inositol in Nierenmark-Zellen (Garcia-Perez und Burg, 1991), C6-Gliomzellen (Paredes et al., 1992) und astroglia-reichen Primärkulturen (Isaacks et al., 1994) ist osmotisch reguliert. Der  $\text{Na}^+$ -Inositol-Cotransporter (SMIT) wurde aus "Madin-Darby canine kidney" (MDCK)-Zellen kloniert (Kwon et al., 1992). Sorbitol und GPC sind Produkte von Stoffwechselwegen. Die Erhöhung ihrer intrazellulären Konzentration kann entweder durch erhöhte intrazelluläre Synthese (Sorbitol) (Bagnasco et al, 1988; Smardo et al., 1992) oder verringerten intrazellulären Abbau (GPC) erreicht werden (Zablocki et al., 1991; Bauernschmitt und Kinne, 1993).

### 1.3 Volumen- und Osmoregulation im Gehirn

Wegen der starren Begrenzung durch die Schädelknochen und der komplexen Gehirnstruktur können Veränderungen des gesamten Gehirnvolumens verheerende

## 1 Einleitung

---

neurologische Schädigungen verursachen. Die Aufrechterhaltung der Balance von Ionen- und Osmolyt-Zusammensetzung und des Volumens dieser Flüssigkeiten ist essentiell für die Funktionsfähigkeit des Gehirns. Schon geringe Veränderungen in intrazellulärer oder extrazellulärer Zusammensetzung können die neuronalen Signalvorgänge und die Informationsverarbeitung schwerwiegend verändern. Daher wird die Zusammensetzung und das Volumen der intrazellulären und extrazellulären Flüssigkeiten im Gehirn fein reguliert. Das Säugetiergehirn beinhaltet die folgenden vier Flüssigkeits-Kompartimente: Blut, Cerebrospinal-Flüssigkeit (CSF), interstitielle Flüssigkeit (ISF) und intrazelluläre Flüssigkeit. Die interstitielle Flüssigkeit umgibt die Zellen des Nervensystems und ist vom Blut durch die Blut-Hirnschranke getrennt. ISF und CSF sind durch die Ependymzellen der Ventrikel und durch die Pia mater voneinander getrennt. CSF und ISF haben eine ähnliche Zusammensetzung, die sich deutlich von der Blut-Zusammensetzung unterscheidet (Hansen, 1985). Im Plasma sind insbesondere die Konzentrationen von  $K^+$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Ca^{2+}$ , Aminosäuren und Glucose höher und die Konzentrationen von  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$  und  $H^+$  niedriger als in der CSF und der ISF. Außerdem bleibt die Zusammensetzung von ISF und CSF trotz der starken Variabilität der Plasmakonzentrationen weitgehend konstant. Dies wird durch die Abschirmung des Gehirns durch die Blut-Hirn-Schranke erreicht. Die Blut-Hirn-Schranke wird durch die Endothelzellen der Blutgefäße gebildet, die durch "tight junctions" verbunden sind. An der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke sind auch die Astrocyten beteiligt. Für die perivaskulären Astrocyten werden außer der Blut-Hirn-Schranken-Funktion (Janzer und Raff, 1987) noch mehrere andere Funktionen diskutiert. Einerseits könnten sie die endothelialen Transportprozesse als Reaktion auf neuronale Aktivität beeinflussen (Paulson und Newman, 1987), andererseits könnten diese Astrocyten auch eine vektorielle Transportfunktion haben. Astrocyten stehen nicht nur mit den Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke, sondern über ihre langen Ausläufer auch mit Neuronen und anderen Zellen des Gehirns in Kontakt. Neuronale Aktivität kann zu vorübergehenden Veränderungen des extrazellulären pH-Werts und der Konzentrationen von  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$  und von Neurotransmittern führen (Hansen et al., 1985; Nicholson, 1980; Koyama et al., 1994). Diese wiederum können eine Volumenveränderung von Neuronen und Astrocyten verursachen (Dietzel et al., 1989). An den astroglialen Ausläufern wurde eine polarisierte Lokalisation von  $K^+$ -Kanälen festgestellt (Newman et al.; 1984). Eine Funktion der Astrocyten als räumliche Kaliumpuffer war schon von Orkand et al. (1966) vorgeschlagen worden. Diese



## 1 Einleitung

---

Hypothese wurde durch die Beobachtung der polarisierten  $K^+$ -Kanal-Verteilung weiter untermauert (Brew und Attwell, 1985; Newman, 1986). Während kurzfristige Änderungen der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration durch einen Einstrom durch  $K^+$ -Kanäle abgefangen werden, werden die freigesetzten Ionen langfristig durch den  $Na^+$ - $K^+$ -2Cl-Cotransporter NKCC1 aufgenommen und das  $Na^+$  anschließend durch die  $Na^+$ - $K^+$ -Pumpe gegen  $K^+$  ausgetauscht (Walz, 1992). Die Astrocyten nehmen auch das von den Neuronen an den Synapsen freigesetzte Glutamat auf, so dass es bei verstärkter neuronaler Aktivität zu einer Schwellung der astrocytären Endfüßchen kommen kann.

Anisotone und isotone Volumenänderungen erfolgen bei einer Reihe von pathophysiologischen Umständen, wie Hypo- und Hypernatriämie, Ischämie, Hypoxie, diabetischer Ketoacidose sowie Nieren- und Lebererkrankungen, die sich meist auch in einer Veränderungen der Plasmazusammensetzung niederschlagen. Die Volumenregulation von Astrocyten unter anisotonen Bedingungen ist vorwiegend an Primärkulturen und Gliomzelllinien untersucht worden. Unter akutem hyperosmolarem Schock akkumulieren Gliazellen für den RVI zunächst  $Na^+$ -,  $K^+$ - und Cl-Ionen (Cserr et al., 1987). Dies geschieht vor allem mit Hilfe des elektroneutralen Cotransporters NKCC1. Dieser schnellen Elektrolytaufnahme folgt eine Phase der Akkumulation von organischen Osmolyten (Trachtman, 1991). Unter chronischen hyperosmolarem Bedingungen werden die aufgenommenen Elektrolyte nach und nach durch organische Osmolyte, hauptsächlich Inositol und Taurin sowie Glutamat und Glutamin, ersetzt (Strange et al., 1991; Sanchez-Olea et al., 1992). Die Akkumulation von Osmolyten wurde in C6-Rattengliomzellen und in astroglia-reichen Primärkulturen untersucht (Wiesinger, 1991; Strange et al., 1991; Strange et al., 1994). *Myo*-Inositol spielt in der Volumenregulation der Astrocyten eine besondere Rolle, da es unter hyperosmotischen Bedingungen innerhalb von 2 bis 6 Tagen um ein fünfaches bis zwölffaches der Normalkonzentration in den Zellen akkumuliert wird. Dieser Anstieg der *myo*-Inositolkonzentration entspricht 50-80% der zur RVI benötigten Omolyte (Strange et al., 1994). Auch die Taurinaufnahme astroglia-reicher Primärkulturen wurde unter hyperosmolaren Bedingungen untersucht. Es wurde eine verstärkte Aufnahme von Taurin und eine Akkumulation auf mindestens 200 % der Normalkonzentration festgestellt (Olson und Goldfinger, 1990; Sanchez-Olea et al., 1992; Beetsch und Olson, 1996). Außerdem wurde beobachtet, dass unter hyperosmotischen Bedingungen die Synthese von Taurin im Gehirn erhöht wird (Beetsch und Olson, 1998). Taurin wird im

Gehirn aus Cystein auf dem Cystein-Sulfinat-Decarboxylase-Weg (CDS, EC 4.1.1.29) über die Zwischenstufen Cysteinsulfat und Hypotaurin synthetisiert (Kuriyama et al., 1984; Tappaz et al., 1992; Brand et al., 1998). Die verstärkte Taurin- und Inositol-Akkumulation wird aber vor allem durch Erhöhung der Synthese der mRNA der Osmolytransporter SMIT und TAUT erreicht (Kwon et al, 1992; Paredes et al., 1992). Im Gehirn haben Betain und Sorbitol als Osmolyte nur eine geringe Bedeutung (Heilig et al., 1989). Es wurde gezeigt, dass Sorbitol nicht akkumuliert wird sondern der Abbau gegenüber der Synthese überwiegt (Peters, 1998).

Während des RVDs werden zunächst  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen freigesetzt (Melton und Nattie, 1983). Dem folgt eine Freisetzung der organischen Osmolyte Taurin, Glutamat, Aspartat, Glutamin, GABA und *myo*-Inositol (Trachtman, 1991; Verbalis und Gullans, 1991). Hierbei beträgt die prozentuale Verringerung der intrazellulären Osmolytkonzentration 50% bis 80% und ist damit höher als die Verringerung der Elektrolytkonzentration von nur 10% bis 30%. Allerdings ist der intrazelluläre Gehalt an Elektrolyten insgesamt höher, so dass deren Anteil am RVD bis zu 70% ausmacht (Thurston et al., 1987; Lien et al., 1991). Der Efflux von Taurin und Inositol wurde intensiv an glialen Zellen untersucht (Pasantes-Morales et al., 1990; Jackson und Strange, 1993) (s. Abschnitt 1.5).

### 1.4 Osmoregulation in der Niere

Die Osmoregulation dient der Salz- und Wasserhomöostase in einem Organismus. In Säugetieren wird ein hochkonzentrierter, hyperosmolarer Harn ausgeschieden. Die Osmolarität in den Nierentubuli reicht von 300 bis 2500 mOsmol/l. Daher benötigen die Zellen des Nierenmarks und der Papille Mechanismen, um mit der extremen und stark schwankenden Osmolarität des Extrazellulärtraums umgehen zu können. In der Niere spielen die organischen Osmolyte eine größere Rolle als die Ionen (Garcia-Perez und Burg, 1991). Dies erklärt sich einerseits aus ihrer Rolle als Ionen resorbierendes Organ und andererseits aus zwei vorteilhaften Eigenschaften der organische Osmolyte (Burg, 1995):

1. Die Kompatibilität der organischen Osmolyte: Diese beeinträchtigen, im Gegensatz zu  $\text{NaCl}$  und  $\text{KCl}$ , die Funktion von Proteinen auch in hohen Konzentrationen nicht.

2. Die kompensatorische (“counteracting“) Wirkung vor allem der Methylamine: Glycerophosphorylcholin (GPC) und Betain wirken dem destabilisierenden Effekt von Harnstoff auf die Proteinstruktur entgegen (Yancey und Burg, 1990; Burg, 1996).

Die zweite Eigenschaft ist vor allem im Nierenmark von Bedeutung, wo Harnstoff in Konzentrationen von über 1000 mM osmotisch wirksam sein kann (Garcia-Perez und Burg, 1991). Sorbitol, *myo*-Inositol, Betain und Taurin werden hier hauptsächlich als kompatible Osmolyte genutzt, während GPC als kompensatorischer Osmolyt benötigt wird (Moriyama et al., 1990). Osmolarität ist in erster Linie eine kollektive Eigenschaft von Lösungen. Einige organische Osmolyte können sich daher gegenseitig ersetzen, und die Gesamtmenge der organischen Osmolyten stellt, mehr als die Konzentrationen der einzelnen Osmolyte, die Regelgröße dar (Burg, 1996). Die Akkumulation organischer Osmolyte wurde an mehreren aus Nierengewebe stammenden Zelllinien untersucht. Die Zelllinie PAP-HT-25, die sich von der Mark-Oberfläche einer Kaninchen-Niere ableitet (Uchida et al., 1987) und die MDCK-Zellen aus einem unbekanntem Nieren-Gewebe eines Cockerspaniels sind am besten untersucht (Nakanishi et al., 1988). In den PAP-HT-25-Zellen wurde die Akkumulation von Sorbitol durch verstärkte Synthese nachgewiesen (Yancey et al., 1990). MDCK-Zellen dagegen akkumulieren kein Sorbitol, sondern Inositol, Taurin und Betain. Taurin wird unter isotonen Bedingungen von MDCK-Zellen 15 mal höher akkumuliert als die anderen beiden Osmolyte. Unter hypertonen Bedingungen aber erhöht sich die Geschwindigkeit des Na<sup>+</sup>-abhängigen Transportes von Inositol 25-fach, von Betain 16-fach und von Taurin 2-fach im Vergleich zu isotonen Bedingungen. Im Falle des Inositols wird eine 500-fache Anreicherung gegenüber dem Medium erreicht (Yamauchi et al., 1991). Hierbei scheint neben der Osmolarität die Art der Konzentrationsänderung von Bedeutung zu sein. Hohe Harnstoffkonzentrationen stimulieren beispielsweise die GPC-Akkumulation (Nakanishi und Burg, 1989a) und hemmen dagegen eher die Betain-Akkumulation (Moriyama et al., 1990). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass vorwiegend GPC als kompensatorischer Osmolyt genutzt wird. Hohe Glucosekonzentrationen begünstigen dagegen die Akkumulation von Sorbitol (Moriyama et al., 1990). In der Niere kommt es während der Umstellung vom antidiuretischen Zustand zum diuretischen Zustand zu einer raschen Änderung der Osmolarität, die im Extremfall von über 1200 mOsmol/l auf 150 mOsmol/l fallen kann. Bei einer Verringerung der extrazellulären NaCl-Konzentration erfolgt ein rascher Efflux der organischen Osmolyte. Dieser Efflux ist

von unterschiedlichem Ausmaß und könnte umgekehrt-proportional mit der Größe des Osmolyts korreliert sein (Yancey und Burg, 1989): Der Efflux von Betain als kleinstes (135 Da) der relevanten organischen Osmolyte erscheint stärker als der von Inositol (Nakanishi und Burg, 1989b) und Sorbitol (beide 180 Da), während GPC nur sehr langsam freigesetzt wird (257 Da) (Nakanishi und Burg, 1989a).

### 1.5 Transportmoleküle

In den letzten Jahren sind einige Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen der Volumenregulation gemacht worden. Ein allgemeines Modell wird in Abb. 1 gezeigt. Bisher ist die molekulare Grundlage von fünf  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransport-Systemen (NCC, KCC1, KCC2, NKCC1 und NKCC2) aufgedeckt worden. Auch mehrere Osmolyttransporter wurden kloniert, so BGT-1 für Betain/GABA, SCT/TAUT für Taurin und SMIT für *myo*-Inositol. Die molekulare Identität des schwellungs-aktivierten Osmolyt-Effluxkanals ist dagegen noch völlig unklar.

#### *$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransport-Systeme*

Die bisher klonierten Cotransporter NCC (Gamba et al., 1993), KCC1, KCC2 (Gillen et al., 1996; Holtzmann et al., 1998; Payne et al., 1996), NKCC1 und NKCC2 (Park und Saier, 1996; Payne et al., 1995) transportieren alle  $\text{Cl}^-$  und mindestens ein Kation, und dieser Transport ist elektroneutral. Wie die Bezeichnungen andeuten, handelt es sich bei NCC um einen  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransporter, bei KCCs um  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransporter und bei den NKCCs um  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransporter. Innerhalb dieser Cotransporter-Familie bestehen hohe Sequenzähnlichkeiten. Der NCC und die KCCs sind in 45% ihrer Nucleotidsequenz und in 50% ihrer Aminosäuresequenz identisch. Mit den NKCCs haben sie ca. 25 % ihrer Aminosäure-Sequenz gemeinsam (Park und Saier, 1996; Payne et al., 1995). Die beiden NKCCs haben in ihren 12 Transmembrandomänen sogar 75% bzw. 90% Nucleotid- bzw. Aminosäure-Sequenz-Identität (Park und Saier, 1996). Das Expressionsspektrum der einzelnen Cotransporter reicht von enger Gewebespezifität (NCC in Blase und Nieren-DCT; NKCC2 im Nieren-TAL; KCC2 in Neuronen) bis zu weitgehend ubiquitärer Expression (NKCC1 und KCC1) (Payne et al., 1995; Xu et al., 1994). NKCC1 ist zunächst aus dem sekretorischen Epithel der Haifisch-Rektaldrüse kloniert worden (Xu et al., 1994). Dort ist er basolateral lokalisiert. In unpolaren Zellen reguliert er den zellulären Ionengehalt. Der NKCC1 ist auch im Gehirn exprimiert.

## 1 Einleitung

---

Neben der schon erwähnten Expression in Astrocyten wurde er in der apikalen Membran von Plexus choroideus-Zellen und in den Zellkörpern und Dendriten von Neuronen nachgewiesen (Plotkin et al., 1997). Daher erscheint eine sekretorische Aufgabe dieses Cotransporters im Plexus choroideus eher unwahrscheinlich. Eine Beteiligung an der Volumenregulation (Bairamian et al., 1991) und an der Reabsorption und Pufferung von  $K^+$  (Keep et al., 1994) in Plexus choroideus-Zellen und in Neuronen dagegen gilt als sicher. Der NKCC1 wird durch niedrige intrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentrationen aktiviert. Dies ist beispielsweise bei einer Rückkehr von chronisch hypotonen Bedingungen (und erfolgtem RVD) zu isotonen Bedingungen von Bedeutung. Hier erfolgt ein RVI durch  $Na^+-K^+-Cl^-$ -Cotransport in die Zelle (Kaplan et al., 1996). Auch eine Regulation durch Phosphorylierung wird vermutet, da Erkennungssequenzen für PKA und PKC, hauptsächlich C-terminal, gefunden wurden. Für den NKCC1 aus der Haifisch-Rektaldrüse ist eine Phosphorylierung bereits nachgewiesen worden (Lytle und Forbush, 1992).

### *Transporter organischer Osmolyte*

Der *myo*-Inositol-Transporter SMIT wurde ursprünglich aus MDCK-Zellen kloniert und ist außer im Nierenmark auch noch im Nierencortex und im Gehirn nachgewiesen worden (Kwon et al., 1992). SMIT gehört zu einer Familie  $Na^+$ -abhängiger Metabolit-Transporter, zu der auch der renale  $Na^+$ -gekoppelte Glucose-Transporter (SGLT1) gehört. Der Taurin-Transporter TAUT wurde aus Rattenhirn und MDCK-Zellen kloniert (Smith et al., 1992; Uchida et al., 1992), wurde aber auch in anderen Geweben nachgewiesen. Der BGT-1 wurde ursprünglich aus Madin-Darbin-Hunde-Nierenzellen (MDKC) kloniert (Yamauchi et al., 1992), wird aber ubiquitär exprimiert, auch im Gehirn (Rasola et al., 1995; Borden et al., 1995b; Lopez-Corcuera et al., 1992). BGT-1 und TAUT gehören zu der Familie von  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -gekoppelten Transportern von Aminosäuren, Neurotransmittern und Osmolyten (Smith et al., 1992; Borden et al., 1995b). Zu diesen gehören auch die anderen GABA-Transporter hGAT-1, hGAT-2, hGAT-3 und mGAT-1,-3,-4. Die meisten dieser Transporter vermitteln den neuronalen oder glialen GABA-Transport. In Ratten-Astroglia-Kulturen werden neben rGAT-2 und rGAT-3 auch der rBGT-1 und der rTAUT exprimiert (Borden et al., 1995a). Von den vier genannten GABA-Transportern wird nur der BGT-1 auch außerhalb des Zentralnervensystems exprimiert (Borden et al., 1995b).

### *Efflux organischer Osmolyte*

Während des RVD werden Osmolyte freigesetzt. Hier scheint es einen gemeinsamen Effluxweg für Inositol und Taurin zu geben (Ruhfus und Kinne, 1996), während Sorbitol/Betain über einen anderen Weg freigesetzt werden (Ruhfus et al., 1996). Der Efflux von Taurin und Inositol wurde an einer Vielzahl von Zellen untersucht, u.a. an glialen Zellen (Pasantes-Morales et al., 1990; Jackson und Strange, 1993), an Erythrocyten verschiedener Spezies (Motais et al., 1991), HeLa-Zellen (Kirk und Kirk, 1994; Stutzin et al., 1999), humanen Trachealzellen 9HTEo (Galiotta et al., 1996) und Endothelzellen (Manolopoulos et al., 1997). Der Efflux von Taurin und Inositol ist  $\text{Na}^+$ -unabhängig, nicht sättigbar und folgt dem Konzentrationsgefälle. Er ist unempfindlich gegenüber Inhibitoren der Osmolyt-Aufnahmesysteme (z.B. Furosemid, Phlorizin) und ebenso gegenüber Inhibitoren zellvolumen-gesteuerter  $\text{K}^+$ -Kanäle (z.B.  $\text{Ba}^{2+}$ ), wird aber durch Anionenkanal-Blocker (NPPB, Niflummat, Dipyrindamol, DIDS) gehemmt (Sanchez-Olea et al., 1991; Jackson und Strange, 1993; Pasantes-Morales et al., 1994; Gonzales et al., 1995). Daraus lässt sich schließen, dass der Efflux möglicherweise durch einen auswärts-gerichteten Anionenkanal erfolgt (Roy, 1995; Jackson und Strange, 1993). Dieser Kanal wurde von Strange und Jackson "Volume-Sensitive Organic Osmolyte/Anion Channel" (VSOAC) benannt (Strange und Jackson, 1995). Taurinefflux und Chloridefflux zeigen den gleichen Zeitverlauf von Aktivierung und Freisetzung. Beide Effluxwege werden durch Anionenkanal-Blocker wie NPPB, DIDS, Tamoxifen und Niflumsäure gehemmt (Pasantes-Morales et al., 1990; Jackson und Strange, 1993). In elektrophysiologischen Experimenten wurden mittels Ganzzelleableitungen ("whole cell patch clamp") signifikante Permeabilitäten schwellungs-aktivierter Anionenkanäle für Taurin, Aspartat und Glutamat nachgewiesen (Banderali und Roy, 1992). Im Gegensatz dazu wurden in anderen Zelllinien pharmakologische Unterschiede zwischen dem schwellungs-aktivierten Taurinefflux und den schwellungs-aktivierten Chloridkanälen gefunden (Lambert and Hoffman, 1994; Stutzin et al., 1999; Davis-Amaral et al., 1996, 1997). Der Taurinefflux wurde besonders intensiv an kultivierten Astrogliazellen untersucht und scheint in diesem Zelltyp von Inositolefflux begleitet zu sein (Pasantes-Morales et al., 1990, 1994).

Es wurden mehrere Kandidaten vorgeschlagen, die am RVD durch Freisetzung von Anionen oder Osmolyten beteiligt sein könnten. Hierzu gehören die Mitglieder der

## 1 Einleitung

---

CLC-Chloridkanal-Familie, CLC-2 (Gründer et al., 1992) und CLC-3 (Duan et al., 1997), das  $I_{Cl_{in}}$ -Protein (Paulmichl et al., 1992), der Anionen-Austauscher AE1 (Bande-3-Protein) (Fievet et al., 1995), der mitochondriale spannungs-abhängige Anionenkanal VDAC (Dermietzel et al., 1994) und das kleine Membranprotein Phospholemman (Moormann et al., 1995). Von diesen Proteinen wurde bisher nur AE1 in Bezug auf seine Taurin-Permeabilität untersucht. Mit Hilfe des *Xenopus*-Expressionssystems wurde gezeigt, dass der AE1 aus der Forelle im Gegensatz zum Maus-AE1 unter hypoosmotischen Bedingungen erhöhte Permeabilität für Taurin besitzt (Fievet et al., 1995).

Die Chloridkanäle CLC-2 und CLC-3 sind bereits als volumen-sensitive Chloridkanäle beschrieben worden. Der CLC-2 aus der Ratte wurde bereits intensiv mit Hilfe des *Xenopus*-Expressionssystems untersucht. CLC-2 zeigte in diesem System unter hypoosmotischen Bedingungen eine erhöhte Chlorid-Permeabilität (Gründer et al., 1992; Furukawa et al., 1998). CLC-3 wurde zunächst aus Rattenhirn kloniert (Kawasaki et al., 1994) und später auch aus Meerschweinchen-Herzmuskel. Der aus Meerschweinchen klonierte Kanal CLC-3 wurde in 3T3-Fibroblasten überexprimiert und verursachte in diesen Zellen eine volumen-sensitive Chloridleitfähigkeit (Duan et al., 1997). CLC-Kanäle können Heteromultimere mit veränderten Charakteristika bilden, wie schon für CLC-1 und CLC-2 beschrieben wurde (Lorenz et al., 1996). Das  $I_{Cl_{in}}$ -Protein wurde mittels Expressionsklonierung im *Xenopus*-Expressionssystem kloniert und als volumen-sensitiver Chloridkanal beschrieben (Paulmichl et al., 1992). Allerdings bleibt die genaue Struktur und Funktion dieses Moleküls umstritten. Einerseits wurde das  $I_{Cl_{in}}$ -Protein als Kanalprotein beschrieben (Paulmichl et al., 1992), andererseits wurde beschrieben, dass das  $I_{Cl_{in}}$ -Protein im Cytosol lokalisiert sei (Krapivinsky et al., 1994) und dort möglicherweise mit Actin assoziiert sei (Schwartz et al., 1997). Aber auch eine Verlagerung des  $I_{Cl_{in}}$ -Proteins an die Plasmamembran unter hypoosmotischen Stress ist beobachtet worden (Musch et al., 1997). Diese Beobachtungen deuten auf eine regulatorische Rolle des Proteins. Ein Modell schlägt  $I_{Cl_{in}}$  als Vermittler zwischen einem Volumensensor im Cytoskelett und dem volumen-regulierten CLC-3 vor (Coca-Prados et al., 1996).

### 1.6 Regulation von Volumenveränderungen

Vorraussetzung für die Volumenregulation sind eine Reihe von Komponenten:

1. Ein Volumensensor, der Veränderungen des Volumens erkennt
2. Ein aktivierter Effektor, der den Osmolytflux vermittelt
3. Ein Vermittler zwischen Sensor und Effektor
4. Ein "Gedächtnis" des Originalzellvolumens, das den Endzeitpunkt des regulatorischen Prozesses festlegt

Es ist einleuchtend, dass als Primärsignal für die Volumenregulation die Volumenänderung selbst dient. Wie diese Volumenänderung aber wahrgenommen wird, ist unklar. Dennoch muss ein sehr empfindlicher Sensor für die Zellschwellung vorhanden sein, da schon eine Zunahme des Volumens um 5 % ausreicht, einen volumenregulatorischen Chloridkanal zu öffnen (Hudson und Schultz, 1988). Als mögliche Sensoren wurden mechano-sensitive Kanäle ("stretch-activated channels") diskutiert, die als unspezifische Kationenkanäle bei Volumenzunahme geöffnet werden und evtl. einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursachen (Christensen, 1987; Lansman et al., 1987). Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration könnte dann als Signal für die Aktivierung der Osmolyt-Kanäle und Transporter dienen. Gegen diese Hypothese spricht zum einen, dass die Plasmamembran über zahlreiche Membraneinfaltungen verfügt, sodass eine Zerrung der Membran erst bei großen Volumenänderungen auftreten sollte (Levitan et al., 1995). Zum anderen ist die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  als Signal für den RVD nicht in allen Zelltypen bestätigt worden. In Ehrlich-Ascites-Zellen ist  $\text{Ca}^{2+}$  anscheinend essentiell für die Aktivierung von  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Efflux (Hoffmann, 1986; Hoffmann et al., 1984), während der  $\text{Cl}^-$ -Efflux in intestinalen Epithelzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig zu sein scheint (Hazama und Okada, 1988). Eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde nach hypoosmolarem Stimulus in Astroglia-Primärkulturen (O'Connor und Kimelberg, 1993), nicht aber in C6-Rattengliomzellen beobachtet (Sanchez-Olea et al., 1995). Der  $\text{Cl}^-$ -Efflux aus Astrocyten wurde als vollständig  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig (O'Connor und Kimelberg, 1993) oder aber als  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig (Sanchez-Olea et al., 1995) beschrieben.

Eine weitere Hypothese schlägt eine Beteiligung des Cytoskeletts an der Wahrnehmung und Signaltransduktion von Volumenveränderung vor, da diese zu einer Umorganisation des Cytosketetts führen. So werden z.B. bei Zellschwellung Actin-



## 1 Einleitung

---

Filamente depolymerisiert. Hier könnte wiederum  $\text{Ca}^{2+}$  eine Rolle spielen, da es an die Cytoskelett-Komponente Gelsolin binden kann (Stossel, 1989; Weber und Osborn, 1982). Actin ist über andere Cytoskelett-Komponenten, wie Spectrin und Ankyrin, mit Membranproteinen verbunden. So ist etwa der AE-1 an Ankyrin gebunden (Musch und Goldstein, 1996), der  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher-1 besitzt eine Actin-Bindungsdomäne (Fliegel und Fröhlich, 1993), und auch die Regulation eines Natriumkanals durch Actin ist beobachtet worden (Berdiev et al., 1996). Der RVD kann in PC12-Zellen durch Cytochalasin B gehemmt werden (Cornet et al., 1993), andererseits wird der Efflux von Taurin und Inositol während des RVD von Astrogliazellen nicht durch Cytochalasin B oder D unterdrückt (Moran et al., 1996).

Als weitere Möglichkeit eines Signals wurde die Packungsdichte von Macromolekülen ("molecular crowding") vorgeschlagen (Minton et al., 1992). In diesem Fall stellt die zelluläre Konzentration von Makromolekülen das Signal dar. Eine Veränderung der Packungsdichte könnte die Assoziation bzw. die Dissoziation von Proteinen beeinflussen. Bei Schrumpfung der Zelle wird die Packungsdichte erhöht, was zur Aktivierung einer Proteinkinase führt (Minton et al., 1992), die z.B. den KCl-Cotransport hemmt.

Als Sollwert für die Aktivierung volumenregulatorischer Mechanismen wurde die intrazelluläre Ionenkonzentration vorgeschlagen. In hoher intrazellulärer Konzentration hemmen Elektrolyten den Efflux organischer Osmolyte, was durchaus sinnvoll erscheint (Motais et al., 1997; Emma et al., 1997; Jackson et al., 1996; Nilius et al., 1998). Der zellvolumen-regulierte NKCC1 wird ebenfalls bei hohen intrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration gehemmt und bei niedrigen  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen aktiviert (Robertson und Foskett, 1994; Gillen and Forbush, 1999). Dies könnte sogar erklären, warum ein vorangegangener RVD, der die intrazelluläre Ionenkonzentration absenkt, bei anschließender Erhöhung der Osmolarität einen RVI (u.a. durch NKCC) begünstigt. Der Energiestatus der Zelle könnte bei der Wahl des volumenregulatorischen Mechanismus eine Rolle spielen. So ist der schwellungs-aktivierte Osmolytkanal ATP-abhängig, wobei das ATP anscheinend nur als Ligand dient und nicht gespalten wird (Jackson et al., 1994; Ballatori et al., 1995).

Die Effektoren der Volumenregulation, Transportmoleküle und Enzyme, können über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Hierzu gehören Neusynthese, Insertion in die Membran, Phosphorylierung/Dephosphorylierung und Internalisierung. Die Neusynthese wird durch verstärkte Transkription der entsprechenden Gene erreicht. Sowohl die Cotransporter (BGT-1, TAUT, SMIT) als auch die enzymatischen Reaktionen zur Sorbitol-Synthese werden durch Hyperosmolarität des extrazellulären Mediums hochreguliert (Kwon et al., 1992; Paredes et al., 1992; Uchida et al., 1992; Kwon und Handler, 1995; Yamauchi et al., 1992). Diese Hochregulation wird im Falle der Aldosereductase und des BGT-1 durch ein osmoresponsives Element (ORE) (Smardo et al., 1992; Ferraris et al., 1994; Takenaka et al., 1994) in der Promotorregion der entsprechenden Gene vermittelt. Die Transportaktivität kann aber auch ohne Neusynthese des Transportmoleküls erhöht werden. Aldosteron erhöht die apikale  $\text{Na}^+$ -Resorption in Nieren-Epithelien (Verrey, 1995) durch den amilorid-sensitiven epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC), ohne dass zunächst die mRNA- oder die Protein-Menge erhöht wird (May et al., 1997; Asher et al., 1996). Es wurde aber festgestellt, dass Syntaxine mit dem ENaC interagieren (Saxena et al., 1999) und im *Xenopus*-Modell das Ausmaß von dessen Insertion in die Plasmamembran erhöht wird. Eine zunehmende Anzahl von Experimenten spricht dafür, dass der Einbau von Transportern und Kanälen in die Plasmamembran durch die Proteinkinasen der PKB/SGK-Familie reguliert wird. So wird z.B. die insulin-induzierte Stimulation des Glucosetransports durch eine Aktivierung der PKB vermittelt, welche die Membranlokalisation des Glucosetransporters GLUT4 erhöht (Hajduch et al., 1998; Hill et al., 1999). Auch für die Membranexpression von ENaC wurde gezeigt, dass sie durch eine PKB-ähnliche Kinase, die serum-glucocorticoid-regulierte Kinase SGK1, beeinflusst wird. Eine Coexpression von SGK1 mit ENaC in *Xenopus*-Oocyten führt zu einer erhöhten Aktivität des ENaC (Chen et al., 1999), ohne die Öffnungswahrscheinlichkeit oder Kinetik zu verändern (Alvarez de la Rosa et al., 1999). Dieser Effekt ist unabhängig von einer Phosphorylierung der beta- und gamma-Untereinheiten des ENaC. Hingegen ist im Falle des Wasserkanals AQP-2 die Regulation der Membranlokalisierung von einer Phosphorylierung durch PKA begleitet. Die Membran-Insertion des AQP-2 in Hauptzellen der Niere wird durch Vasopressin ausgelöst, das zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und zur Aktivierung der PKA führt (Katsura et al., 1997). Die Phosphorylierung ist ebenfalls essentiell für eine spätere Endocytose des Kanals.

Auch die Herabregulierung des ENaC kann durch Internalisierung erfolgen. Diese wird durch Ubiquitinylierung erreicht (Abriel et al., 1999). Dies ist ein allgemeiner Mechanismus, mit dem Membranproteine für die Internalisierung und anschließendes Recycling bzw. Abbau markiert werden.

### 1.7 Aufgabenstellung

#### 1.7.1 Molekulare Identität des volumen-sensitiven Osmolyt/Anionen-Kanals

Der Efflux organischer Osmolyte erfolgt durch einen auswärts-gerichteten Anionenkanal (Jackson und Strange, 1993; Roy, 1995). Dieser Kanal wurde von Strange und Jackson "Volume-Sensitive Organic Osmolyte/Anion Channel" (VSOAC) benannt (Strange und Jackson, 1995). Die molekulare Grundlage dieses Kanals ist noch völlig unbekannt, wenn auch einige Moleküle als Kandidaten vorgeschlagen wurden. Hierzu gehören auch die Chloridkanäle CLC-2 und CLC-3 und das  $I_{Cl^-}$ -Protein. Weder CLC-2 noch CLC-3 oder mögliche Heteromultimere dieser Kanäle wurden bisher auf ihre Permeabilität für Osmolyte untersucht. Zunächst sollte der Osmolytefflux an Astrogliaulturen untersucht werden und die Durchführbarkeit einer Expressionsklonierung des Osmolyt-Effluxkanals geprüft werden. Zusätzlich sollten bereits bekannte Kandidaten, die für den Osmolyt-Efflux in Astroglia in Frage kamen, im *Xenopus*-Expressionssystem auf ihre Permeabilität für Taurin und Chlorid untersucht werden.

#### 1.7.2 Charakterisierung des Betain/GABA-Transporters-1

Die meisten GABA-Transporter der GAT-Familie sind bereits ausführlich an *Xenopus laevis*-Oocyten oder an transfizierten Zellen untersucht worden (Kavanaugh et al, 1992; Borden et al., 1992; Mager und Varela, 1993; Rasola et al., 1995; Cammack and Schwartz, 1996; Risso et al., 1996). Hierbei wurden aber beträchtliche Unterschiede in Hinblick auf die Ionen-Cotransport-Stöchiometrie, die Bindungsreihenfolge und die leak- und transport-assoziierten Ströme dieser Transporterfamilie festgestellt (Lester et al., 1994; Sonders and Amara, 1996). Der BGT-1 hingegen war weniger gut charakterisiert, vor allem was sein Substratspektrum und die Transport-Stöchiometrie

## 1 Einleitung

---

betrifft. Dies sollte mit Hilfe radioaktiver Fluxmessungen und elektrophysiologischer Messungen genauer untersucht werden. Darüber hinaus sollte ein Modell der Bindungsreihenfolge der Substrate erstellt werden.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

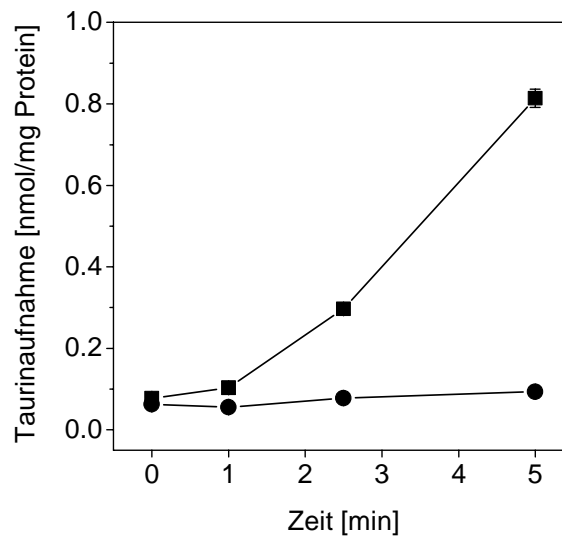
### 2.1 Transportmessungen an Astrogliazellen

Grundlegende Arbeiten zum Efflux organischer Osmolyte aus Astrogliazellen wurden von Strange und Pasantes-Morales durchgeführt (Pasantes-Morales et al., 1990; Jackson und Strange, 1993; Sanchez-Olea et al., 1991; Strange, 1993; Gonzales et al., 1995). Die molekulare Grundlage dieser Osmolyteffluxes ist aber noch völlig unbekannt. In vorliegender Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob Expressionsklonierung des Kanals für den Osmolytefflux mittels Expression von mRNA aus Astrocyten in *Xenopus laevis*-Oocyten möglich war. Zur Vorbereitung war es zunächst nötig, den Efflux der Osmolyte Taurin und *myo*-Inositol an Astroglia-Kulturen zu charakterisieren. Nach dem Protokoll der Gruppe um Strange (Jackson und Strange, 1993) wurde die Osmolarität des normalen Mediums DMEM/10 % FCS zwei Tage vor der Messung durch Zugabe von NaCl von ca. 300 mOsmol/l auf 450 mOsmol/l erhöht. Durch diesen hypertonen Schock sollte einerseits die spätere Vorbeladung mit Osmolyten erleichtert werden und andererseits ein hypoosmotischer Schock durch Rückkehr zu normaler Osmolarität erreicht werden.

#### 2.1.1 Messung der Na<sup>+</sup>-unabhängigen Taurinaufnahme an astrogliareichen Primärkulturen

Sollte der Flux von Osmolyten auf Diffusion durch einen Kanal beruhen, würde dessen „Netto-Richtung“ durch Lage und Neigung des Konzentrationsgefälles bestimmt. Daher sollte es prinzipiell möglich sein, den Flux durch einen Osmolytkanal als Netto-Influx zu messen. Um eine Taurinaufnahme durch den Na<sup>+</sup>-abhängigen Taurintransporter zu unterbinden, wurde der Taurinflux mit einem Na<sup>+</sup>-freien Puffer gemessen. Die Zellen wurden nach der hypertonen Vorinkubation in einem Na<sup>+</sup>-freien, cholinhaltigen Transportpuffer inkubiert, der 1 mM Taurin und [<sup>3</sup>H]Taurin (18 pM; 12 kBq/mmol spezifische Aktivität) enthielt. Nach 5-minütiger Inkubation unter isoosmotischen Bedingungen konnte in den Zellen kaum aufgenommenes Taurin nachgewiesen werden (ca. 30 pmol pro mg Protein), während nach 5-minütiger Inkubation unter hypoosmotischen Bedingungen bereits eine Aufnahme von ca. 800 pmol Taurin pro mg Protein gemessen werden konnte (Abb. 2). Die Verringerung der

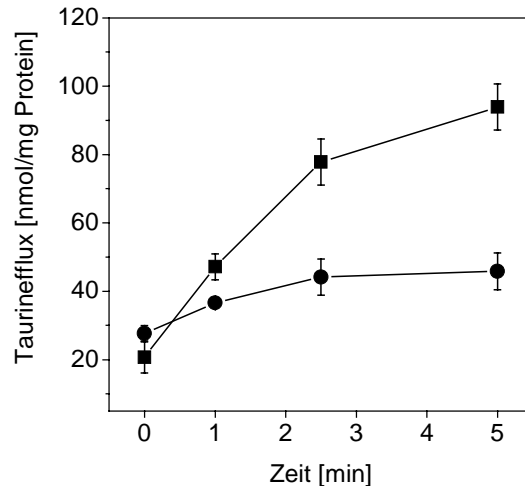
Osmolarität um 150 mOsmol/l führte also zu einer Öffnung des Osmolytkanals und damit zu verstärktem Influx von Taurin.



**Abb. 2.** Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Taurin in mAPK aus  $\text{Na}^+$ -freiem Medium. Kulturalter 20 Tage, 48h Vorinkubation in hypertonem Medium (450 mOsmol/l; DMEM/10 % FCS + NaCl). Die Aufnahme wurde in einem  $\text{Na}^+$ -freien cholinhaltigen Transportpuffer (1 mM Taurin) gemessen, dessen Osmolarität 450 mOsmol/l (isoosmolar, ●) bzw. 300 mOsmol/l (hypoosmolar, ■) betrug. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Aufnahme durch Waschen der Zellen und anschließende Lyse in 0.1 M HCl gestoppt.

### 2.1.2 Messung des Taurineffluxes aus vorbeladenen astrogliareichen Primärkulturen

Für die Messung des Effluxes von Taurin wurden die Zellen zwei Stunden vor Beginn der Messung mit radioaktivem Taurin vorbeladen. Hierzu wurde ein glucosehaltiger Puffer mit 12  $\mu\text{M}$  Taurin/[ $^3\text{H}$ ]Taurin verwendet. Nachfolgend wurde extrazelluläres [ $^3\text{H}$ ]Taurin durch mehrfaches Waschen der Zellen entfernt. Der Efflux wurde dann unter Beibehaltung der Osmolarität (450 mOsmol/l) oder nach osmotischem Schock (300 mOsmol/l) durch Probennahme aus dem Überstand bestimmt. Der Efflux von Taurin wurde aufgrund der in den aliquoten Proben enthaltenen Radioaktivität auf die Gesamtmenge hochgerechnet. Unter isoosmotischen Bedingungen wurde innerhalb von 5 min ein basaler Efflux von ca. 20 nmol pro mg Protein gemessen, während unter hypoosmotischen Bedingungen ein Efflux von über 70 nmol Taurin pro mg Protein nachgewiesen wurde (Abb. 3). Die Verringerung der Osmolarität um 150 mOsmol/l führte also zu verstärktem Efflux von Taurin.

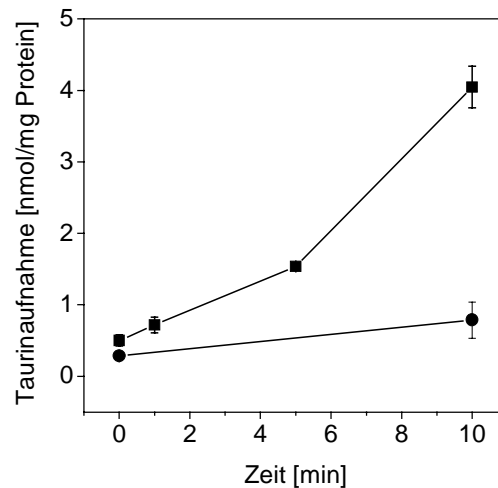


**Abb. 3.** Efflux von [ $^3\text{H}$ ]Taurin aus mAPK. Kulturalter 20 Tage, 48h Vorinkubation in hypertonem Medium (450 mOsmol/l; DMEM/10 % FCS + NaCl). Die Zellen wurden 2 h lang in einem glucosehaltigen isoosmotischen Puffer, der 12  $\mu\text{M}$  Taurin enthielt, mit [ $^3\text{H}$ ]Taurin vorbeladen. Für die Effluxmessung wurden die Zellen in isoosmolarem (450 mOsmol/l, ●) bzw. hypoosmolarem (300 mOsmol/l, ■) Transportpuffer inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden aliquote Proben des Transportpuffers entnommen und die bestimmte [ $^3\text{H}$ ]Taurin-Menge auf das Gesamtvolumen des Transportpuffers umgerechnet.

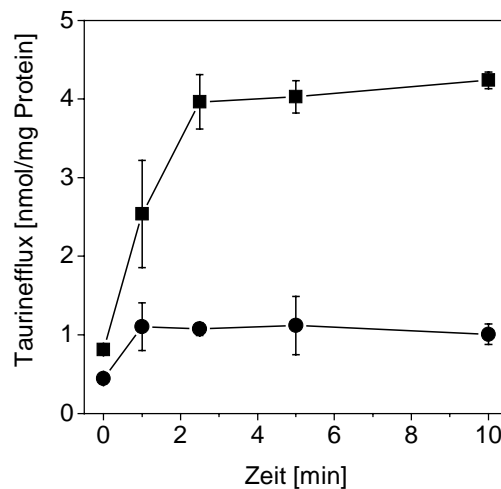
### 2.1.3 Messung der Taurinaufnahme und des Taurin- und *myo*-Inositol-Effluxes an C6-Rattengliomzellen

Zelllinien haben gegenüber Primärkulturen den Vorteil, dass sie wegen ihres schnellen Wachstums kurzfristig und in grösseren Mengen verfügbar sind. Daher erschien es sinnvoll, eine astrogliale Zelllinie zu verwenden, die ebenfalls schwellungsaktivierbaren Taurinefflux zeigt. Daher wurde die Rattengliomzelllinie C6 (Benda et al., 1968) ausgewählt, an der der Osmolytefflux bereits beobachtet wurde (Jackson et al., 1994). Die  $\text{Na}^+$ -unabhängige Aufnahme von Taurin wurde unter denselben Bedingungen gemessen wie bei den Primärkulturen. Nach 10 min Inkubation unter isoosmotischen Bedingungen wurde in den lysierten Zellen ca. 0.5 nmol Taurin pro mg Protein nachgewiesen, während die Zellen nach 10-minütiger Inkubation unter hypoosmotischen Bedingungen bereits ca. 3.6 nmol Taurin pro mg aufgenommen hatten (Abb. 4).

Die Messungen des Taurineffluxes wurden ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen durchgeführt. Unter isoosmotischen Bedingungen wurde innerhalb von 10 min ein basaler Efflux von ca. 0.6 nmol pro mg Protein gemessen, während unter hypoosmotischen Bedingungen ein Efflux von 3.4 nmol Taurin pro mg Protein nachgewiesen wurde (Abb. 5).



**Abb. 4.** Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Taurin in C6-Rattengliomzellen aus Na<sup>+</sup>-freiem Medium. Kulturalter 20 Tage, 48 h Vorinkubation in hypertonem Medium (450 mOsmol/l; DMEM/10 % FCS + NaCl). Die Aufnahme wurde in einem Na<sup>+</sup>-freien cholinhaltigen Transportpuffer (1 mM Taurin) gemessen, dessen Osmolarität 450 mOsmol/l (isoosmolar, ●) bzw. 300 mOsmol/l (hypoosmolar, ■) betrug. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Aufnahme durch Waschen der Zellen und anschließende Lyse in 0.1 M HCl gestoppt.

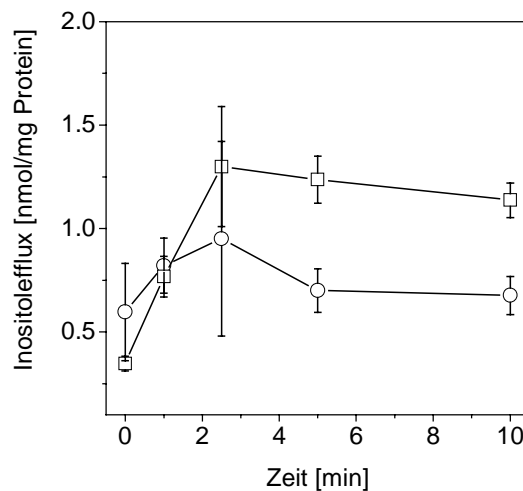


**Abb. 5.** Efflux von [<sup>3</sup>H]Taurin aus C6-Rattengliomzellen nach 48h Vorinkubation in hypertonem Medium 450 mOsmol/l (DMEM/10 % FCS+NaCl). Die Zellen wurden 2 h lang in einem glucosehaltigen isoosmotischen Puffer, der 12 μM Taurin enthielt, mit [<sup>3</sup>H]Taurin vorbeladen. Für die Effluxmessung wurden die Zellen in isoosmolarem (450 mOsmol/l, ●) bzw. hypoosmolarem (300 mOsmol/l, ■) Transportpuffer inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden aliquote Proben des Transportpuffers entnommen und die bestimmte [<sup>3</sup>H]Taurin-Menge auf das Gesamtvolumen des Transportpuffers umgerechnet.

Bei Aufnahme und Efflux liegt die Menge transportierten Taurins in der gleichen Größenordnung. Die Geschwindigkeiten unterscheiden sich jedoch deutlich. Beim Efflux unter hypotonen Bedingungen wurden ca. 2 nmol/min freigesetzt, während die Aufnahmegeschwindigkeit unter 0.5 nmol/min betrug.



*Myo*-Inositol stellt einen weiteren sehr bedeutenden Osmolyten im Gehirn dar. Der *myo*-Inositolefflux wurde unter denselben Bedingungen wie der Taurinefflux gemessen, nämlich nach einer zweistündigen Vorbeladung. Nach 10 min Inkubation unter isoosmotischen Bedingungen wurden 0.80 nmol *myo*-Inositol pro mg Protein freigesetzt, während nach 10-minütiger Inkubation unter hypoosmotischen Bedingungen ca. 1.2 nmol *myo*-Inositol pro mg Protein gemessen werden konnte (Abb. 6). Dies entspricht einem Efflux von ca. 3.6 % der bei Vorbeladung aufgenommenen *myo*-Inositolmenge.



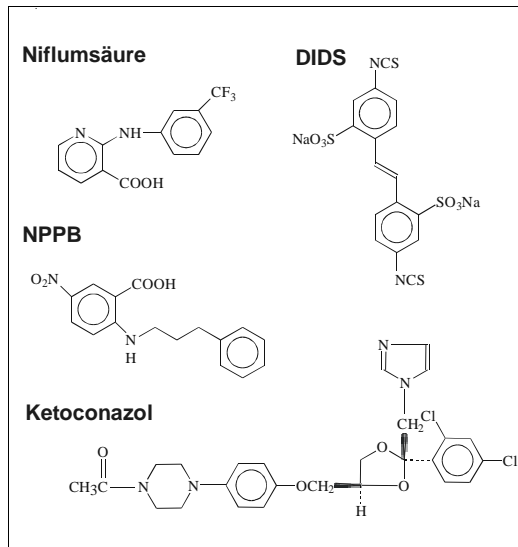
**Abb. 6.** Efflux von [ $^3\text{H}$ ]*myo*-Inositol aus C6-Rattengliomzellen nach 48h Vorinkubation in hypertonem Medium 450 mOsmol/l (DMEM/10 % FCS + NaCl). Die Zellen wurden 2 h lang in einem glucosehaltigen isoosmotischen Puffer, der 12  $\mu\text{M}$  *myo*-Inositol enthielt, mit [ $^3\text{H}$ ]*myo*-Inositol vorbeladen. Für die Effluxmessung wurden die Zellen in isoosmolarem (450 mOsmol/l, O) bzw. hypoosmolarem (300 mOsmol/l, □) Transportpuffer inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden aliquote Proben des Transportpuffers entnommen und die bestimmte [ $^3\text{H}$ ]*myo*-Inositol-Menge auf das Gesamtvolumen des Transportpuffers umgerechnet.

#### 2.1.4 Hemmung des schwellungsaktivierten Taurineffluxes durch Anionenkanalblocker

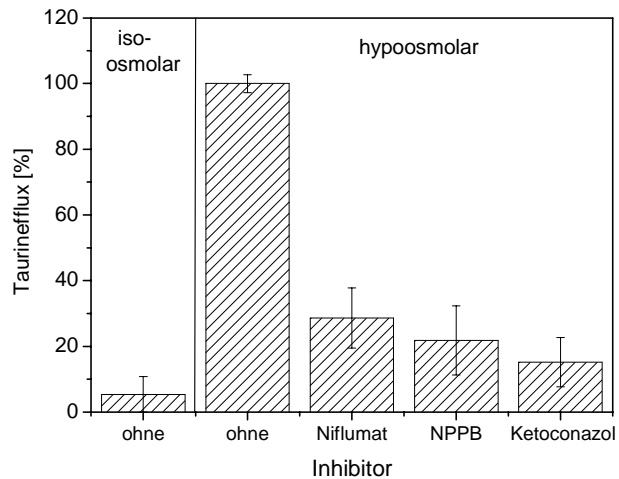
Der Osmolytefflux wird von Anionenkanalblockern (wie z.B. DIDS, Niflummat und NPPB; Abb. 7A) und von Hemmstoffen der Lipoxygenase (wie z.B. Ketoconazol; Abb. 7A) gehemmt. Die hemmende Wirkung dieser Substanzen wurde bereits am Osmolytefflux von Astrogliazellen beobachtet (Sanchez-Olea et al., 1991; Jackson und Strange, 1993; Pasantes-Morales et al., 1994; Gonzales et al., 1995). Zur Charakterisierung des Taurineffluxes von C6-Zellen wurde dessen Hemmbarkeit durch einige dieser Inhibitoren untersucht. Hierzu wurden die Inhibitoren Niflummat (500  $\mu\text{M}$ ), NPPB (100  $\mu\text{M}$ ) und Ketoconazol (50  $\mu\text{M}$ ) 5 min

vor Beginn der Messung auf die C6-Zellen gegeben. Anschließend wurde der Taurinefflux ohne und mit Inhibitoren unter hypoosmotischen Bedingungen gemessen. Der Taurinefflux wurde durch alle drei Inhibitoren um mindestens 70 % reduziert (Abb. 7B).

**A**



**B**

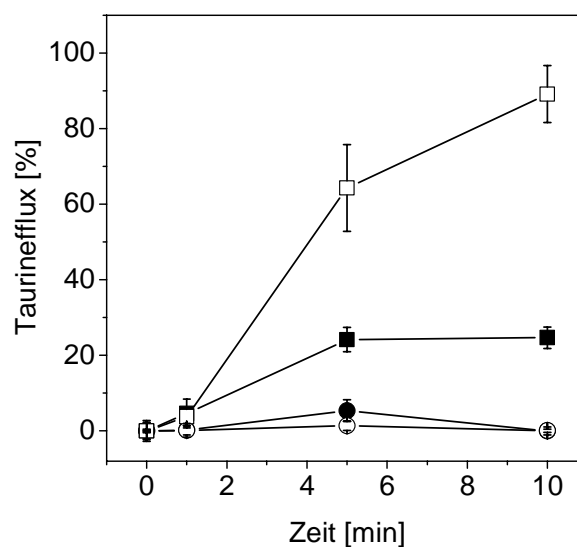


**Abb. 7.** A: Formeln der Inhibitoren NPPB, Niflumsäure, Ketoconazol und DIDS. B: Einfluss von Inhibitoren auf den Efflux von [<sup>3</sup>H]Taurin aus C6-Rattengliomzellen. Die Zellen wurden 10 min unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und der Efflux gemessen: Isoosmolar; hypoosmolar, in Gegenwart von 500  $\mu$ M Niflummat, 100  $\mu$ M NPPB oder 50  $\mu$ M Ketoconazol ( $M \pm SEM$ ). Der Maximalefflux unter hypoosmolaren Bedingungen entspricht hier 100 %.

### 2.1.5 Messung des Taurineffluxes mit und ohne hypertone Vorinkubation aus C6-Rattengliomzellen

Nach den Arbeiten der Gruppe um Pasantes-Morales können Astrogliazellen auch ohne hypertone Vorinkubation ausreichend vorbeladen werden (Pasantes-Morales und Schousboe, 1989). Beide Methoden sollen hier direkt verglichen werden. Im ersten Ansatz wurden die Zellen, wie oben beschrieben, zwei Tage lang bei 450 mOsmol/l inkubiert. Im zweiten Ansatz wurden die Zellen dagegen in normalem Medium bei 300 mOsmol/l inkubiert. Entsprechend wurde die 2-stündige Vorbeladung mit [<sup>3</sup>H]Taurin unter Beibehaltung der Osmolarität durchgeführt und danach die aufgenommene Radioaktivität bestimmt. In hypertonem Medium betrug die Aufnahme 86 nmol/mg Protein, in isotonem Medium dagegen nur 52 nmol/mg Protein. Für die Effluxmessungen wurden die Zellen des ersten Ansatzes unter einer Osmolarität von 450 mOsmol/l für isoosmotische Bedingungen und von 300 mOsmol/l für

hypoosmotische Bedingungen inkubiert. Dementsprechend wurden die Zellen aus dem zweiten Ansatz unter einer Osmolarität von 300 mOsmol/l für isoosmotische Bedingungen und von 150 mOsmol/l für hypoosmotische Bedingungen inkubiert. Im ersten Ansatz betrug der Efflux nach 10 minütiger hypotoner Inkubation nur ca. 25 % der vorbeladenen Taurinmenge. Im zweiten Ansatz dagegen lag der Efflux mit 90 % der vorbeladenen Taurinmenge wesentlich höher (Abb. 8). Dies deutet auf eine Hemmung des Effluxes durch hypertone Vorinkubation hin. Aufgrund der einfacheren Handhabung wurde für die anschließenden Expressionsstudien in *Xenopus laevis*-Oocyten die mRNA aus Kulturen isoliert, die in Standard-DME-Medium mit 10 % FCS gehalten worden waren.



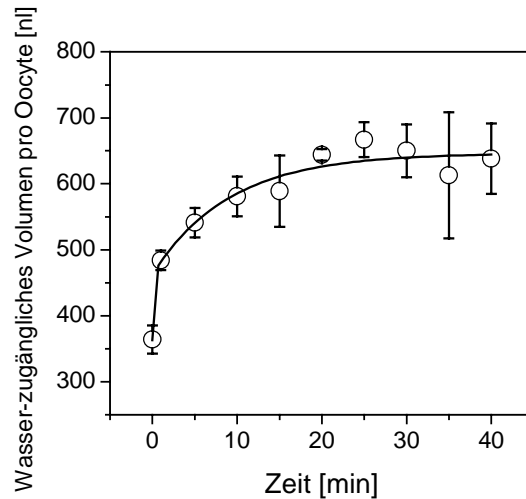
**Abb. 8.** Efflux von [ $^3\text{H}$ ]Taurin aus C6-Rattengliomzellen. Vergleich der Effluxgeschwindigkeiten mit (■, ●) und ohne (□, ○) 48 h Vorinkubation in hypertonem Medium 450 mOsmol/l (DMEM/10 % FCS+NaCl). Für die Effluxmessung wurden die Zellen in - im Vergleich zum Vorinkubationspuffer - isoosmolarem (450 mOsmol/l, ●, bzw. 300 mOsmol/l, ○) oder hypoosmolarem (300 mOsmol/l, ■, bzw. 150 mOsmol/l, □) Transportpuffer inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden aliquote Proben des Transportpuffers entnommen und die bestimmte [ $^3\text{H}$ ]Taurin-Menge auf das Gesamtvolumen des Transportpuffers umgerechnet.

## 2.2 Messungen an *Xenopus*-Oocyten

Von *Xenopus laevis*-Oocyten ist bekannt, dass sie über volumensensitive Chloridkanäle verfügen. Diese  $I_{Cl_{swell}}$  genannte Leitfähigkeit ist allerdings nur nach manueller Defollikulierung der Oocyten messbar (Ackerman et al., 1994). Vor Beginn einer Expressionsklonierung eines volumensensitiven Osmolyteffluxkanals sollte zunächst untersucht werden, ob die Oocyten eine starke Verringerung der Osmolarität des Mediums vertragen und wie diese sich auf das Volumen der Oocyten auswirkt.

### 2.2.1 Bestimmung der Volumenveränderung von Oocyten durch hypotonen Schock

Das für Wasser zugängliche Volumen von Oocyten wurde mittels Äquilibration mit  $^3\text{H}_2\text{O}$  bestimmt. Durch Silikonölzentrifugation wurden die äquilibrierten Oocyten vom Puffer getrennt. Das Volumen der Oocyten ließ sich aus der in den Oocyten enthaltenen Radioaktivität berechnen. Zunächst wurde das durchschnittliche wasser-zugängliche Volumen von *Xenopus laevis*-Oocyten bestimmt. Es betrug 364 nl pro Oocyte (SEM:  $\pm 21$  nl). Der durchschnittliche Durchmesser der Oocyten betrug nach Abschätzung mittels Millimeterpapier ca. 1 mm und daraus ergab sich ein Volumen von etwa 525 nl. Das wasser-zugängliche Volumen von 364 nl entspräche daher etwa 70 % des Gesamtvolumens. Nach Verringerung der Osmolarität um 50 % schwoll das wasser-zugängliche Volumen der Oocyten innerhalb von 1 min auf 484 nl pro Oocyte (SEM:  $\pm 15$  nl) an. Ein maximales Volumen von 667 nl pro Oocyte (SEM:  $\pm 27$  nl) wurde nach 25 min erreicht (Abb. 9). Dies entspricht einer Volumenzunahme auf 183 % gegenüber isotonen Bedingungen. Bei einer Halbierung der Osmolarität ist eine Verdoppelung des Zellvolumens zu erwarten. Oocyten verhalten sich unter diesen Bedingungen also ähnlich wie Säugetierzellen.



**Abb. 9.** Verlauf der Volumenänderung von Oocyten nach hypotonem Schock. Nach 15 min Äquilibration in  $^3\text{H}_2\text{O}$ -haltigem Puffer wurde die Osmolarität durch Zugabe von  $^3\text{H}_2\text{O}$  gleicher Volumenaktivität um 50 % verringert. Nach Silikonölzentrifugation wurde die in den Oocyten enthaltene  $^3\text{H}_2\text{O}$ -Menge bestimmt und daraus das wasser-zugängliche Volumen berechnet.

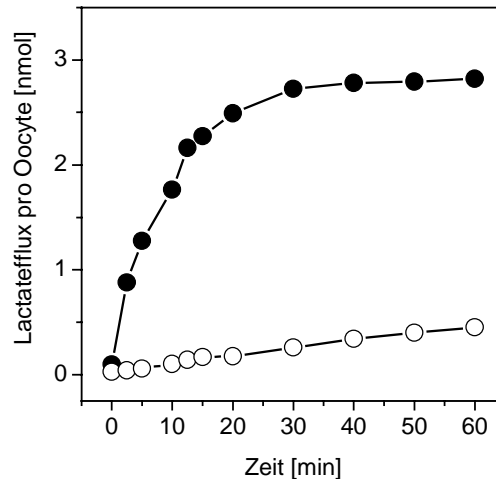
### 2.2.2 Messung der Taurinaufnahme in RNA-injizierte Oocyten

Zunächst wurden 50 ng der aus Astrogliazellen isolierten mRNA pro Oocyte injiziert. Nach 3 bis 5 d Expression wurden Transportmessungen durchgeführt. Um den Taurinflux an Oocyten zu untersuchen, musste zunächst eine geeignete Messmethode gefunden werden. Zunächst wurde die  $\text{Na}^+$ -unabhängige Aufnahme von Taurin gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu wasser-injizierten Oocyten festgestellt werden. Um den Taurinefflux zu messen, musste eine Möglichkeit der Vorbeladung mit Taurin gefunden werden. Die Oocytenmembran war jedoch nahezu impermeabel für Taurin. Nach 1 h Inkubation mit radioaktivem Taurin konnte nur ein geringer Anteil (< 1 %) der Radioaktivität in den Oocyten nachgewiesen werden. Auch nach Inkubation über Nacht konnte nur eine minimale Aufnahme von Taurin erreicht werden. Daraufhin wurde die Vorbeladung durch Injektion des Substrates durchgeführt.

### 2.2.3 Messung der Substratefflux nach Vorbeladung durch Injektion

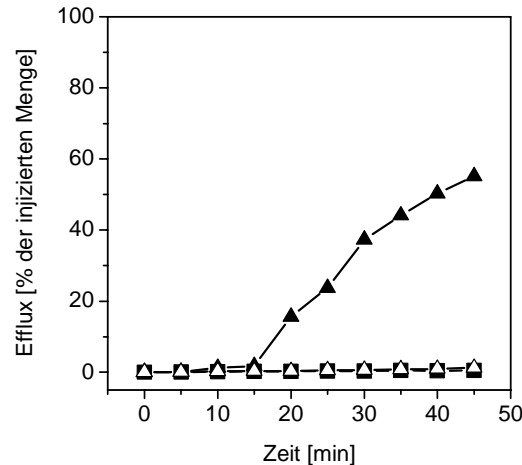
Um die Methode der Vorbeladung durch Injektion an einem bekannten Transportprotein zu testen (positive Kontrolle), wurde die cRNA des Monocarboxylattransporters rMCT1 in den

Oocyten exprimiert. Als Substrat wurde Lactat injiziert und dessen Efflux aus den Oocyten unter isotonen Bedingungen gemessen. Hier wurden 55 % des injizierten Substrats innerhalb von 30 min freigesetzt, während Kontroll-oocyten nur 3 % des Substrates freisetzen (Abb. 10).



**Abb. 10.** Lactatefflux aus rMCT1-exprimierenden Oocyten. Die Oocyten wurden durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die 100 mM Lactat und 3.7 kBq/ $\mu$ l [ $^{14}$ C]Lactat in ND96 (pH 7.6) enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit ND96 wurden je 5 Oocyten in 1 ml ND96 inkubiert. Pro Messpunkt wurden 100  $\mu$ l dieses Transportpuffers zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Nicht-injizierte Oocyten ○, rMCT1-exprimierende Oocyten ●.

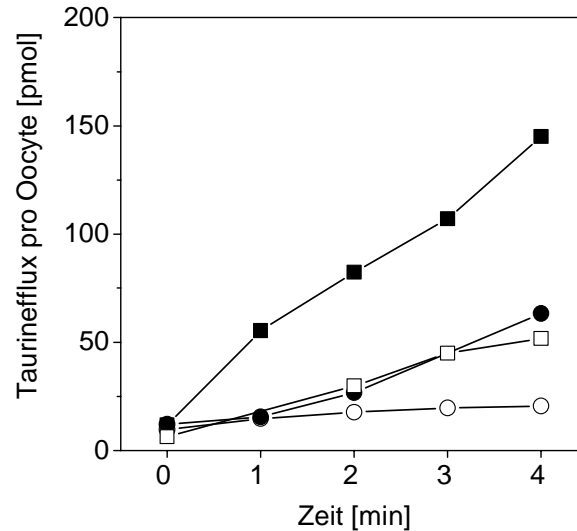
Um sicherzustellen, dass das injizierte Substrat Taurin nicht in den Oocyten abgebaut wird oder irreversibel gebunden wird, wurde der Efflux von injiziertem Taurin durch eine Toxinpore untersucht. Hierzu wurden die Oocyten mit dem Bakterientoxin Streptolysin S inkubiert, das Poren von weniger als 3 nm bildet (Buckingham und Duncan, 1983). Während der 45-minütigen Inkubation der vorbeladenen Oocyten mit Streptolysin S (5000 U/ml) unter isotonen Bedingungen wurden ca. 60 % des injizierten Taurins freigesetzt (Abb. 11). Dies entspricht etwa der Menge an injiziertem Lactat, die im vorangegangenen Experiment durch den Monocarboxylattransporter freigesetzt wurde. Eine Lyse der Oocyten durch Streptolysin S während der Inkubationszeit kann ausgeschlossen werden, da unter identischen Bedingungen durch die Streptolysinporen nur 1 % eines größeren Substrates, Inulin, freigesetzt wurde.



**Abb. 11.** Efflux von Taurin oder Inulin aus Streptolysin-behandelten Oocyten. Die Oocyten wurden durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die entweder 100 mM Taurin und 24 kBq/μl [<sup>3</sup>H]Taurin in HEPES-Puffer oder 1.3 mM Inulin und 37 kBq/μl [<sup>3</sup>H]Inulin in HEPES-Puffer enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit ND96 wurden je 5 Oocyten in 200 μl ND96 ohne (■) oder mit Streptolysin S (5000 U/ml) (▲; Δ) inkubiert. Pro Messpunkt wurden 15 μl dieses Transportpuffers zur Radioaktivitätsmessung entnommen. (Taurinefflux: ▲, ■; Inulinefflux: Δ)

#### 2.2.4 Taurinefflux aus mRNA-injizierten Oocyten

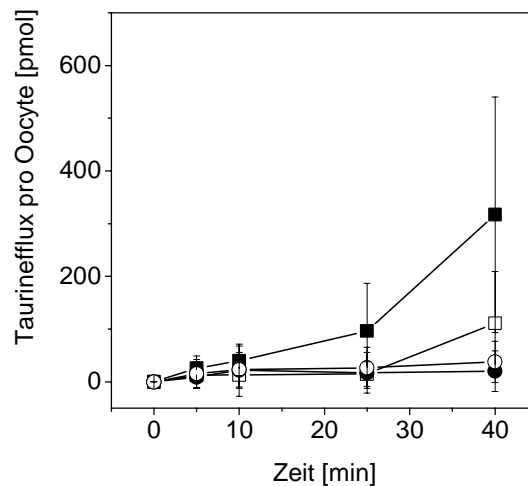
Pro Oocyte wurden 50 ng der aus rAPK isolierten mRNA injiziert. Nach 3 bis 5 Tagen Expression wurden die Transportmessungen durchgeführt. Die Oocyten wurden dafür durch Injektion von Substrat vorbeladen. Anschließend wurde der Taurinefflux bis zu 4 min unter isotonen und unter 50 % hypotonen Bedingungen gemessen. Der Taurinefflux mRNA-injizierter Oocyten schien deutlich höher zu sein als der aus wasser-injizierten Oocyten, sowohl unter isotonen als auch unter hypotonen Bedingungen. Allerdings wurden in den ersten 4 min nur 3 % der injizierten Taurinmenge freigesetzt (Abb. 12). Eine längere Inkubationszeit erschien daher sinnvoll.



**Abb. 12.** Taurinefflux aus mRNA-injizierten Oocyten. Die Oocyten wurden durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die 100 mM Taurin und 24 kBq/ $\mu$ l [ $^3$ H]Taurin in HEPES-Puffer enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit OR2<sup>+</sup> wurden je 5 Oocyten in 1 ml OR2<sup>+</sup> (isoton) oder in 1 ml 1:2 mit Wasser verdünntem OR2<sup>+</sup> (hypoton) inkubiert. Je 100  $\mu$ l dieses Transportpuffers wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Isoton: ○, ●; hypoton: □, ■; Wasser-injiziert: ○, □; mRNA-injiziert, ●, ■.

Da die mRNA-injizierten Oocyten nach längerer Inkubation unter hypotonen Bedingungen sehr fragil erschienen und Ausstülpungen bekamen („Dotternasen“), wurde weiterhin untersucht, ob es möglich ist, zwischen mRNA-injizierten Oocyten und Wasser-injizierter Oocyten einen signifikanten Unterschied in der Effluxrate auch unter isotonen Bedingungen festzustellen. Um ferner auszuschließen, dass bei hypotoner Inkubation das Platzen einer Oocyte während der Inkubationszeit zu einer Verfälschung der proteinvermittelten Taurineffluxes führt, wurden Messungen an einzelnen Oocyten durchgeführt (Abb. 13).





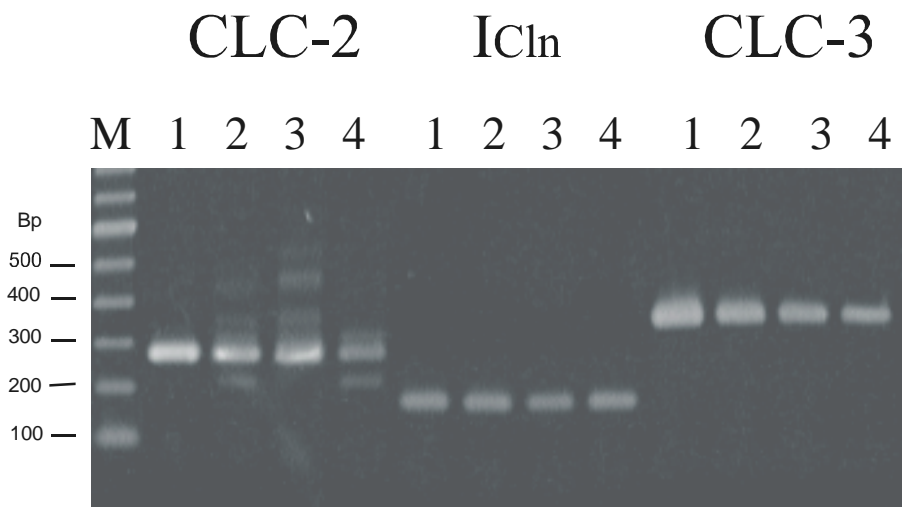
**Abb. 13.** Taurinefflux aus mRNA-injizierten Oocyten. Die Oocyten wurden durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die 100 mM Taurin und 24 kBq/ $\mu$ l [ $^3$ H]Taurin in HEPES-Puffer enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit OR2<sup>+</sup> wurden je 5 Oocyten in 1 ml OR2<sup>+</sup> (isoton) oder in 1 ml 1:2 mit Wasser verdünntem OR2<sup>+</sup> (hypoton) inkubiert. Je 100  $\mu$ l dieses Transportpuffers wurden zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Isoton ○, ●; hypoton □, ■; Wasser-injiziert ○, □; mRNA-injiziert, ● ■. (M  $\pm$  SD)

Die Messung des Taurineffluxes an einzelnen Oocyten über einen Zeitraum von bis zu 40 min ergab, dass der Mittelwert für den Taurinefflux der mRNA-injizierten Oocyten unter hypotonen Bedingungen generell höher war als der der Kontrollloocyten. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Oocyten einer Messreihe so hoch, dass sich die Standardabweichungen überlappten. Unter isotonen Bedingungen konnte in diesem Experiment kein signifikanter Unterschied zwischen mRNA-injizierten Oocyten und Kontrollloocyten festgestellt werden (Abb. 13). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass mRNA aus C6-Gliomzellen einen Taurineffluxkanal codiert, der in Oocyten exprimiert wird. Die starken Schwankungen zwischen verschiedenen Experimenten ließen jedoch eine Expressionsklonierung nicht zu. Der dargestellte Efflux könnte durch bereits bekannte Kanalproteine vermittelt werden. Der hier entwickelte Versuchsaufbau ermöglicht natürlich auch eine Untersuchung der Taurinpermeabilität bereits bekannter Kanalproteine.

### 2.2.5 Expression der mRNA der Kanalproteine CLC-2, CLC-3 und I<sub>Cl<sub>in</sub></sub> im Gehirn

Aufgrund der Sensitivität des Taurineffluxes gegenüber dem Anionenkanal-Inhibitor NPPB und der Aktivierung durch Zellschwellung wurden die Chloridkanäle CLC-2, CLC-3 und I<sub>Cl<sub>in</sub></sub>

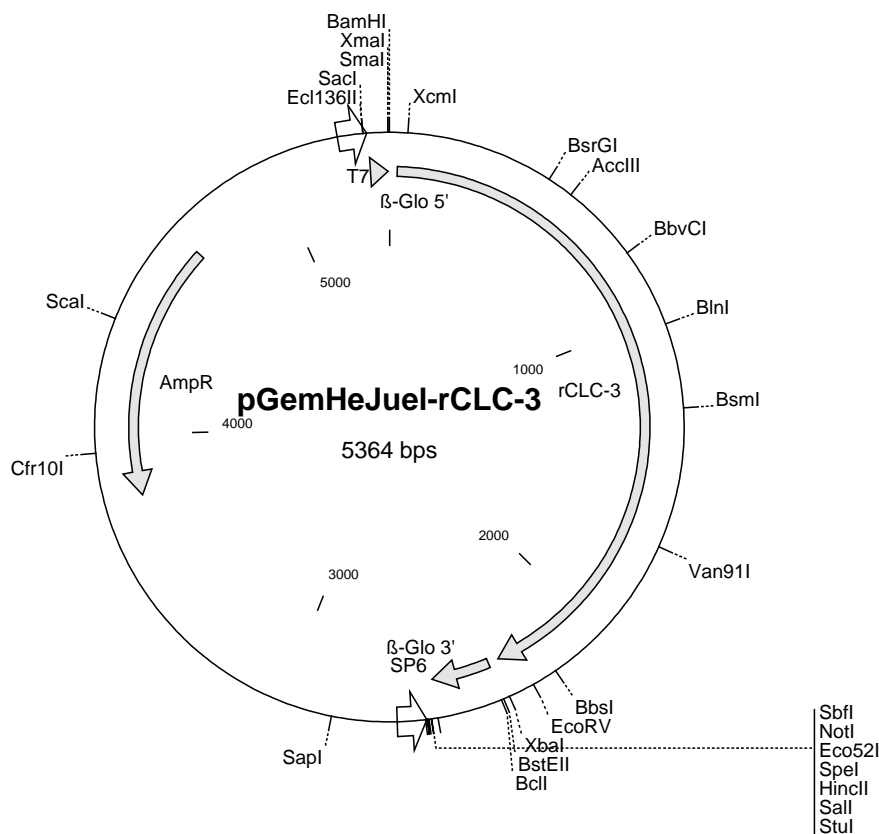
ausgewählt. Wenn der Taurinefflux aus Astrocyten durch einen dieser Kandidaten erfolgen sollte, setzt das natürlich dessen Expression in diesen Zellen voraus. Zunächst wurde daher die mRNA-Expression dieser Kandidaten im Gehirn und in kultivierten Gehirnzellen mittels RT-PCR verifiziert. Hierzu wurde RNA aus fetalem und adultem Gesamtgehirn, sowie aus neuronenreicher und astrogliareicher Primärkultur isoliert. Diese RNA wurde für die Synthese von cDNA verwendet, die in einer anschließenden PCR eingesetzt wurde. Als Positivkontrollen diente Plasmid-DNA, die die jeweilige cDNA-Sequenz enthielt. Überprüfung der PCR-Produkte mittels Restriktionsanalyse ergab in allen Fällen ein korrektes Restriktionsmuster (Gele nicht gezeigt). Die mRNA aller drei Kandidaten konnte sowohl in fetalem und adultem Rattenhirn als auch in den Primärkulturen nachgewiesen werden. Für den CLC-2 sind bisher zwei Spleißvarianten beschrieben worden, die auf Anwesenheit (CLC-2L) bzw. Fehlen (CLC-2S) von Exon 20 beruhen (Chu und Zeitlin, 1997). Daher wurden die Primer so ausgewählt, dass diese beide Spleißvarianten unterschieden werden konnten. Beide Spleißvarianten konnten in Gesamtgehirn und astrogliareicher Primärkultur detektiert werden, während in neuronenreicher Primärkultur nur die größere Spleißvariante CLC-2L nachweisbar war (Abb. 14).



**Abb. 14.** Agarosegel-Analyse der RT-PCR-Produkte zum Nachweis von CLC-2-,  $I_{ClIn}$ - und CLC-3-mRNA. Als Matrizen wurden verwendet: (1) Kontrollplasmide; (2) mRNA aus adultem Rattenhirn; (3) mRNA aus neuronen-reicher Primärkultur; (4) mRNA aus astroglia-reicher Primärkultur. Die Größe der erwarteten RT-PCR-Produkte betrug 275 bp für CLC-2L, 215 bp für CLC-2S, 177 bp für  $I_{ClIn}$  und 336 bp für CLC-3. Als DNA-Standard diente eine 100 bp-Leiter (M).

### 2.2.6 Klonierung der CLC-3-cDNA von mRNA aus astrogliareicher Primärkultur

Aus astrogliareicher Ratten-Primärkultur wurde mRNA isoliert und zur cDNA-Synthese verwendet. Anschließend wurde diese cDNA in einer PCR eingesetzt. Um die Gefahr von Mutationen während der PCR zu minimieren, wurde Pfu-DNA-Polymerase verwendet, die aufgrund einer intakten 3'→5' Exonucleaseaktivität mit sehr geringer Fehlerrate polymerisiert. Das 2318 bp lange PCR-Produkt wurde in den Oocyten-Expressionvektor pGemHeJuel eingefügt (Abb. 15).



**Abb. 15.** Karte des Plasmids zur Expression des Kanals rCLC-3 in *Xenopus*-Oocyten

Die Sequenzierung der cDNA ergab, dass die DNA-Sequenz mit der von Kawasaki et al. (1994) publizierten Sequenz identisch ist, bis auf einen Polymorphismus, der in zwei unabhängigen PCR-Produkten gefunden wurde. Diese Substitution von G durch A an Position 2146 der unten gezeigten Sequenz führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 716 der Aminosäuresequenz (Abb. 16).

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

1 atgacaaatg gaggcagcat taacagctcc acacacttgc  
M T N G G S I N S S T H L

41 tggatctttt ggatgagccc atcccaggtg tcggtacata  
L D L L D E P I P G V G T

81 cgatgatttc catactattg actgggtgcg agaaaagtgt  
Y D D F H T I D W V R E K C

121 aaggacagag aaaggcacag acggatcaac agtaaaaaaa  
K D R E R H R R I N S K K  
\*

161 aagaatcagc atgggaaatg acaaaaagtc tatatgatgc  
K E S A W E M T K S L Y D  
C

201 ttggtcagga tggctttag ttacactgac gggattggcg  
A W S G W L V V T L T G L A

241 tcaggggvcg tggctggatt gatagacatt gctgctgact  
S G A L A G L I D I A A D

281 ggatgactga cctgaaagag ggcactctgcc tcagtgcatt  
W M T D L K E G I C L S A

321 gtggtacaac catgaacagt gttggtgggg ctctaagag  
L W Y N H E Q C C W G S N E

361 acgacgtttg aagagagggg taaatgtcca cagtggaaaa  
T T F E E R D K C P Q W K

401 catgggcaga gttaatcata ggtcaagcag agggtcctgg  
T W A E L I I G Q A E G P

441 atcttatatc atgaactaca tcatgtacat cttttgggct  
G S Y I M N Y I M Y I F W A

481 ttgagttttg cttttcttgc agtttccttg gtgaaagtat  
L S F A F L A V S L V K V

521 ttgctccgta tgcctgtggc tccggaattc cagagattaa  
F A P Y A C G S G I P E I

561 aactatthtg agtggattca tcatcagagg ttacttggga  
K T I L S G F I I R G Y L G

601 aagtggactt taatgattaa aaccatcaca ttagtgctgg  
K W T L M I K T I T L V L

641 ctgtggcatc aggtttgagt ttaggaaaag aaggtccttt  
A V A S G L S L G K E G P

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

681 ggtacatggt gcctgctgct gtggaaatat cttttcctac  
L V H V A C C C G N I F S Y

721 ctctttccaa agtatagcac aaatgaagct aaaaagaggg  
L F P K Y S T N E A K K R

761 aggtgctgtc agccgcctca gctgctgggtg tctctgtggc  
E V L S A A S A A G V S V

801 ttttggtgcg ccaattggag gagtgctttt tagtttggag  
A F G A P I G G V L F S L E

841 gaggttagct attattttcc tctcaaaact ttatggagat  
E V S Y Y F P L K T L W R

881 cgttttttgc tgctttgggtg gcggcctttg ttttgagatc  
S F F A A L V A A F V L R

921 catcaatcca tttggtaaca gccgtctgggt ccttttttat  
S I N P F G N S R L V L F Y

961 gtggagtatc atacaccatg gtaccttttt gaactgtttc  
V E Y H T P W Y L F E L F

1001 cttttattct cctaggggta tttggagggc tttggggagc  
P F I L L G V F G G L W G

1041 tttttttatt agggcaaata ttgcctgggtg tcgccgacgc  
A F F I R A N I A W C R R R

1081 aagtccacca aatttggaag gtatcctggt cttgaagtca  
K S T K F G K Y P V L E V  
\*

1121 ttattggtgc agccattact gctgtgatag ccttccccaa  
I I V A A I T A V I A F P  
C

1161 cccatacaca aggctcaaca ccagtgaact gattaaagag  
N P Y T R L N T S E L I K E

1201 ctgtttacag actgtggccc cttggaatcc tcctctcttt  
L F T D C G P L E S S S L

1241 gtgactacag aaatgacatg aatgccagta aaattggtga  
C D Y R N D M N A S K I V

1281 tgatattcct gaccgaccag caggcgttgg agtatattca  
D D I P D R P A G V G V Y S

1321 gctatctggc agttgtgcct agcactcata tttaaaataa  
A I W Q L C L A L I F K I

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

1361 taatgacagt attcactttt ggtatcaagg tcccgtcggg  
I M T V F T F G I K V P S

1401 cctgtttatc cccagcatgg cgatcggagc cattgcaggg  
G L F I P S M A I G A I A G

1441 aggattgtgg ggattgctgt ggagcagctc gcctactacc  
R I V G I A V E Q L A Y Y

1481 accacgactg gttcatcttc aaggagtggg gtgaggctcg  
H H D W F I F K E W C E V

1521 ggctgactgc atcactcctg ggctgtatgc catggttggg  
G A D C I T P G L Y A M V G

1561 gctgccgcat gcttaggtgg tgtgacaaga atgactgtct  
A A A C L G G V T R M T V

1601 ctctgggtgg tattgttttt gaacttactg gaggcttggg  
S L V V I V F E L T G G L

1641 atatattggt cctcttatgg ctgcagtaat gaccagtaaa  
E Y I V P L M A A V M T S K

1681 tggggttggtg atgcctttgg tagggaaggt atttatgaag  
W V G D A F G R E G I Y E

1721 cacacatccg actaaatggg taccctttct tggatgcaaa  
A H I R L N G Y P F L D A

1761 agaagaattc actcatacaa ccctggctgc tgatgtcatg  
K E E F T H T T L A A D V M

1801 agacctcgaa gaagtgacct tcccttagct gttttgacac  
R P R R S D P P L A V L T

1841 aggacaatat gacagtagat gacatagaaa acatgattaa  
Q D N M T V D D I E N M I

1881 tgagaccagc tataatggct ttctgttat aatgtcaaaa  
N E T S Y N G F P V I M S K

1921 gaatctcaga gattagtggg atttgccctc agaagagacc  
E S Q R L V G F A L R R D  
\*

1961 tgacaattgc aatagaaagt gccagaaaaa aacaagaagg  
L T I A I E S A R K K Q E  
\*

2001 tgttgttggc agttctcggg tgtgctttgc ccaacacact  
G V V G S S R V C F A Q H T

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

```
2041  ccattctcttc cagcagaaaag tcctcggcca ttaaaactga
      P S L P A E S P R P L K L

2081  gaagcatcct tgacatgagt ccttttacag tgacagacca
      R S I L D M S P F T V T D

2121  caccccaatg gagattgtgg tagacatcctt ccgaaagctt
      H T P M E I V V D I F R K L

2161  ggtctgaggc agtgccttgt cactcacaat gggcgcctcc
      G L R Q C L V T H N G R L

2201  ttggcattat aacaaaaaaaa gatatcctcc gtcatatggc
      L G I I T K K D I L R H M

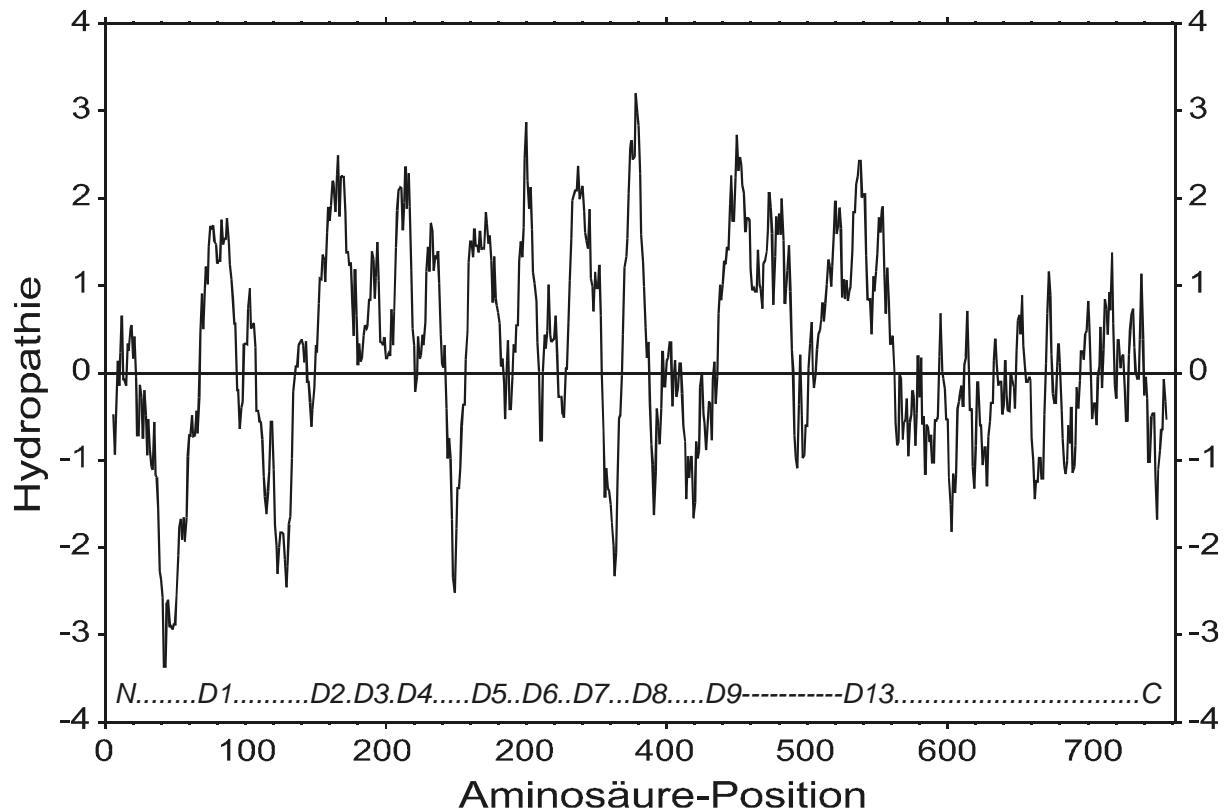
2241  ccagacggca aaccaagacc ccgcttcaat aatggttcaac
      A Q T A N Q D P A S I M F N

2281  tga
      -
```

---

**Abb. 16.** DNA-Sequenz (Kleinbuchstaben) und Aminosäuresequenz (Großbuchstaben) des astroglialen rCLC-3. Potentielle Phosphorylierungsstellen sind mit (\*), PKC-Phosphorylierungsstellen mit einem (C) markiert. Der Polymorphismus an Position 2146 der cDNA ist mit Fettkursivdruck gekennzeichnet.

Die Proteinsequenz des astroglialen rCLC-3 wurde mithilfe der Methode von Kyte und Doolittle (1982) analysiert und ein Hydropathie-Diagramm erstellt (Abb. 17). In diesem Diagramm sind hydrophobe Domänen des Proteins mit positiven Werten versehen. Aus dem Verlauf des Diagramms können Rückschlüsse auf die Lage der Transmembrandomänen gezogen werden, die meistens einen hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren aufweisen. Die Analyse des vorliegenden astroglialen rCLC-3 ergab eine ähnliche Domänenstruktur wie sie für CLC-2 bereits beschrieben und für CLC-3 abgeleitet wurde (Thiemann et al., 1992; Kawasaki et al., 1994). Ein allgemeines topologisches Modell der CLC-Kanäle besagt, dass zwischen dem kurzen intrazellulären N-Terminus und dem langen intrazellulären C-Terminus des CLC-Kanalproteins 13 hydrophobe Domänen liegen. Nicht alle dieser hydrophoben Domänen sind jedoch als Transmembrandomänen beschrieben. So ist etwa die Domäne 4 extrazellulär und die Domäne 13 intrazellulär lokalisiert. Zwischen Domäne 8 und 9 liegt eine große extrazelluläre Schleife, die eine Glykosylierung trägt. Es wurden mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen gefunden (Kawasaki et al., 1994), unter denen auch zwei von der PKC erkannt werden könnten (Duan et al., 1999; s.a. Abb. 16).



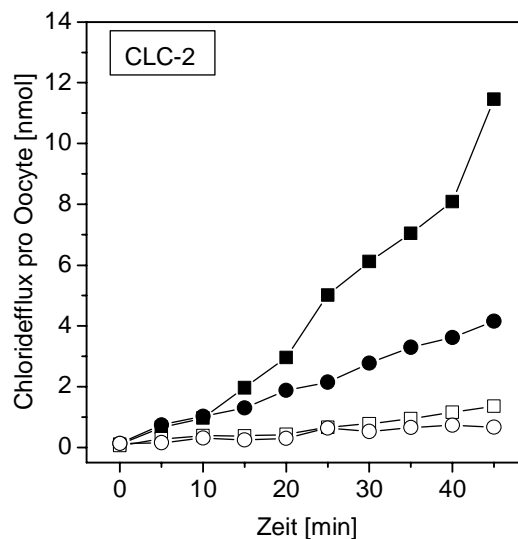
**Abb. 17.** Hydropathie-Diagramm für das rCLC-3-Protein nach Kyte und Doolittle (1982) mit abgeleiteter Domänenstruktur, N: N-terminus, C: C-Terminus, D: Domäne.

### 2.2.7 Chloridefflux aus cRNA-injizierten Oocyten

Da alle drei Kandidaten auch als Chloridkanäle beschrieben worden sind, sollte zunächst die Chloridpermeabilität der cRNA-exprimierenden Oocyten bestimmt werden. Hierzu wurden die Oocyten drei bis sechs Tage nach der cRNA-Injektion durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die 115 mM Na<sup>36</sup>Cl (0.925 kBq/μl) in HEPES-Puffer, pH 7.8, enthielt. Nach dreimaligem Waschen wurden je 5 Oocyten in 1 ml isotonem oder hypotonem Transportpuffer inkubiert, in dem NaCl durch Natriumgluconat ersetzt war. Pro Messpunkt wurden 100 μl dieses Transportpuffers zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Der Efflux von Chlorid wurde aufgrund der in den aliquoten Proben enthaltenen Radioaktivität auf die Gesamtmenge hochgerechnet. Bei der Berechnung der spezifischen Radioaktivität wurde eine Ausgangskonzentration von 25 nmol Chlorid pro Oocyte zugrunde gelegt.

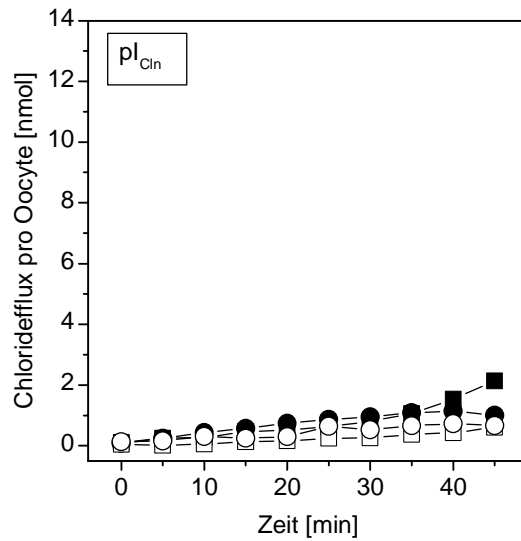


CLC-2-exprimierende Oocyten zeigten bereits unter isotonen Bedingungen einen signifikanten Efflux von ca. 4 nmol pro Oocyte innerhalb von 45 min, während die Kontrollloocyten einen geringeren Chloridefflux von ca. 1 nmol pro Oocyte innerhalb von 45 min zeigten. Unter hypotonen Bedingungen (105 mOsmol/l statt 210 mOsmol/l) erhöhte sich der Efflux nach einer Verzögerungsphase von 20 min. Diese Verzögerungsphase steht in Übereinstimmung mit dem Verlauf der Oocytenschwellung unter hypotonen Bedingungen. Damit steigt der Chloridefflux erst an, nachdem die Oocyte auf etwa das doppelte Volumen angeschwollen ist (s. Abb. 9). Nach 45-minütiger Inkubation war der Chloridefflux ca. dreimal so hoch (11 nmol/Oocyte) wie unter isotonen Bedingungen (Abb. 18).

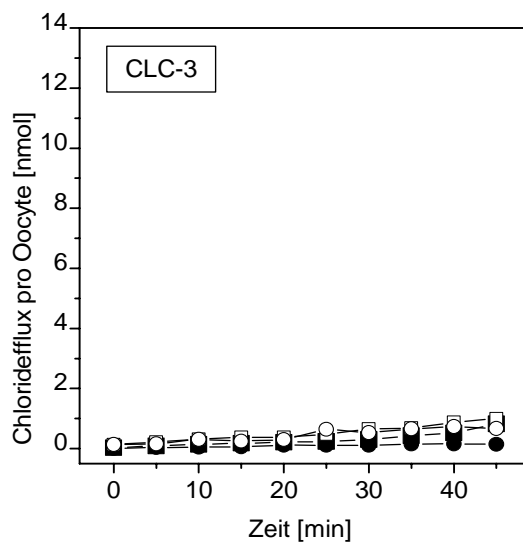


**Abb. 18.** Chloridefflux aus mit CLC-2-cRNA injizierten Oocyten, Die Oocyten wurden durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die 115 mM Na<sup>36</sup>Cl (0.925 kBq/μl) in HEPES-Puffer enthielt. Nach dreimaligem Waschen wurden je 5 Oocyten in 1 ml isotonem oder hypotonem Transportpuffer inkubiert, in dem NaCl durch Natriumgluconat ersetzt war. Pro Messpunkt wurden 100 μl dieses Transportpuffers zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Isoton (ND96/Gluconat) ○, ●; hypoton (ND44/Gluconat) □, ■; nicht-injiziert ○, □; CLC-2-cRNA-injiziert ●, ■.

Im Gegensatz dazu verursachten weder die Expression von CLC-3 noch I<sub>Cl<sub>in</sub> einen signifikant erhöhten Chloridefflux. Sowohl die CLC-3-exprimierenden, die I<sub>Cl<sub>in</sub>-exprimierenden als auch die Kontrollloocyten zeigten nur einen geringen Efflux von 1 nmol Chlorid/ 45 min pro Oocyte. Diese Effluxgeschwindigkeit wurde nicht durch Reduktion der Osmolarität um 50 % beeinflusst (Abb. 19; Abb. 20).</sub></sub>



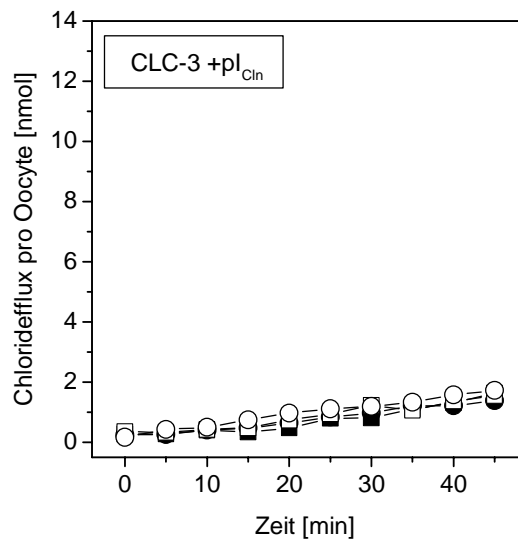
**Abb. 19.** Chloridefflux aus mit I<sub>Cl<sub>n</sub></sub>-cRNA injizierten Oocyten. Versuchsbedingungen s. Abb. 18. Isoton (ND96/Gluconat) ○, ●; hypoton (ND44/Gluconat) □, ■; nicht-injiziert ○, □; I<sub>Cl<sub>n</sub></sub>-cRNA-injiziert ●, ■.



**Abb. 20.** Chloridefflux aus mit CLC-3-cRNA injizierten Oocyten. Versuchsbedingungen s. Abb. 18. Isoton (ND96/Gluconat) ○, ●; hypoton (ND44/Gluconat) □, ■; nicht-injiziert ○, □; CLC-3-cRNA-injiziert ●, ■.

Neben seiner postulierten Eigenschaft als Chloridkanal wurde das I<sub>Cl<sub>n</sub></sub>-Protein auch als Regulator von CLC-3 diskutiert (Coca-Prados et al., 1996). Deshalb wurde auch die Chloridpermeabilität von CLC-3 und I<sub>Cl<sub>n</sub></sub> coexprimierenden Oocyten untersucht. Diese

Coexpression führte aber weder unter isotonen noch unter hypotonen Bedingungen zu erhöhtem Chloridefflux (Abb. 21).

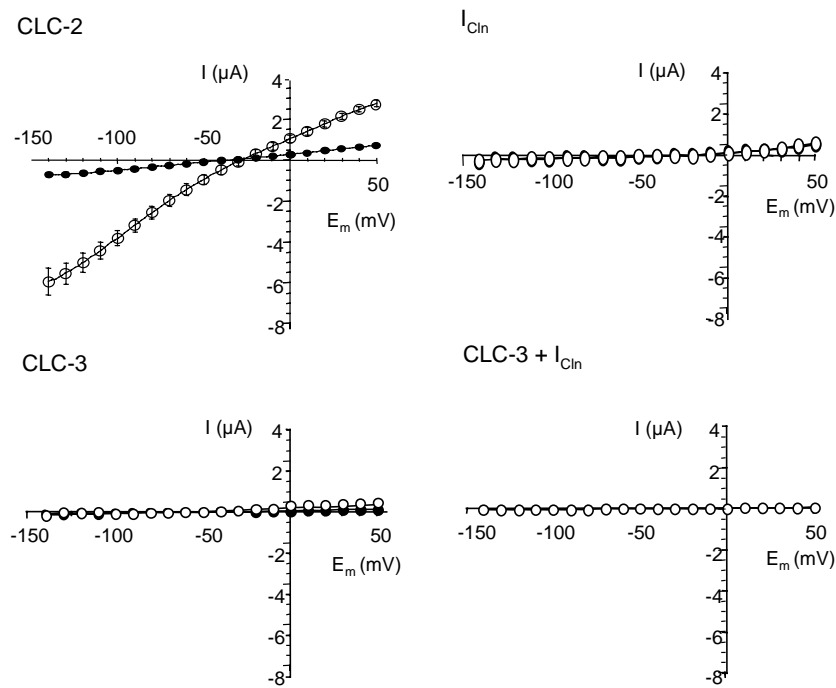


**Abb. 21.** Chloridefflux aus CLC-3-cRNA und  $I_{Cl^-}$ -cRNA coinjizierten Oocyten. Versuchsbedingungen s. Abb.18. Isoton (ND96/Gluconat) ○, ●; hypoton (ND44/Gluconat) □, ■; nicht-injiziert ○, □; CLC-3- und  $I_{Cl^-}$ -cRNA-injiziert ●, ■.

Chloridkanäle der CLC-Familie bilden Multimere, die auch aus verschiedenen Mitgliedern dieser Familie bestehen können. Solche Heteromere wurden z.B. für CLC-0 und CLC-1 beschrieben (Lorenz et al., 1996). Daher wurden CLC-2 und CLC-3 in Oocyten coexprimiert. Allerdings wurde kein erhöhter Efflux im Vergleich mit CLC-2 exprimierenden Oocyten festgestellt.

### 2.2.8 Chloridströme cRNA-injizierter Oocyten

Die Chloridefflux-Experimente konnten durch elektrophysiologische Messungen bestätigt werden. Diese elektrophysiologischen Messungen wurden von Dr. Ioulia Matskevitch und Dr. Carsten A. Wagner im Labor von Prof. Lang durchgeführt. CLC-3- und  $I_{Cl^-}$ -exprimierende Oocyten zeigten sowohl unter isotonen als auch unter hypotonen Bedingungen eine Chloridleitfähigkeit von unter  $4 \mu S$ , die sich nicht signifikant von der Leitfähigkeit der Kontroll-oocyten unterschied. CLC-2-exprimierende Oocyten dagegen wiesen unter isotonen Bedingungen eine Leitfähigkeit von  $8.47 \pm 1.3 \mu S$  auf, die sich nach ca. 20 min hypotoner Inkubation auf  $35.4 \pm 3.5 \mu S$  erhöhte (Abb. 22). Diese Erhöhung der Leitfähigkeit war reversibel.

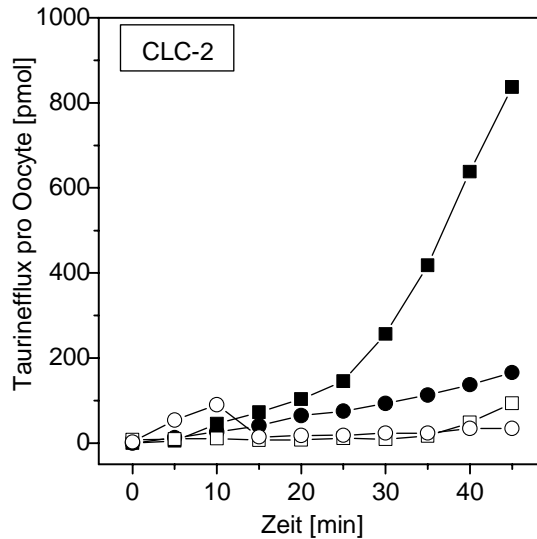


**Abb. 22.** Strom-Spannungs-Kurven von Oocyten. Die durch die Membran fließenden Ströme wurden an CLC-2-, CLC-3- und  $I_{Cln}$ -cRNA exprimierenden Oocyten unter isotonen (●) und unter hypotonen (○) Bedingungen bei Spannungen von  $-150$  mV bis  $+50$  mV gemessen. Ein negatives Vorzeichen zeigt den Einstrom positiver bzw. den Ausstrom negativer Ladungen an.

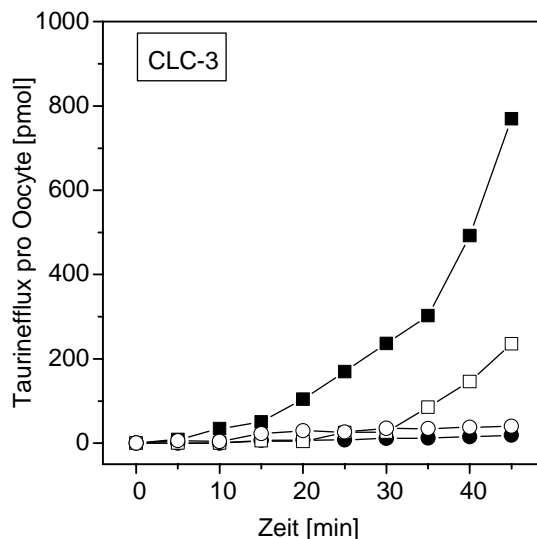
### 2.2.9 Taurinefflux aus cRNA-injizierten Oocyten

Die cRNA von CLC-2, CLC-3 und  $I_{Cln}$  wurde in Oocyten exprimiert, um die Taurinpermeabilität dieser drei Membranproteine zu bestimmen. Hierzu wurden die Oocyten nach 3 bis 6 Tagen Expression durch Injektion von radioaktivem Taurin vorbeladen. Der basale Taurinefflux schwankte je nach Oocytenpräparation unter isotonen Bedingungen zwischen 15 bis 40 pmol/45 min pro Oocyte (Abb. 23-26). Unter hypotonen Bedingungen lag der basale Efflux von Taurin zwischen 94 und 315 pmol/45 min pro Oocyte. Die cRNA-injizierten Oocyten wiesen unabhängig vom exprimierten Protein unter isotonen Bedingungen ebenfalls nur eine geringe Taurinpermeabilität zwischen 18 und 166 pmol/45 min pro Oocyte auf. Unter hypotonen Bedingungen stieg der Taurinefflux jedoch auf Werte zwischen 700 und 840 pmol/45 min an, wiederum unabhängig vom exprimierten Protein. Auch nach Coexpression von CLC-3 mit  $I_{Cln}$  (Abb. 26) oder mit CLC-2 zeigte sich eine ähnliche Effluxgeschwindigkeit. Dieser durch Hypoosmolarität verursachte Taurinefflux wies den

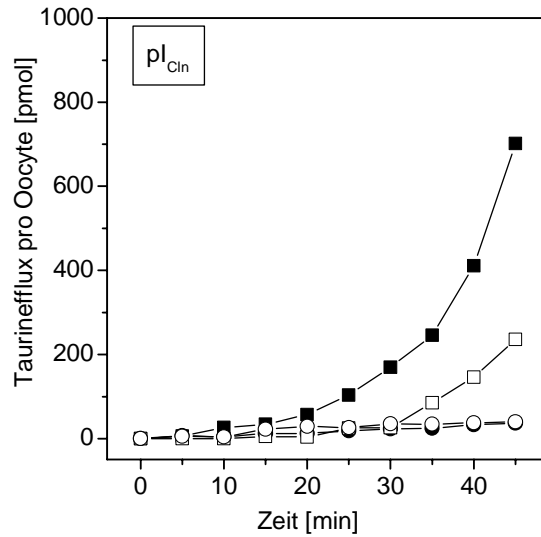
gleichen Verlauf auf wie der schwellungsaktivierte Chloridefflux CLC-2 exprimierender Oocyten. Bei beiden lag eine Verzögerungsphase von 10 bis 20 min vor, bevor ein starker Anstieg des Effluxes beobachtet werden konnte. Nach 45 min waren ca. 20 % des injizierten Taurins freigesetzt worden (Abb.23-26).



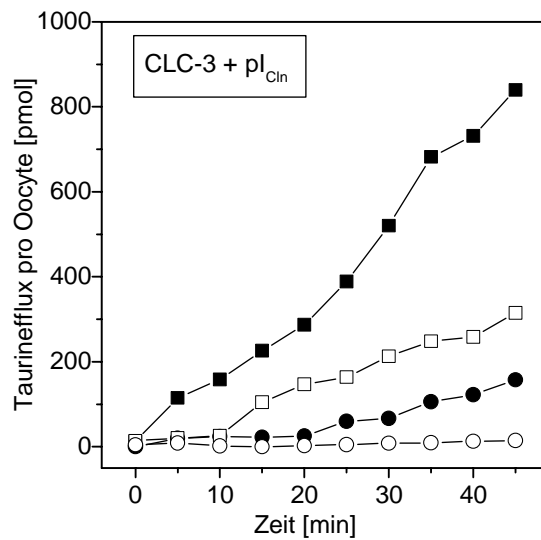
**Abb. 23.** Taurinefflux aus mit CLC-2-cRNA injizierten Oocyten. Die Oocyten wurden durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die 100 mM Taurin und 24 kBq/ $\mu$ l [ $^3$ H]Taurin in HEPES-Puffer enthält. Nach dreimaligem Waschen mit ND96 wurden je 5 Oocyten in 1 ml ND96 (isoton) oder ND44 (hypoton) inkubiert. Pro Messpunkt wurden 100  $\mu$ l dieses Transportpuffers zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Isoton (ND96) ○, ●; hypoton (ND44) □, ■; nicht-injiziert ○, □; CLC-2-cRNA-injiziert ●, ■.



**Abb. 24.** Taurinefflux aus mit CLC-3-cRNA injizierten Oocyten. Versuchsbedingungen s. Abb. 23. Isoton (ND96) ○, ●; hypoton (ND44) □, ■; nicht-injiziert ○, □; CLC-3-cRNA-injiziert ●, ■.

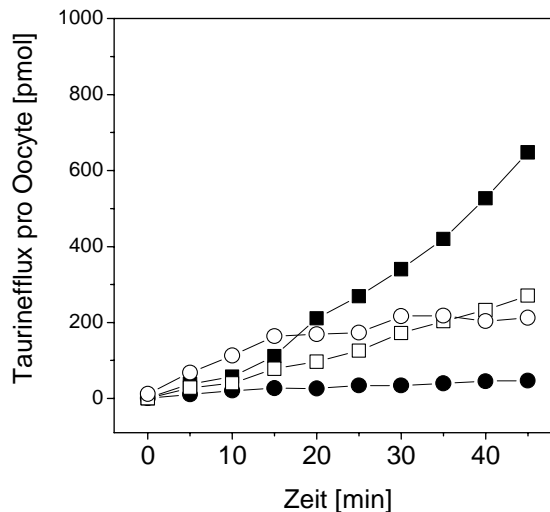


**Abb. 25.** Taurinefflux aus mit I<sub>Cln</sub>-cRNA injizierten Oocyten. Versuchsbedingungen s. Abb. 23. Isoton (ND96) ○, ●; hypoton (ND44) □, ■; nicht-injiziert ○, □; I<sub>Cln</sub>-cRNA-injiziert ●, ■.



**Abb. 26.** Taurinefflux aus mit CLC-3-cRNA und I<sub>Cln</sub>-cRNA coinjizierten Oocyten. Versuchsbedingungen s. Abb. 23. Isoton (ND96) ○, ●; hypoton (ND44) □, ■; nicht-injiziert ○, □; CLC-3- und I<sub>Cln</sub>-cRNA-injiziert ●, ■.

Sowohl für CLC-2 als auch für CLC-3 und  $I_{Cln}$  ist eine Aktivität als Chloridkanal nachgewiesen oder postuliert worden. Um zu klären, ob dieser Taurinefflux auch bei der Expression eines Membranproteins auftritt, das keine Chloridkanalaktivität zeigt, wurden dieselben Messungen an rMCT1-exprimierenden Oocyten wiederholt. Hier zeigte sich unter hypotonen Bedingungen ebenfalls ein erhöhter Taurinefflux von ca. 700 pmol/45 min pro Oocyte (Abb. 27).



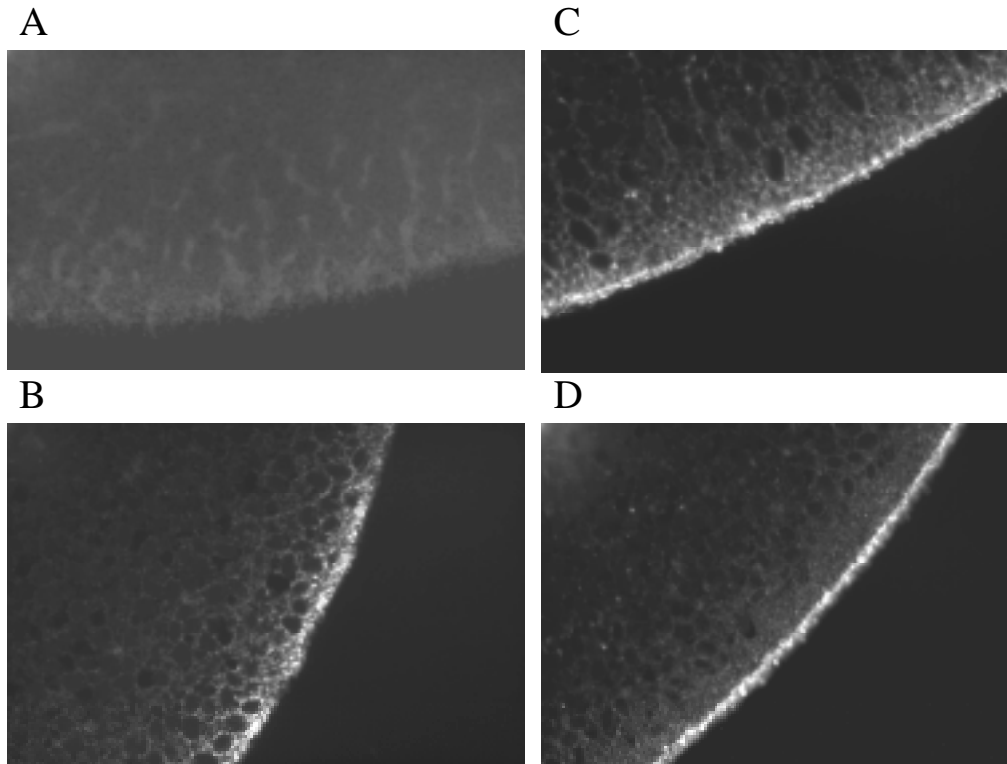
**Abb. 27.** Taurinefflux aus mit rMCT1-cRNA injizierten Oocyten. Versuchsbedingungen s. Abb. 23. Isoton ○, ●; hypoton □, ■; nicht-injiziert ○, □; rMCT1-cRNA-injiziert, ●, ■.

### 2.2.10 Inulinefflux aus cRNA-injizierten Oocyten

Überexpression von Membranproteinen könnte die Oocyten empfindlicher gegenüber einem hypotonen Schock gemacht haben und die erhöhte Taurinpermeabilität könnte durch Membranrisse verursacht worden sein. Um dies auszuschließen, wurde die [ $^3$ H]Inulin-Permeabilität CLC-3-exprimierender Oocyten und nicht-exprimierender Kontrollloocyten unter isotonen und hypotonen Bedingungen gemessen. Generell lag der Inulinefflux nach 45 min unter 4 % der injizierten Menge pro Oocyte. Unter isotonen Bedingungen wurden sowohl von Kontrollloocyten als auch von CLC-3-exprimierenden Oocyten unter 0.5 % der injizierten Menge freigesetzt. Unter hypotonen Bedingungen stieg der Efflux auf 1 % in Kontrollloocyten und 4 % in CLC-3-exprimierenden Oocyten. Bei einer Beschädigung der Oocytenmembran wäre eine wesentlich stärkere Freisetzung des Substrats zu erwarten gewesen.





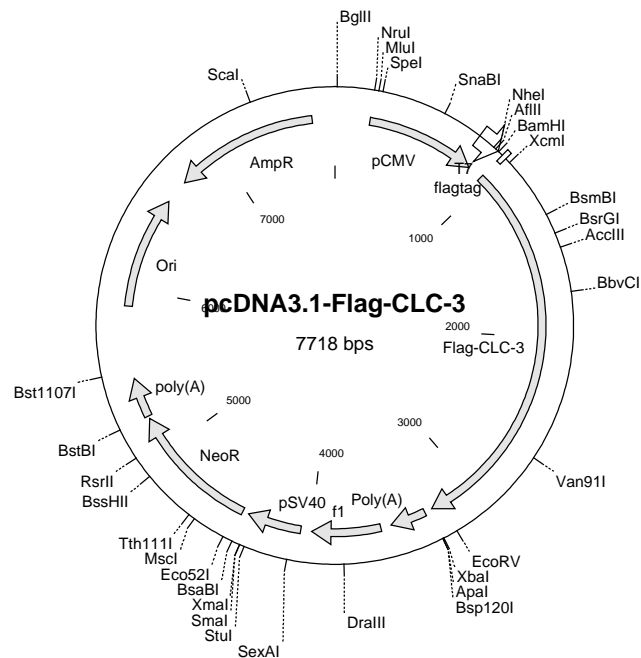


**Abb. 29.** Nachweis der CLC-3-Expression mithilfe eines Flag-CLC-3-Fusionsproteins. Oocyten wurden mit 25 ng einer cRNA injiziert, die für das Flag-CLC-3-Fusionsprotein codiert (B-D), oder verblieben zur Kontrolle uninjiziert (A). Die Abbildung zeigt Oocyten-Schnitte angefertigt von Dr. B. Friedrich. Das Fusionsprotein wurde mit einem Flag-Antikörper detektiert. (A) Kontroll-oocyten; (B)-(D): Flag-CLC-3-exprimierende Oocyten: (B) Erster Expressionstag; (C) zweiter Expressionstag; (D) vierter Expressionstag.

### 2.3 Messungen an CLC-3-transfizierten HEK-293-Zellen

Dass in Oocyten trotz Membranlokalisation keine Chloridkanal-Aktivität des CLC-3 messbar war, könnte an fehlenden Faktoren der Proteinmodifizierung, etwa der Phosphorylierung durch Kinasen, zur Aktivierung des Proteins in diesem Expressionssystem liegen. Daher wurden Taurinefflux und Chloridströme von CLC-3 an einem anderen Expressionssystem gemessen, und zwar an transfizierten HEK-293-Zellen. Wie bei einem ubiquitären Mechanismus zu erwarten ist, zeigen auch HEK-293-Zellen einen schwellungs-aktivierten Taurinefflux. Mittels RT-PCR (Daten nicht gezeigt) wurde nachgewiesen, dass auch diese Zellen CLC-3-mRNA exprimieren. Für die Überexpression von CLC-3-Protein und Flag-CLC-3-Fusionsprotein (s. Abschnitt 2.2.10) wurde die entsprechende cDNA-Sequenz in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert (Abb. 30). Mit diesen Plasmiden wurden die Zellen transfiziert. Die Transfektionseffizienz lag bei über 50 %. Da für die elektrophysiologischen Einzelzell-Messungen der Chloridkanalaktivität eine Selektion nativer transfizierter Zellen

nötig war, wurden diese Zellen zur Markierung mit einem EGFP-Plasmid cotransfiziert. Dieses Plasmid enthielt die cDNA des EGF-Proteins (Cormack et al., 1996) dessen Expression durch seine grüne Fluoreszenz nachweisbar ist (Chalfie et al, 1994). Da die  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Partikel die von den Zellen aufgenommen werden, mehrere DNA-Moleküle enthalten, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sowohl Moleküle des CLC-3-Konstrukts als auch des EGFP-Plasmids in die gleiche Zelle aufgenommen wird. Dies ermöglichte die Auswahl CLC-3 exprimierender Einzelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop, da EGFP-transfizierte Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz zu erkennen sind.

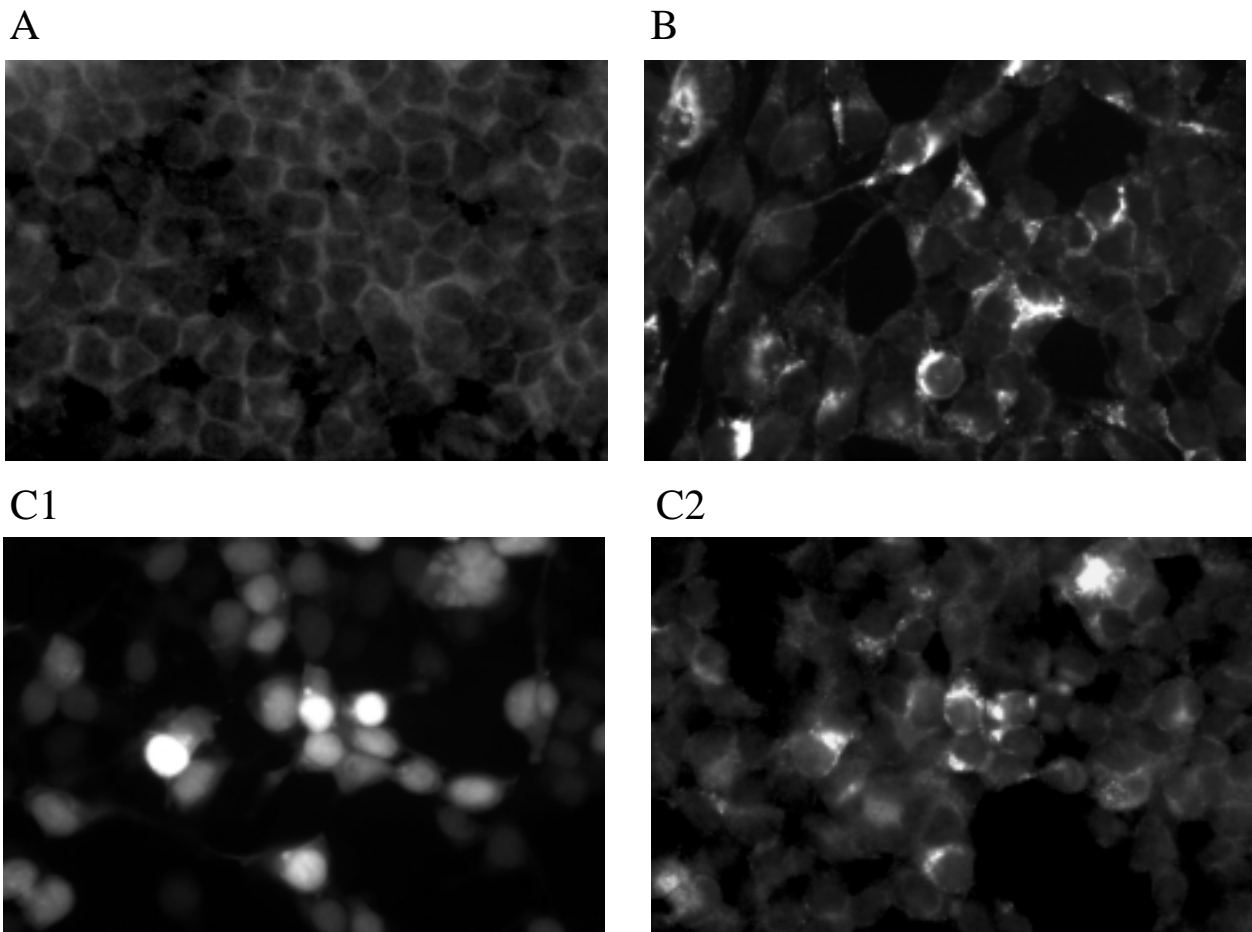


**Abb. 30.** Karte des Plasmids zur Expression von Flag-CLC-3 in HEK-293-Zellen

### 2.3.1 Immunfluoreszenzuntersuchungen an CLC-3-transfizierten HEK-293-Zellen

In den Flag-CLC-3-transfizierten HEK-293-Zellen konnte eine kappenförmige Anfärbung mit dem Flag-Antikörper gezeigt werden, die in CLC-3-transfizierten Kontrollzellen nicht auftrat (Abb.31A/B). Dies weist eher auf eine Lokalisation des Fusionsproteins im endoplasmatischen Reticulum hin. Eine Lokalisation in der Plasmamembran konnte nicht nachgewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Cotransfektion von EGFP und Flag-

CLC-3 ergab, dass die Zellen, die das Flag-CLC-3-Protein exprimierten, gleichzeitig auch EGFP exprimierten. Bei Vergleich der Tafeln (C1) und (C2) der Abb. 31 erkennt man, dass die Zellen mit der kappenförmigen Flag-Anfärbung (C2) in der EGFP-Filter-Aufnahme besonders intensiv grün erscheinen (C1). Bei Auswahl der am stärksten grün erscheinenden Zellen hat man es also mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer CLC-3-transfizierten Zelle zu tun.

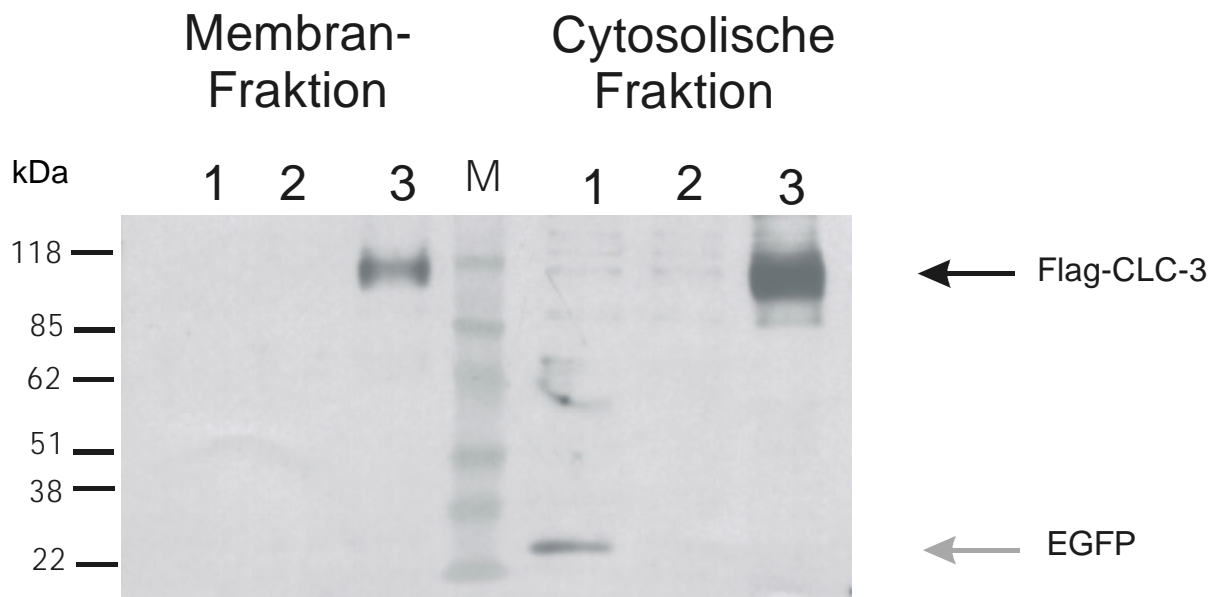


**Abb. 31.** Immunfluoreszenz transfizierter HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit pcDNA3.1 Vektoren transfiziert, die die codierenden Sequenzen folgender Proteinen enthielten: (A) CLC-3, (B) Flag-CLC-3, (C) Flag-CLC-3 und EGFP. Der verwendete Primärantikörper war gegen das Flag-Epitop gerichtet. Der Sekundärantikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa546 gekoppelt. Entsprechend wurde für Aufnahmen A, B und C2 ein 550 nm-Filter verwendet, während die Fluoreszenz von EGFP (C1) mit einem 500 nm-Filter aufgenommen wurde.

### 2.3.2 Nachweis der Expression des Flag-Fusionsproteins in transfizierten HEK-293-Zellen mittels “Western Transfer“

Um die Spezifität des Fluoreszenzsignals (Abb. 31) zu überprüfen, wurden Membranproteine und cytosolische Proteine der transfizierten Zellen mittels SDS-PAGE analysiert. Hierzu

wurden zunächst die Oberflächenproteine intakter Zellen biotinyliert und danach die Zellen lysiert. Aus dem Lysat wurden die biotinylierten Oberflächenproteine durch Bindung an Streptavidin-Agarose-Partikel als „Membranprotein-Fraktion“ abgetrennt. Das restliche Lysat mit den unbiotinylierten und daher nicht an Streptavidin gebundenen intrazellulären Proteinen diente als „cytosolische Fraktion“. Die vollständige Membranprotein-Fraktion und etwa ein Drittel der „cytosolischen Fraktion“ wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Elektrotransfer wurde als Primärantikörper der Flag-Antikörper verwendet. Das Flag-CLC-3-Fusionsprotein von ca. 100 kDa konnte sowohl in der Membranprotein-Fraktion als auch in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 32, Spur 3). Die Flag-CLC-3-Bande in der cytosolischen Fraktion ist allerdings wesentlich stärker als in der Membran-Fraktion. In den Auftragsspuren der „cytosolischen“ Fraktionen der CLC-3- und der EGFP-transfizierten Zellen sind schwache unspezifische Banden zu erkennen (Abb. 32, Spuren 1, 2). Das EGFP ist durch seine Eigenfluoreszenz auf dem Film nachweisbar. Es liegt erwartungsgemäß nur in der cytosolischen Fraktion vor (Spur 1).



**Abb. 32.** „Western Transfer“ der Membranprotein-Fraktion und der „cytosolischen“ Fraktion transfizierter HEK-293-Zellen. Transfiziert wurde mit pcDNA3.1-Vektoren, die die codierenden Sequenzen von (1) EGFP, (2) CLC-3, (3) Flag-CLC-3 enthielten. Der verwendete Antikörper war gegen das Flag-Epitop gerichtet. Der Sekundärantikörper war an Alkalische Phosphatase gekoppelt. Die Detektion erfolgte mittels Chemoluminiszenz. Das EGF-Protein emittiert ebenfalls Licht im Bereich der Filmempfindlichkeit. Die Abbildung zeigt den entwickelten Film mit der untergelegten Membran, sodass auch der Proteinstandard sichtbar ist.

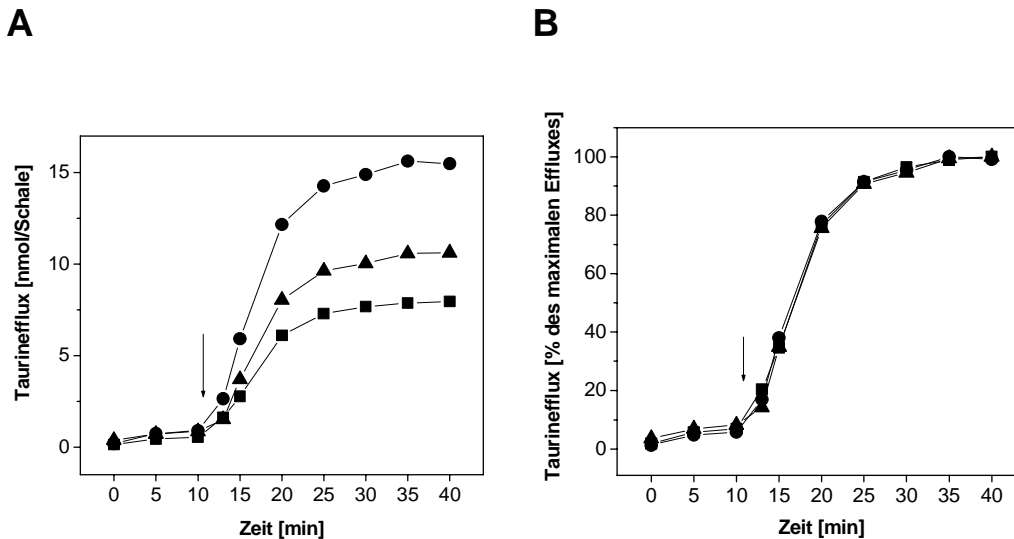
### 2.3.3 Taurinefflux aus CLC-3-transfizierten HEK-293-Zellen

Der Taurinefflux wurde an adhärennten transfizierten HEK-293-Zellen gemessen. Als Kontrollzellen dienten EGFP-transfizierte Zellen. Die bei den Astroglia-Kulturen angewandte Messmethode (s. 2.1.5) wurde in einigen Aspekten modifiziert. Die Zellen wurden in einem HEPES-Puffer vorbeladen, da kein Zellkulturbrutschrank mit CO<sub>2</sub>-Begasung für die radioaktive Inkubation zur Verfügung stand. Der hypotone Schock (50 %) erfolgte, analog zur Messmethode für Oocyten, durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O. Es wurde beobachtet, dass die Kontrollzellen die Transfektion besser verkräfteten und besser wuchsen. Daraus ergab sich, dass sowohl Gesamtvorbeladung als auch Efflux pro Schale höher waren als bei den CLC-3-transfizierten Zellen. Um die Geschwindigkeiten der Effluxes zu vergleichen, wurden die Kurven mittels Näherung an Kinetiken 1. Ordnung für das Erscheinen von Taurin im Inkubationspuffer ( $y(t) = a (1 - e^{-bt})$ ) analysiert und die Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung verglichen. (Tab. 1).

**Tab. 1.** Analyse der Kinetik der Effluxes aus transfizierten Zellen mithilfe der Näherungsgleichung für die Kinetik 1. Ordnung ( $y(t) = a (1 - e^{-bt})$ )

Tranfektion	Maximalwert des Efflux (a) [nmol]	Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung (b)
EGFP	17.0 ± 1.3	0.10 ± 0.02
CLC-3	8.7 ± 0.0	0.10 ± 0.01
Flag-CLC-3	11.8 ± 1.0	0.09 ± 0.02

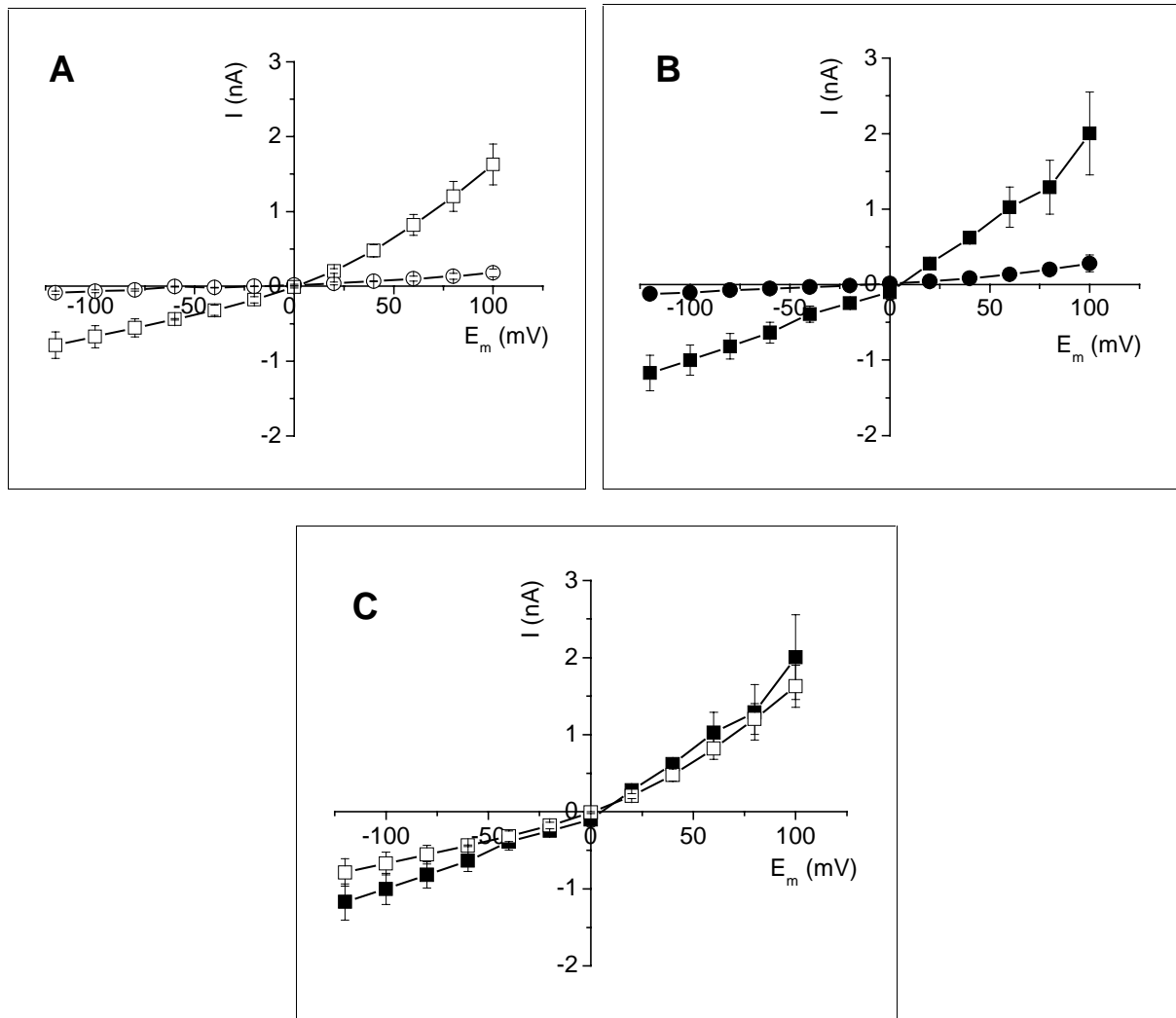
Um die Efflux-Raten der verschiedenen Messungen direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Messwerte mit Hilfe der maximalen Efflux-Werte normiert (Abb. 33). Der direkte Verleich der Geschwindigkeitskonstanten sowie der Efflux-Kurven zeigt, dass zwischen CLC-3-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied in der Efflux-Kinetik besteht.



**Abb. 33.** Taurinefflux aus transfizierten HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden vor Beginn der Messung 2 h lang mit Taurin vorbeladen, anschließend gewaschen und in Transportpuffer inkubiert. Zu den angegebenen Messzeitpunkten wurden Proben aus dem Überstand entnommen. Nach 10 min wurde der hypotone Schock durch Zugabe von  $dH_2O$  ausgelöst (Pfeile). A: Absolute Messwerte, B: Normierte Meßwerte. Transfiziert wurde mit pcDNA3.1-Expressionsvektoren, die die codierenden Sequenzen von (●) EGFP, (■) CLC-3 oder (▲) Flag-CLC-3 enthielten.

### 2.3.4 Chloridströme CLC-3-transfizierter HEK-293-Zellen

Für die Messung der Chloridströme wurden die Zellen mit einem CLC-3-Konstrukt und einem EGFP-Plasmid cotransfiziert. Wie in 2.3 beschrieben, ermöglichte dies die Auswahl CLC-3-transfizierter Einzelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Dr. Nikita Gamper im Labor von Prof. Lang durchgeführt. Die Chloridströme von CLC-3- und EGFP-cotransfizierten Zellen wurden mittels „patch-clamp“ unter isotonen und hypotonen Bedingungen gemessen und mit denen EGFP-transfizierter Kontrollzellen verglichen. In beiden Fällen wurde ein schwellungsaktivierter Chloridstrom detektiert. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Stromspannungskurven EGFP-transfizierter Zellen und CLC-3-cotransfizierter Zellen festgestellt werden (Abb. 34).



**Abb. 34.** Strom-Spannungs-Kurven transfizierter HEK-293-Zellen. Die durch die Plasmamembran fließenden Ströme wurden an CLC-3- und EGFP-cotransfizierten und an nur EGFP-transfizierten Zellen unter isotonen ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) und unter hypotonen Bedingungen ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) bei Spannungen von  $-120$  mV bis  $+100$  mV gemessen. Ein negatives Vorzeichen zeigt den Einstrom positiver bzw. den Ausstrom negativer Ladungen an. A: Nur EGFP-transfizierte Kontrollzellen; B: CLC-3 und EGFP-cotransfizierte Zellen. C: Vergleich der Ströme von Kontrollzellen ( $\square$  aus A) mit cotransfizierten Zellen ( $\blacksquare$  aus B) unter hypotonen Bedingungen.

### 2.4 Diskussionen zu 2.1 bis 2.3

Der Osmolytefflux aus Astrogliazellen in Kulturen ist von mehreren Gruppen untersucht worden und bereits sehr gut charakterisiert (Pasantes-Morales und Schousboe, 1989; Pasantes-Morales et al., 1990; Jackson und Strange, 1993). Daher erschienen Astroglia-Kulturen eine gute Wahl zur Isolierung des noch unbekanntes Osmolytefflux-Kanals VSOAC. Um die optimalen Zellen und Bedingungen auswählen zu können, wurde der Osmolytefflux aus astrogliareichen Primärkulturen und C6-Rattengliomzellen untersucht.

Da die Richtung des Taurinfluxes durch den Osmolytkanal durch das Konzentrationsgefälle bestimmt wird (Schousboe et al., 1991; Jackson und Strange, 1993; Gonzales et al., 1995), ist der Flux von Taurin sowohl als Influx als auch als Efflux messbar. Bei der Messung des Fluxes mittels Aufnahmemessung ist es jedoch ratsam,  $\text{Na}^+$ -freien Puffer zu verwenden, um eine parallele Aufnahme durch den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Taurintransporter zu unterbinden. Der Vergleich der beiden Messmethoden zeigte aber, dass die Messung des Effluxes von Taurin nach Vorbeladung der Zellen erheblich höhere Fluxgeschwindigkeiten ermöglichte als die Messung des Influxes. Der Grund hierfür dürfte in den unterschiedlichen Konzentrationsgradienten liegen. Zur intrazellulären Taurinkonzentration kultivierter Astrogliazellen gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben, von unter 1 mM bis 10 mM (Mountian et al., 1996; Beetsch und Olson, 1998). Diese Diskrepanz beruht wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Kulturbedingungen, unter denen die Konzentrationen bestimmt wurden. Für die hier vorliegenden Effluxmessungen wurden die Zellen nach einer hypertonen Vorinkubation verwendet. Unter diesen Bedingungen wurde Taurin in den Zellen akkumuliert. Die Konzentrationsverhältnisse unter diesen Versuchsbedingungen lassen sich abschätzen: Die Vorbeladung der C6-Zellen mit Taurin betrug beispielsweise 23 nmol/mg Protein. Dies entsprach, bei einem angenommenen Volumen von 4  $\mu\text{l}$ /mg Protein, einem Anstieg der intrazellulären Taurinkonzentration von ca. 5.8 mM. Bei der folgenden Effluxmessung lag also eine hohe intrazelluläre Taurinkonzentration vor, während die extrazelluläre Konzentration verschwindend gering war. Unter hypotonen Bedingungen betrug der Efflux ca. 4 nmol/mg Protein innerhalb von 5 min (Abb. 5), was einer Abnahme der intrazellulären Konzentration von ca. 1 mM entsprach. Die Freisetzung von 4 nmol Taurin in 4 ml war von sehr starker Verdünnung begleitet, sodass



das Konzentrationsgefälle von innen nach außen bestehen blieb. Betrachtet man nun die Bedingungen für die Messung des Taurinfluxes als Aufnahme (Abb. 4), dann zeigt sich, dass die extrazelluläre Taurinkonzentration von 1 mM wahrscheinlich unter der intrazellulären Konzentration lag. Dennoch konnte eine Aufnahme von radioaktivem Taurin gemessen werden, die wahrscheinlich durch einen Austausch von intra- und extrazellulärem Taurin über den gesuchten Kanal zustande kam.

Die Geschwindigkeit des schwellungsaktivierten Taurineffluxes ist bei den Primärkulturen mit ca. 55 nmol/(5 min \* mg Protein) wesentlich höher als bei den C6-Zellen mit nur 4 bis 10 nmol/(5 min \* mg Protein). Wenn man allerdings die freigesetzte Taurinmenge mit der vorbeladenen Menge vergleicht, verringert sich der Unterschied: Unter gleichen Bedingungen wurden aus den Primärkulturen bis zu 31 % der zellulären Taurinmenge von 180 nmol/mg Protein innerhalb von 5 min nach dem hypoosmotischen Schock freigesetzt, während bei den C6-Zellen nur ca. 13 % freigesetzt wurden. Betrachtet man jedoch die Stimulation der Effluxgeschwindigkeit durch den hypoosmotischen Schock, so zeigt sich, dass diese bei den C6-Zellen das 6- bis 8-fache des basalen Effluxes betrug, bei der Primärkultur dagegen das 4-fache. Daher erschien es sinnvoll, für weitere Messungen die C6-Rattengliomzelllinie zu verwenden, die sich außerdem auch durch eine einfachere Handhabung auszeichnet. Trotz der quantitativen Unterschiede des Taurineffluxes zwischen Primärkultur und Zelllinie wird der Osmolytefflux durch einen ähnlichen Mechanismus vermittelt. Wie bereits für Astrogliazellen beschrieben (Sanchez-Olea et al., 1993; Jackson und Strange, 1993; Pasantes-Morales et al., 1994) war auch der Taurinefflux aus C6-Zellen durch Niflumet, NPPB und Ketoconazol hemmbar. Daher erschien die C6-Rattengliomzelllinie geeignet, um den volumensensitiven Taurinefflux zu untersuchen.

Ein weiterer Parameter, der in diesen Voruntersuchungen optimiert wurde, war die Vorinkubation der Zellen in isotonem oder hypertonem Medium. Nach dem Protokoll der Gruppe um Strange (Jackson und Strange, 1993) wurden die Zellen vor der Transportmessung 48 h lang in hypertonem Medium (50 % hyperton, 450 mOsmol/l) inkubiert. Für die Gene der Transporter SMIT und TAUT ist erhöhte Transcription durch Übergang von isotonen auf hypertone Bedingungen nachgewiesen worden (Paredes et al., 1992; Uchida et al., 1992). Dieser hypertone Schock sollte also dazu dienen, die Aufnahme der Osmolyte bei der Vorbeladung zu verstärken. Anschließend wird der hypoosmotische Schock durch die Rückkehr zu Puffern mit normaler Osmolarität (300 mOsmol/l) erreicht. Die Gruppe um

Pasantes-Morales dagegen führte die Vorbeladung der Zellen unter isotonen Bedingungen durch und erreichte einen hypoosmotischen Schock durch Verdünnung des Puffers mit Wasser (Pasantes-Morales et al., 1990). Ein Vergleich dieser beiden Methoden ergab, dass die Vorbeladung der C6-Zellen unter isotonen Bedingungen geringer war als unter hypertonen Bedingungen. Allerdings wurde ohne hypertone Vorinkubation anschließend ca. 90 % der vorbeladenen Taurinmenge innerhalb von 10 min durch den hypoosmotischen Schock freigesetzt, während es mit hypertoner Vorinkubation nur 25 % waren. Für die höhere Effluxgeschwindigkeit ohne Vorinkubation kann es verschiedene Gründe geben. Die hypertone Vorinkubation führt wahrscheinlich zu einer Verminderung des Wachstums der Zellen, wie sie schon für astroglia-reiche Primärkulturen beschrieben worden ist (Peters, 1998). Tatsächlich wurde auch bei den vorinkubierten C6-Zellen eine geringere Proteinmenge pro Schale gemessen. Durch diese Veränderungen könnten sowohl die Expression als auch die Regulation des Efflux-Kanals beeinflusst werden. Außerdem wurde von anderen Gruppen beobachtet, dass sowohl die Art der Osmolaritätsveränderung als auch die intrazelluläre Zusammensetzung an Elektrolyten oder organischen Osmolyten die Osmolytakkumulation und den Osmolytefflux beeinflussen (Ziyadeh et al., 1988; Pasantes-Morales und Schousboe, 1989; Motais et al., 1991; Stutzin et al., 1999). So wurde z.B. an Endothelzellen der Einfluss der intrazellulären Ionenstärke auf den schwellungs-induzierten Chlorid-Strom  $I_{CLswell}$  untersucht, der ähnliche Eigenschaften wie der Osmolytefflux aufweist. Hierbei wurde festgestellt, dass Herabsetzung der Ionenstärke zur erhöhten Aktivierbarkeit des  $I_{CLswell}$  führte (Nilius et al., 1998). Dieser Effekt wurde auch für Fisch-Erythrocyten beschrieben. Hohe intrazelluläre Ionenstärke in diesen Zellen begünstigte dagegen die Aktivierung des  $K^+$ - $Cl^-$ -Cotransports (Motais et al., 1991; Guizouarn und Motais, 1999). Ob diese Effekte durch die Gesamtheit der Ionen oder spezifisch durch einzelne Ionen hervorgerufen wurden, blieb jedoch ungeklärt. Der Einfluss der intrazellulären Chlorid-Konzentration auf den schwellungs-induzierten Osmolytefflux wurde an Rochen-Hepatocyten näher untersucht. An diesen Zellen wurde beobachtet, dass hohe intrazelluläre Konzentrationen an Chlorid- und Bromid-Ionen den schwellungs-induzierten Osmolytefflux verminderten. Dieser Effekt verschwand, wenn die Chlorid-Ionen durch Gluconat-Ionen ersetzt wurden. Daraus wurde geschlossen, dass der Osmolytefflux durch die intrazelluläre Chloridkonzentration reguliert wird (Jackson et al., 1996). Auch Experimente an C6-Rattengliomzellen sprechen für eine Regulation des Osmolyteffluxes durch die intrazelluläre Elektrolytkonzentration. Zellen, die nach einer mehrstündigen hypertonen Vorinkubation in Medium mit hoher NaCl-Konzentration einen höheren intrazellulären Elektrolytgehalt aufwiesen, zeigten einen

geringeren Osmolytefflux als Zellen mit einem niedrigen Elektrolytgehalt (Emma et al., 1997). Es erscheint plausibel, dass Zellen, die unter hyperosmolaren Bedingungen Elektrolyte akkumuliert haben, zunächst diese wieder freisetzen, bevor die organischen Osmolyte „verbraucht“ werden (Emma et al., 1997). In unserem Fall wurden die hyperosmolaren Bedingungen durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration verursacht, sodass die Anpassung an die hypertonen Bedingungen hauptsächlich über Akkumulation von Ionen erfolgt sein muss. Daher ist es wahrscheinlich, dass die hypertone vorinkubierten Zellen gegenüber den isoton inkubierten Zellen eine höhere intrazelluläre Elektrolytkonzentration aufwiesen. Somit wäre ein geringerer Osmolytefflux aus den hypertone vorinkubierten Zellen zu erwarten. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch der Unterschied in der prozentualen Osmolaritäts-Verringerung in diesem Versuchsansatz eine Rolle spielte. Auch wenn in beiden Fällen eine Änderung der Osmolarität um 150 mOsmol/l erzielt wurde, sind unterschiedlich starke Volumenänderungen zu erwarten. Bei einem Sprung von 300 auf 150 mOsmol/l ist eine Verdoppelung des Volumens, bei einem Sprung von 450 mOsmol/l auf 300 mOsmol/l dagegen nur eine Volumenzunahme von 30 % zu erwarten. In jedem Falle aber erscheint es sinnvoll, Zellen ohne hypertone Vorinkubation für die Isolierung der zur Expressionsklonierung benötigten mRNA zu verwenden.

Vor Expression dieser mRNA in *Xenopus laevis*-Oocyten sollten zunächst die Volumenänderungen der Oocyten bei hypotonem Schock untersucht werden. Hierfür wurde als erstes das wasserzugängliche Volumen von *Xenopus*-Oocyten über Äquilibrierung in  $^3\text{H}_2\text{O}$ -haltigem Puffer bestimmt. Diese Messung ergab ein Volumen, das etwa 70 % des aus dem Radius berechneten Volumens entsprach. Die Diskrepanz von 30 % ist durch den hohen Gehalt der Oocyten an hydrophobem Dotter erklärbar. Unter hypoosmotischen (50 %) Bedingungen schollen die Oocyten innerhalb weniger Minuten an. Das maximale Volumen von 183 % des Ausgangsvolumens wurde allerdings erst nach 25 min erreicht. Damit zeigen die Oocyten ähnliches Schwellungsverhalten wie kultivierte Zellen, die zunächst wie Osmometer reagieren. Die Volumenregulation der Oocyte ist aber sehr schwach oder gar nicht ausgeprägt, sodass auch nach über 30 min kein Rückgang des Volumens beobachtet werden konnte. Ein ähnlicher Zeitverlauf der Schwellung von *Xenopus*-Oocyten ist auch von Furukawa et al. (1998) beschrieben worden. Bei optischen Messungen des Oocytenvolumens erhöhte sich der Oocyten-Durchmesser bei einer Verringerung der Osmolarität auf 50 % innerhalb von 30 min jedoch nur um maximal 10 % (Furukawa et al., 1998). Dies entspräche einer Volumenzunahme von ca. 33 %. Ginge man von einem wasserzugänglichen Volumen

von nur 50 –70 % aus, ergäbe sich hieraus eine Zunahme dieses wasserzugänglichen Volumens auf ca. 170 % bzw. 150 %. Dies läge ungefähr in dem gleichen Rahmen, der auch in den oben genannten Experimenten ermittelt wurde. Ursache dafür, dass die Oocyte nach den ersten Minuten langsamer schwillt und nicht ganz das doppelte Volumen erreicht, könnte sein, dass endogene Mechanismen der Volumenregulation aktiviert werden. Dagegen spricht allerdings, dass einige endogene Oocyten-Transportsysteme, wie z.B. der  $I_{Clswell}$  nur unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden konnten (Ackerman et al., 1994). Sollte die absolute Volumenzunahme das Signal für die Öffnung volumen-sensitiver Kanäle sein, so kann davon ausgegangen werden, dass dieser Mechanismus auch in Oocyten funktionieren müsste. Die Öffnung des CLC-2-Kanals und die Aktivierung des Taurineffluxes zeigen, dass schwellungsinduzierte Aktivierung in Oocyten prinzipiell möglich ist.

Nun sollte die aus Astrogliazellen isolierte mRNA in Oocyten exprimiert werden und der Taurinflux bestimmt werden. Zunächst wurde die  $Na^+$ -abhängige Taurinaufnahme gemessen. Diese erwies sich aber sowohl in mRNA-exprimierenden Oocyten als auch in Kontroll-oocyten als zu gering für weitere Analysen. Um den Efflux von Taurin untersuchen zu können, musste eine Methode der Vorbeladung etabliert werden. Diese wurde durch Injektion von HEPES-gepuffertem Substrat erreicht. Um sicherzustellen, dass diese Methode prinzipiell funktioniert, wurde sie zunächst an einem bekannten Transportermolekül getestet, rMCT1. 55 % des injizierten Substrats Lactat wurde von den rMCT1-exprimierenden Oocyten innerhalb von 30 min freigesetzt, während die nicht-exprimierenden Kontroll-oocyten nur 3 % des Substrates freisetzen. Das bedeutet, dass der Efflux eines injizierten Substrats prinzipiell messbar ist. Ein weiterer Test wurde mit Taurin als Substrat durchgeführt, um sicherzustellen, dass das injizierte Taurin für den Efflux verfügbar ist und nicht in der Oocyte z.B. an Dottermoleküle gebunden oder gar abgebaut wird. Hierzu wurden die Oocyten mit Taurin vorbeladen und anschließend mit einem porenbildenden Toxin, dem Streptolysin S (Buckingham und Duncan, 1983), inkubiert. Der Efflux begann nach ca. einer 15-minütigen Inkubation mit Streptolysin S. Ähnlich wie bei dem oben geschilderten Lactateffluxexperiment wurden hier 60 % des Taurins innerhalb der folgenden 30 min freigesetzt. Eine Lyse der Oocyten durch das Toxin konnte nach Durchführung eines Kontroll-experiments mit Inulin als Substrat ausgeschlossen werden. Die Methode der Taurinvorbeladung der Oocyten mittels Injektion ist also prinzipiell zur Messung der Taurinpemeabilität geeignet.

In ersten Messungen konnte der Taurinefflux durch Expression astroglialer mRNA unter 50 % hypoosmotischen Bedingungen auf das Dreifache im Vergleich zu nicht-exprimierenden Oocyten gesteigert werden. Allerdings waren die Oocyten sehr fragil, sodass zunächst nur über einen Zeitraum von wenigen Minuten gemessen werden konnte. Innerhalb von 4 min betrug der Taurinefflux nur 3 % des injizierten Taurins. Um zu verhindern, dass bei längeren Messzeiten geplatzte Oocyten den Gesamtmesswert verfälschten, wurden die Oocyten in einzelnen Näpfen von Microtiterplatten gemessen. Hierbei stellte sich heraus, dass die Messwerte sehr hohe Streuung aufwiesen. Daher konnte selbst bei Nichteinbeziehung von Messwerten geplatzter Oocyten kein signifikanter Unterschied zu den Kontroll-oocyten ausgemacht werden. Der Grund für die Instabilität der mRNA-exprimierenden Oocyten liegt wahrscheinlich darin, dass die mRNA-Präparation aus Astrocyten auch mRNA von Aquaporin-1 enthält (Pfeuffer et al., 1998). Die Expression von Aquaporinen könnte unter hypotonen Bedingungen zu einem rascheren Wassereinstrom führen, der die Oocytenmembran zu stark belastet. Für die Expressionsklonierung des schwellungs-aktivierten Osmolytkanals erscheint dieses Messsystem also ungeeignet. Deshalb sollen im Folgenden bereits vorgeschlagene Kandidaten des schwellungsaktivierten Anionenkanals (VSOAC) auf ihre Taurinpermeabilität untersucht werden. Unter den in der Literatur vorgeschlagenen Kandidaten wurden CLC-2, CLC-3 und  $pI_{Cl}$  für weitere Tests ausgewählt. Sie gelten als weitgehend ubiquitär exprimiert, und ihre mRNA-Expression konnte mittels RT-PCR sowohl in astroglia-reichen und neuron-reichen Primärkulturen als auch in fetalem und adultem Ratten-Hirnhomogenat nachgewiesen werden. In astroglia-reichen Primärkulturen und in Hirnhomogenaten konnten zwei Spleißvarianten des CLC-2 nachgewiesen werden. Bisher ist nur CLC-2L charakterisiert worden (Thiemann et al., 1992; Gründer et al., 1992). Die Aufgabe der kleineren Spleißvariante CLC-2S ist bis jetzt noch völlig unbekannt (Chu und Zeitlin, 1997).

CLC-2 ist über Expressionsklonierung im *Xenopus*-System entdeckt worden und wurde nachfolgend intensiv elektrophysiologisch charakterisiert (Gründer et al., 1992; Jordt und Jentsch, 1997). Das CLC-2-Molekül wurde als Chloridkanal in *Xenopus*-Oocyten exprimiert und ist als volumen-sensitiver Chloridkanal bekannt (Gründer et al., 1992; Furukawa et al., 1998). Auch in unserem *Xenopus*-System konnte die Volumensensitivität von CLC-2 sowohl mit elektrophysiologischen Methoden als auch durch Chloridflux-Messungen bestätigt werden. Unter hypoosmolaren Bedingungen konnte mithilfe von  $^{36}\text{Cl}^-$  ein Efflux von ca. 20 nmol  $\text{Cl}^-/\text{h}$  gemessen werden. Dieser Efflux entspräche einem Chloridstrom von ca. 0.5  $\mu\text{A}$ .

Unter einer Spannungsklemme bei  $-40$  mV, die etwa dem Ruhepotential der Oocyten entspricht, wurde ein Chloridstrom in diesem Bereich gemessen. Auch für in *Xenopus*-Oocyten exprimierten CLC-3- und  $I_{Cln}$ -cRNAs sind erhöhte Chloridkanalaktivitäten beschrieben worden (Kawasaki et al., 1994; Paulmichl et al., 1992). Allerdings konnte bei Experimenten in anderen Labors und in dieser Arbeit für CLC-3 keine Chloridkanal-Aktivität nachgewiesen werden (Jentsch et al., 1999; M. Kavanaugh pers. Mittlg.). Um auszuschließen, dass der CLC-3 eventuell im *Xenopus*-Oocyten-System nicht in die Membran inseriert wird, wurde ein Flag-Epitop-CLC-3-Fusionsprotein in den Oocyten exprimiert. Die Immunfluoreszenz zeigte, dass der Kanal ab dem zweiten Expressionstag in der Plasmamembran lokalisiert ist. Dieses Ergebnis besagt allerdings nicht, dass der CLC-3 auch aktiv ist. Die Mitglieder der CLC-Familie können Heteromultimere bilden, die veränderte Kanaleigenschaften besitzen. Dies ist für eine Coexpression von CLC-1 und CLC-2 beschrieben worden (Lorenz et al., 1996). Bei einer Coexpression von CLC-3 mit CLC-2 in vorliegender Arbeit konnte jedoch keine Veränderung der Chloridpermeabilität im Vergleich zu CLC-2-exprimierenden Oocyten festgestellt werden. Auch die Experimente einer anderen Gruppe zur Coexpression von CLC-3 mit zwei anderen Mitgliedern der CLC-Familie, CLC-4 und CLC-5, führten zu keiner Veränderung der Charakteristika im Vergleich zu einzeln exprimiertem CLC-5 (Steinmeyer et al., 1995). Es wäre denkbar, dass der CLC-3 einen unbekanntem Faktor zur Aktivierung benötigt, der in *Xenopus*-Oocyten nicht verfügbar ist. Als Regulator von CLC-3 wurde das  $I_{Cln}$ -Protein diskutiert (Coca-Prados et al., 1996). Die Expressionsklonierung von  $I_{Cln}$  deutete daraufhin, dass das  $I_{Cln}$ -Protein selbst einen Chloridkanal bildet oder einen solchen aktiviert (Paulmichl et al., 1992). Es wurde gezeigt, dass das  $I_{Cln}$ -Protein unter isotonen Bedingungen im Cytosol lokalisiert ist, nach hypotonem Schock wurde es aber auch in der Membranfraktion nachgewiesen (Musch et al., 1997). Andererseits wurde gezeigt, dass die Expression von CLC-6 in *Xenopus*-Oocyten ähnliche Ströme induziert wie die Expression von  $I_{Cln}$ . Daraus wurde der Schluss gezogen, dass diese Proteine eventuell die endogenen Oocytenkanäle hochregulieren. Allerdings musste die Expression in dieser Untersuchung durch Erhöhung der Inkubationstemperatur verbessert werden (Buyse et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden CLC-3 und  $I_{Cln}$  in *Xenopus*-Oocyten coexprimiert. Diese Coexpression führte aber zu keiner signifikanten Veränderung des Effluxes aus CLC-3 exprimierenden Oocyten. Dass unter den vorliegenden Bedingungen weder für CLC-3 noch für  $I_{Cln}$  eine Chloridkanal-Aktivität gemessen werden konnte, kann folgende Gründe haben: 1. CLC-3 ist im vorliegenden Oocyten-Expressionssystem nicht aktiv und kann auch nicht durch das  $I_{Cln}$ -Protein aktiviert werden. 2. Das  $I_{Cln}$ -Protein ist in diesem

System nicht als Chloridkanal aktiv und erhöht unter den vorliegenden Bedingungen weder die endogene Chloridleitfähigkeit der Oocytenmembran noch aktiviert es CLC-3. Die Fragen, ob CLC-3 den Taurinefflux vermittelt und ob das  $I_{Cln}$ -Protein prinzipiell ein Regulator des CLC-3 ist, kann in diesem System nicht beantwortet werden.

Daher erschien es sinnvoll, ein anderes Expressionssystem für die Untersuchung des CLC-3 zu verwenden. Hierfür kam die Überexpression in Säugetierzellen in Frage, wie sie bereits für CLC-3 aus Meerschweinchen-Herz beschrieben worden ist (Duan et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vektor mit der cDNA-Sequenz für das Flag-CLC-3-Fusionsprotein in HEK-293-Zellen transfiziert. Dieses Flag-CLC-3-Fusionsprotein konnte in den transfizierten Zellen immunocytochemisch und mittels Western Transfer nachgewiesen werden. Allerdings konnte die Immunfluoreszenz der Zellen nicht klären, ob das Protein tatsächlich auch an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Daher wurden die Oberflächenproteine mittels Biotinylierung markiert, über Streptavidinbindung isoliert und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Der Western Transfer zeigt, dass die Membranfraktion das Fusionsprotein enthält. Der überwiegende Teil des Proteins findet sich jedoch in der cytosolischen Fraktion. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass schon während der Biotinylierung Zellen beschädigt waren, ist es schwierig, eine Biotinylierung intrazellulärer Proteine auszuschließen. Es ist jedoch anzunehmen, dass beschädigte Zellen bzw. durch Beschädigung freigesetzte intrazelluläre Proteine beim Waschen entfernt wurden. Für diese Annahme spricht, dass das nur cytosolisch exprimierte EGFP nicht biotinyliert wurde und somit der Anteil beschädigter Zellen, deren cytosolische Proteine biotinyliert werden könnten, allenfalls vernachlässigbar gering ist. Untransfizierte HEK-293-Zellen exprimieren die mRNA des endogenen CLC-3 und zeigen einen volumen-sensitiven Taurinefflux sowie einen volumen-sensitiven Chloridstrom. Duan et al. (1997) haben den CLC-3 aus Meerschweinchen-Herzmuskel als Chloridkanal beschrieben, der bei Überexpression in 3T3-Zellen einen um ein Vielfaches erhöhten volumen-sensitiven Chloridstrom bewirkte. Die in vorliegender Arbeit dargestellten Experimente zur Überexpression von CLC-3 in HEK-293-Zellen zeigten aber weder eine Verstärkung des Taurineffluxes noch eine Erhöhung der Chloridpermeabilität. Eine Beteiligung des CLC-3 an diesen Prozessen in HEK-293-Zellen erscheint daher unwahrscheinlich.

Die Untersuchung des Taurineffluxes in cRNA-exprimierenden Oocyten führte zu einem überraschenden Ergebnis. Nicht nur in Oocyten, die CLC-2, CLC-3 und/oder  $I_{Cln}$

exprimierten, wurde ein signifikant höherer schwellungsinduzierter Taurinefflux gemessen als in Kontroll-oocyten, sondern auch in rMCT1-exprimierenden Oocyten. Bei diesem Efflux kann es sich nicht um einen unspezifischen Leckflux handeln, denn es konnte gezeigt werden, dass Inulin unter diesen Umständen nicht freigesetzt wurde. Inulin hat einen dreimal größeren Stokes'schen Radius (29.6 Å) als Taurin (8.8 Å) und sollte nur durch Membranverletzungen oder bei Lyse der Zellen freigesetzt werden (Steenbergen et al., 1985). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Anionenkanälen, Anionenkanal-assoziierten Proteinen und Anionentransportern ein Taurinefflux vermittelndes Protein in den *Xenopus*-Oocyten induziert. Dies könnte auf einem ähnlichen Mechanismus beruhen wie die oben geschilderte Stimulation endogener Ströme durch die Expression von CLC-6 oder  $I_{Cln}$  (Buyse et al., 1997). Es muss allerdings beachtet werden, dass in den Experimenten vorliegender Arbeit Oocyten verwendet wurden, die durch Collagenase-Behandlung defollikuliert worden waren. Diese zeigen nur geringe Aktivität endogener Transportmoleküle. Daher ist dieses System gerade für die Untersuchungen heterologer Transportmoleküle gut geeignet. Folglich konnte auch der endogene volumenregulierte Chloridkanal nicht nachgewiesen werden, der in Oocyten nur kurz nach einer manuellen Defollikulierung detektiert werden kann (Ackerman et al., 1994; Hand et al., 1997).

Hieraus können folgende alternative Schlüsse gezogen werden: a) Entweder sind alle vier Transportmoleküle in der Lage, den Taurinefflux zu vermitteln, unabhängig von jeglicher Chloridpermeabilität, oder b) die Expression dieser Membranproteine führt zu einer Hochregulation eines endogenen Taurinefflux-Weges in *Xenopus*-Oocyten. Es ist schon früher beobachtet worden, dass die Expression heterologer Proteine in *Xenopus*-Oocyten erhöhte Expression endogener Transportsysteme verursachen kann (Shimbo et al., 1995; Buyse et al., 1997). In Anbetracht dessen, dass nur CLC-2 und CLC-3 eine strukturelle Verwandtschaft aufweisen, erscheint das Zutreffen der zweiten Schlussfolgerung wahrscheinlicher.

Mehrere Gruppen haben vermutet, dass der volumen-sensitive Osmolytefflux durch einen unspezifischen Anionenkanal erfolgt (Pasantes-Morales et al., 1990; Kirk et al., 1992; Jackson und Strange, 1993). Andererseits ist auch ein für Taurin spezifischer Efflux-Weg diskutiert worden (Lambert und Hoffmann, 1994; Shennan et al., 1994; Davis-Amaral et al., 1997; Stutzin et al., 1999). In den vorliegenden Experimenten fand verstärkter Taurinefflux statt, ohne dass gleichzeitig eine signifikante Erhöhung der Chlorid-Permeabilität zu messen war.



Dies spricht für die Existenz eines spezifischen Taurineffluxkanals in *Xenopus laevis*-Oocyten.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der schwellungs-aktivierte Taurinefflux unabhängig vom Chloridefflux ablaufen kann. Außerdem erscheint es aufgrund der weiteren Ergebnisse unwahrscheinlich, dass die hier untersuchten Proteine CLC-2, CLC-3 und  $I_{Cl}$  am schwellungs-aktivierten Efflux von Taurin aus Säugetierzellen beteiligt sind.

## **2.5 Charakterisierung des Betain-GABA-Transporters-1 im *Xenopus*-Oocyten-Expressionssystem**

In den Abschnitten 2.1 bis 2.3 wurde der schwellungs-aktivierte Osmolytefflux charakterisiert. Osmolyte werden unter physiologischen Bedingungen in die Zellen aufgenommen und dort akkumuliert. Diese Akkumulation wird durch eine Familie von Osmolyttransportern vermittelt, die Betain, GABA und Taurin transportieren. Die Mechanismen der Akkumulation sollen im Folgenden am Beispiel des Betain-GABA-Transporters (BGT-1) dargestellt werden. BGT-1 wurde ursprünglich aus Madin-Darbin Hunde-Nierenzellen (MDKC) kloniert, wird aber ubiquitär exprimiert, auch im Gehirn (Borden et al., 1995b) Ebenso wie TAUT gehört BGT-1 zu einer Familie von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-gekoppelten Transportern von Aminosäuren, Neurotransmittern und Osmolyten (Smith et al., 1992; Borden et al., 1995a) Zur Charakterisierung des Betain-GABA-Transporters wurden sowohl Fluxmessungen mit radioaktiven Substraten als auch elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Die elektrophysiologischen Daten wurden von Dr. I. Matskevich und Dr. C. A. Wagner im Labor von Prof. F. Lang am Physiologischen Institut gewonnen und sind Bestandteil einer Veröffentlichung (Matskevich et al., 1999). Diese Experimente sollten Aufschluss über den Mechanismus der Osmolytakkumulation durch den BGT-1 geben.

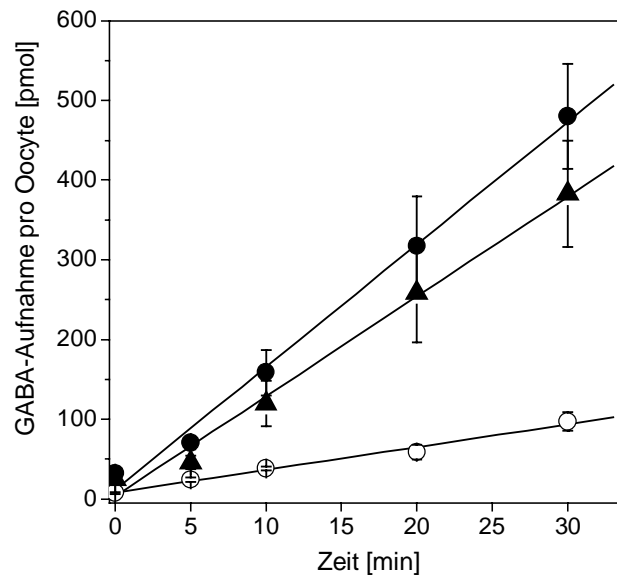
### **2.5.1 GABA-Aufnahme durch den Betain-GABA-Transporter BGT-1**

Um die GABA-Aufnahme durch den Betain-GABA-Transporter-1 zu untersuchen, wurde dieser in Oocyten exprimiert und Fluxmessungen mit [<sup>14</sup>C]GABA durchgeführt. Hierzu wurden die Oocyten 30 min mit [<sup>14</sup>C]GABA inkubiert, anschließend lysiert und die Radioaktivität bestimmt. Die radioaktiven Fluxmessungen liefern folglich einen Gesamtwert für einen Zeitraum von 30 min. Im Gegensatz dazu wurden die elektrophysiologischen Messungen innerhalb von 30 s nach Gabe des Substrats durchgeführt. Um die Ergebnisse der radioaktiven Fluxmessungen direkt mit den elektrophysiologischen Messungen vergleichen zu können, mussten folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Die GABA-Aufnahme muss über den gesamten Messzeitraum proportional zur Zeit sein.
2. Das Membranpotential darf sich durch die Aufnahme von GABA nicht wesentlich verändern.

Wie Abb. 35 zeigt, ist die Aufnahmegeschwindigkeit mindestens über einen Zeitraum von 30 min konstant, d.h. das Gleichgewicht ist noch nicht erreicht. Die Messung des

Membranpotentials unter diesen Bedingungen ergab, dass es bei Zugabe des Substrats zwar zunächst abfällt, aber dann wieder auf den Normalwert steigt.



**Abb. 35.** Kinetik der GABA-Aufnahme in BGT-1-exprimierenden Oocyten. Je 7 BGT-1-exprimierende Oocyten wurden in 100  $\mu$ l ND96, 1 mM GABA + [ $^{14}$ C]GABA (63 Bq/nmol) 0 bis 30 min lang inkubiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde nach Lyse der Oocyten gemessen. BGT-1-Expression (●); Kontrolle (○); BGT-1-Expression minus Kontrolle (▲).

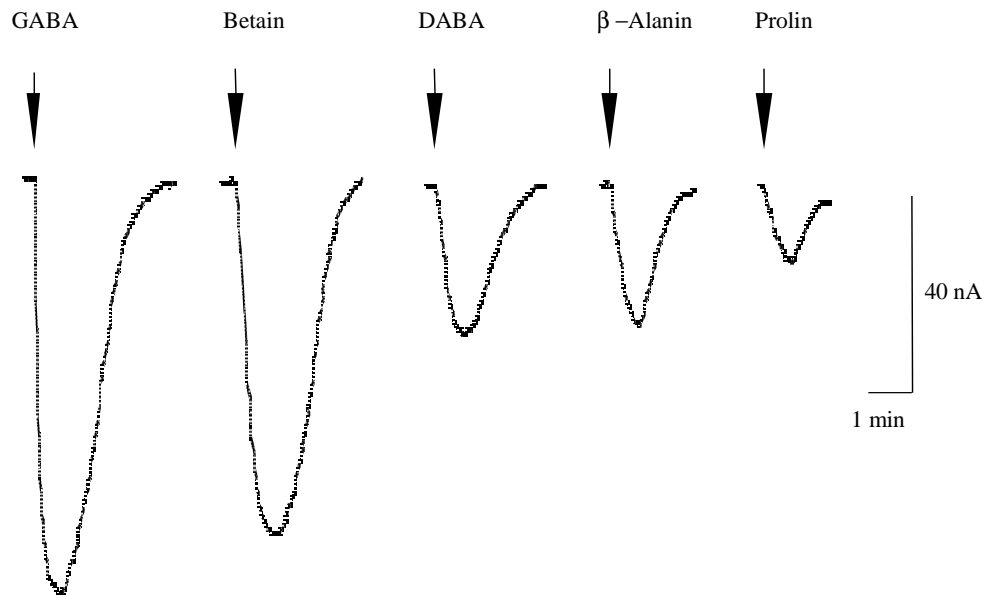
### 2.5.2 Messung substrat-induzierter Ströme

Wurde die Spannung konstant gehalten, dann löste die Zugabe verschiedener Substrate einen Einwärtsstrom in BGT-1-exprimierende Oocyten aus. Diese Messanordnung ermöglichte die einfache Charakterisierung der Substratspezifität dieses Transporters. Einwärtsströme sind definiert als Einstrom positiver Ladungen, die Werte werden aber mit negativem Vorzeichen angegeben. Der Strom war für 1 mM GABA mit  $-75.3 \pm 4.1$  nA am höchsten, gefolgt von dem für Betain mit  $-73.9 \pm 3.8$  nA (Abb. 36). Während in nicht-injizierten Kontrollloocyten kein signifikanter Strom durch GABA induziert wurde, löste die Zugabe von Betain einen Einwärtsstrom von  $-7.2 \pm 1.5$  nA aus, der jedoch  $\text{Na}^+$ -unabhängig war und auf eine wesentlich geringere Affinität für Betain als der BGT-1 hinwies. Um eine Verfälschung durch endogene Transporter zu vermeiden, wurde daher für weitere kinetische Analysen als Substrat hauptsächlich GABA verwendet. Um die Selektivität des BGT-1 zu untersuchen, wurde die Induktion von Strömen durch weitere Substrate getestet. Hierbei wurden alle Substrate in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die Rangfolge nach der Höhe des induzierten Stromes war: GABA= Betain > DABA >  $\beta$ -Alanin > Prolin > Chinidin > Glycin > Cholin >

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

Carnitin > Taurin > Creatin (s. Tabelle 2). Eine Originalaufzeichnung der Ströme ist für die fünf besten Substrate in Abb. 36 zu sehen.



**Abb. 36.** Substrat-induzierte Ströme in BGT-1 exprimierenden Oocyten. Original-Aufzeichnung für GABA, Betain, DABA,  $\beta$ -Alanine und Prolin (je 1 mM), Haltepotential: -50 mV. Die Oocyten wurden jeweils 30 s lang mit dem Substrat überspült.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

**Tab. 2.** Substrate und Spezifität des Transporters BGT-1

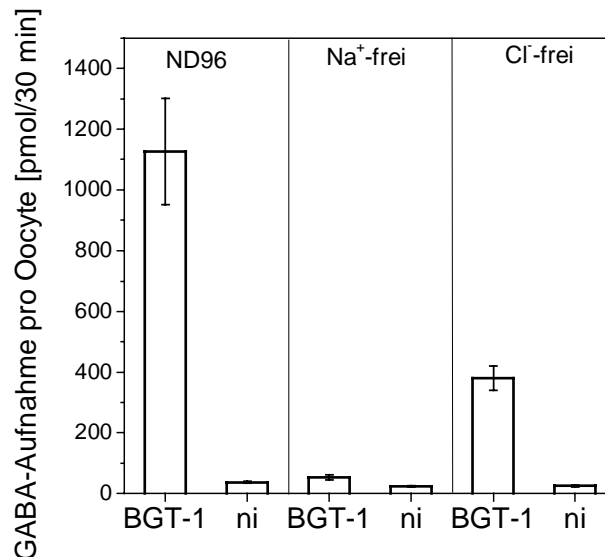
Substanz	Struktur	Strom (nA) ( $M \pm SEM$ )
GABA		$-75.3 \pm 4.1$
Betain		$-73.9 \pm 3.9$
DABA		$-33.3 \pm 1.2$
$\beta$ -Alanin		$-29.7 \pm 0.6$
Prolin		$-15.1 \pm 1.1$
Chinidin		$-11.7 \pm 2.5$
Glycin		$-9.8 \pm 1.1$
Putrescin		$-9.7 \pm 0.7$
Dimethylglycin		$-7.9 \pm 0.6$
Cholin		$-5.1 \pm 0.2$
Carnitin		$-4.8 \pm 1.3$
Sarcosin		$-4.8 \pm 1.5$
TEA		$-3.7 \pm 1.0$

## 2 Ergebnisse und Diskussion

Taurin		$-3.1 \pm 1.1$
Betainaldehyd		$-0.8 \pm 0.8$
Creatin		$-0.1 \pm 0.1$

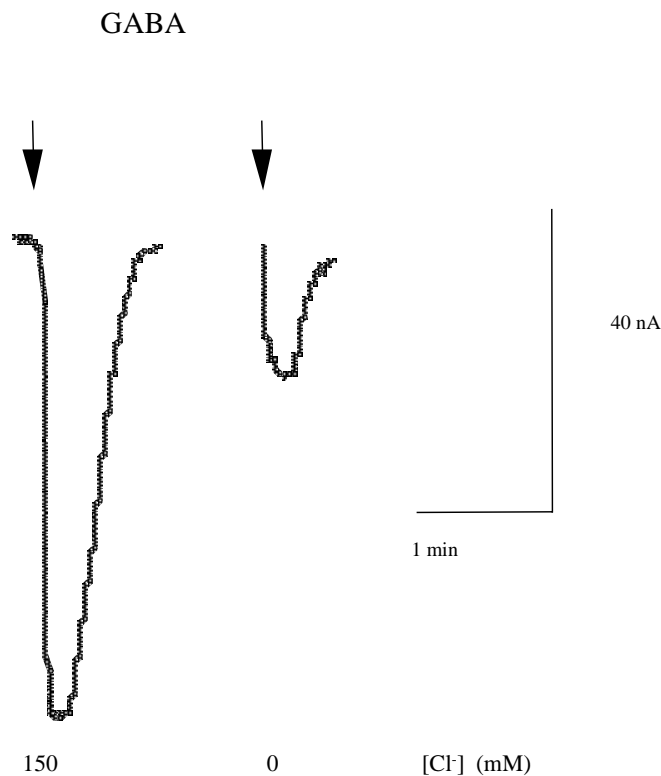
### 2.5.3 Abhängigkeit der GABA-Aufnahme durch BGT-1 von der Ionenzusammensetzung des Transportpuffers

BGT-1 gehört zu den  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -gekoppelten Transportern. Im folgenden Experiment wurde die Ionenabhängigkeit der GABA-Aufnahme untersucht. Für den  $\text{Na}^+$ -freien Puffer wurde  $\text{Na}^+$  durch Cholin und für den  $\text{Cl}^-$ -freien Puffer wurde  $\text{Cl}^-$  durch Gluconat ersetzt. In  $\text{Na}^+$ -freiem Puffer fand so gut wie keine GABA-Aufnahme statt, während bei Fehlen von Chlorid die GABA-Aufnahme auf 29% der Aufnahme in ND96 sank (Abb. 37).



**Abb. 37.** Abhängigkeit der GABA-Aufnahme durch BGT-1 von der Ionenzusammensetzung des Puffers. Die GABA-Aufnahme wurde in ND96, in  $\text{Na}^+$ -freiem Cholin-haltigem Puffer und  $\text{Cl}^-$ -freiem Gluconat-haltigem Puffer gemessen. Je 7 BGT-1-exprimierende Oocyten wurden in 100  $\mu\text{l}$  Puffer, 1 mM GABA,  $[^{14}\text{C}]\text{GABA}$  (63 Bq/nmol) 30 min lang inkubiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde nach Lyse der Oocyten gemessen. ni: nicht-injizierte Kontrollloocyten.

Diese Beobachtung wurde in elektrophysiologischen Messungen bestätigt. In Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  löste GABA keinen Strom in BGT-1-exprimierenden Oocyten aus. Im Gegensatz dazu war der GABA-induzierte Strom nicht vollständig von der Anwesenheit von  $\text{Cl}^-$ -Ionen abhängig. Durch Reduktion der Chloridkonzentration von 150 mM auf 0 mM wurde der GABA-induzierte Strom bei  $-90$  mV auf etwa 20 % verringert (Abb. 38).



**Abb. 38.** Chlorid-Abhängigkeit von GABA-induzierten Strömen. Original-Aufzeichnung der GABA-induzierten Ströme bei  $-90$  mV in Anwesenheit (150 mM) und Abwesenheit (0 mM) von Chlorid. Die Oocyten wurden jeweils 30 s lang mit GABA überspült.

### 2.5.4 Untersuchung der stöchiometrischen Kopplung von GABA/Betain-, $\text{Na}^+$ - und $\text{Cl}^-$ -Transport

#### 2.5.4.1 Aufnahme von GABA, $\text{Na}^+$ und $\text{Cl}^-$ durch BGT-1

Um die Stöchiometrie des Cotransportes von GABA mit  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  durch BGT-1 zu bestimmen, wurden Fluxmessungen mit  $[^{14}\text{C}]\text{GABA}$ ,  $^{22}\text{Na}$  und  $^{36}\text{Cl}$  durchgeführt. Zum Vergleich wurden alle Daten auf nmol/h umgerechnet. Die Aufnahme von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  durch BGT-1 exprimierende Oocyten wurde sowohl in Anwesenheit von GABA (1 mM) als auch in dessen Abwesenheit gemessen. Von der Differenz dieser beiden Werte für BGT-1-

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

exprimierende Oocyten wurden die entsprechenden Werte der nicht-injizierten Kontrollloocyten abgezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 zusammengefasst. Die Aufnahme von GABA betrug 0.58 nmol/h pro Oocyte. Die Na<sup>+</sup>-Aufnahme war mit 1.6 nmol/h 2.8 mal so hoch wie die GABA-Aufnahme (Tab. 3).

**Tab. 3.** Vergleich der Aufnahmen von Na<sup>+</sup> und GABA über BGT-1. Die Aufnahme von Na<sup>+</sup> in die Oocyten wurde sowohl in Anwesenheit von GABA (1 mM) als auch in dessen Abwesenheit gemessen. Von der Differenz dieser beiden Werte für BGT-1-exprimierende Oocyten wurden die entsprechenden Werte der nicht-injizierten Kontrollloocyten abgezogen.

Aufnahme	Bedingungen	BGT-1-exprimierende Oocyten [nmol/h pro Oocyte]	Kontrollloocyten [nmol/h pro Oocyte]	Δ [nmol/h pro Oocyte]
<sup>22</sup> Na	0 mM GABA	0.37 ± 0.10	0.21 ± 0.03	0.16 ± 0.11
<sup>22</sup> Na	1 mM GABA	2.0 ± 0.2	0.23 ± 0.03	1.8 ± 0.2
<sup>22</sup> Na	Δ ±GABA	1.6 ± 0.2	0.02 ± 0.04	<b>1.6 ± 0.2</b>
[ <sup>14</sup> C]GABA	1 mM GABA	0.64 ± 0.11	0.067 ± 0.007	<b>0.58 ± 0.11</b>

**Tab. 4.** Vergleich der Aufnahmen von Chlorid und GABA über BGT-1. Die Aufnahme von Cl<sup>-</sup> in die Oocyten wurde sowohl in Anwesenheit von GABA (1 mM) als auch in dessen Abwesenheit gemessen. Von der Differenz dieser beiden Werte für BGT-1-exprimierende Oocyten wurden die entsprechenden Werte der nicht-injizierten Kontrollloocyten abgezogen.

Aufnahme	Bedingungen	BGT-1-exprimierende Oocyten [nmol/h pro Oocyte]	Kontrollloocyten [nmol/h pro Oocyte]	Δ [nmol/h pro Oocyte]
<sup>36</sup> Cl	0 mM GABA	1.38 ± 0.02	1.29 ± 0.05	0.09 ± 0.06
<sup>36</sup> Cl	1 mM GABA	2.6 ± 0.2	0.89 ± 0.04	1.7 ± 0.2
<sup>36</sup> Cl	Δ ±GABA	1.3 ± 0.2	(- 0.4 ± 0.06)	<b>1.7 ± 0.2</b>
[ <sup>14</sup> C]GABA	1 mM GABA	1.33 ± 0.06	0.071 ± 0.004	<b>1.26 ± 0.06</b>

Die Aufnahme von GABA betrug hier 1.26 nmol/h pro Oocyte. Die Chlorid-Aufnahme war mit 1.7 nmol/h 1.3 mal so hoch wie die GABA-Aufnahme (Tab. 4). Geht man von einer ganzzahligen Stöchiometrie aus, ergibt sich aus diesen Ergebnissen ein Cotransport-



Verhältnis von 1 GABA zu 3 Na<sup>+</sup> zu 1 Cl. Dies entspräche einem Transport von 2 positiven Ladungsäquivalenten pro GABA-Molekül in die Oocyte.

#### 2.5.4.2 Vergleich der Flux-Daten mit elektrophysiologischen Daten

Parallel zu den Aufnahmemessungen wurden mit den gleichen Chargen von Oocyten elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Zum direkten Vergleich wurden die gemessenen Ströme in nmol transportierter Ladungsäquivalente umgerechnet. Ein Strom von 1 nA entspricht einem Transport von 36 pmol Ladungen pro Stunde. Der Vergleich bestätigt, dass pro nmol GABA zwei nmol Ladungsäquivalente transportiert werden. Die gesamten Messungen sind in Tab. 5 zusammengefasst.

**Tab. 5.** Vergleich von Flux- und elektrophysiologischen Daten

	GABA [nmol/h pro Oocyte]	<sup>22</sup> Na [nmol/h pro Oocyte]	<sup>36</sup> Cl [nmol/h pro Oocyte]	Erwarteter I <sub>GABA</sub> [nA] (2 Ladungs- Äquivalente/ GABA)	Gemessener I <sub>GABA</sub> [nA]
<b>GABA vs Na<sup>+</sup></b>	0.58 ± 0.11	1.6 ± 0.2	-	-32	-30 ± 9
<b>Stöchiometrie relativ zu GABA</b>	1.0	2.8	-	2	1.8
<b>GABA vs Cl<sup>-</sup></b>	1.26 ± 0.06	-	1.7 ± 0.2	-70	-60 ± 6
<b>Stöchiometrie relativ zu GABA</b>	1.0	-	1.3	2	1.7

Sowohl aus Ergebnissen der Aufnahmemessungen mit den radioaktiven Substraten als auch aus dem Vergleich mit den elektrophysiologischen Daten ergibt sich eine Gesamtstöchiometrie von GABA : Na<sup>+</sup> : Cl<sup>-</sup> von 1 : 3 : 1. Das bedeutet, dass pro GABA-Molekül drei negative und eine positive Ladung transportiert werden müssten. Dies entspricht einem Nettoeinwärtstransport von 2 positiven Ladungen.

### 2.5.4.3 Gekoppelte Aufnahme von Betain, Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>

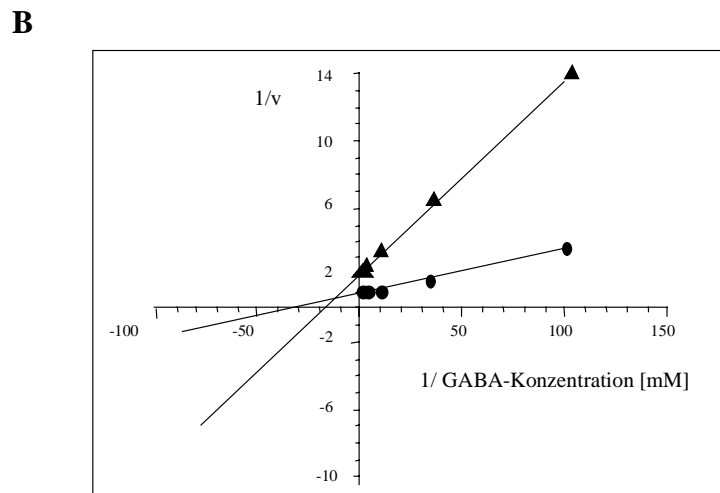
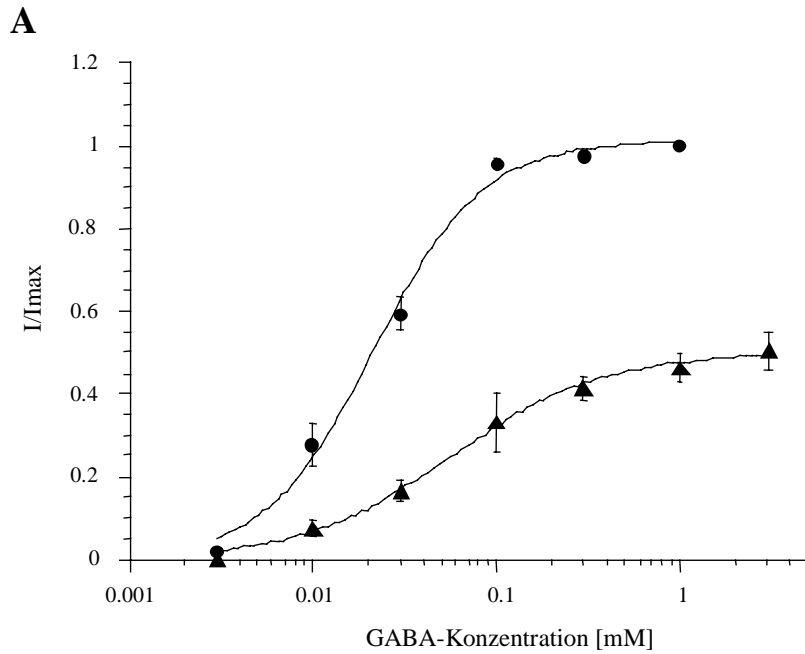
Ebenso wie der hohe  $K_m$ -Wert des BGT-1 für Betain (0.6 mM bei -50 mV) erschwerte die geringe spezifische Radioaktivität des [<sup>14</sup>C]Betains die Durchführung entsprechender Experimente zur Kopplung des Transports. Um ausreichende Aufnahmen von <sup>22</sup>Na oder <sup>36</sup>Cl zu erreichen, wurde eine Betainkonzentration von 10 mM gewählt. Hier konnte eine Na<sup>+</sup>-Aufnahme von  $5.2 \pm 1.2$  nmol/h und eine Cl<sup>-</sup>-Aufnahme von  $3.3 \pm 0.7$  nmol/h gemessen werden. Dies entspricht einer Kopplung von Na<sup>+</sup> zu Cl<sup>-</sup> von 3 : 2.

### 2.5.4.4 Bestimmung der GABA- und Na<sup>+</sup>-Affinität des BGT-1

Die GABA-induzierten Ströme sind strikt Na<sup>+</sup>-abhängig. Um diese Abhängigkeit näher zu charakterisieren, wurden der  $K_m$ -Wert des Substrates GABA bei verschiedenen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen ebenso wie der  $K_m$ -Wert für Na<sup>+</sup> bei verschiedenen GABA-Konzentrationen bestimmt. Die Reduktion der extrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration von 130 mM auf 50 mM hatte eine Verdoppelung des  $K_m$ -Wertes für GABA von  $21 \pm 2$  μM auf  $56 \pm 6$  μM und eine Halbierung des  $V_{max}$ -Wertes zur Folge (Abb. 39).

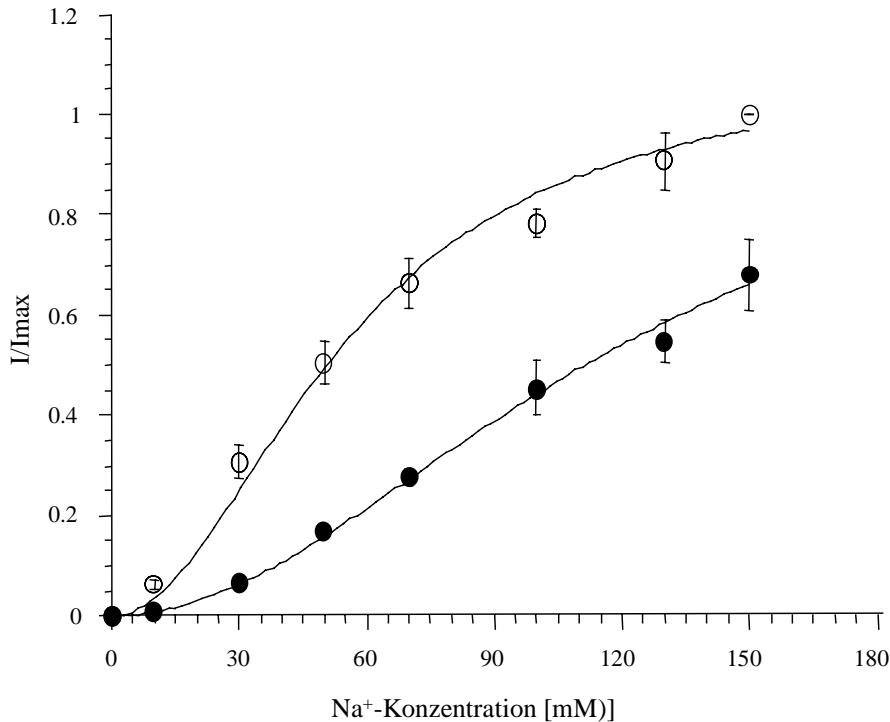
## 2 Ergebnisse und Diskussion

---



**Abb. 39.**  $Na^+$ -Abhängigkeit von GABA-induzierten Strömen. GABA-induzierte Ströme in Abhängigkeit der  $Na^+$ -Konzentration im Superfusat. (A) Effekt der  $Na^+$ -Konzentration auf den apparenten  $K_m$ -Wert von GABA: 130 mM  $Na^+$  (●):  $K_m = 0.021 \pm 0.002$  mM; 50 mM  $Na^+$  (▲):  $K_m = 0.056 \pm 0.006$  mM. (B) Analyse der Daten durch Auftragung nach Lineweaver-Burk: 130 mM  $Na^+$  (●); 50 mM  $Na^+$  (▲).

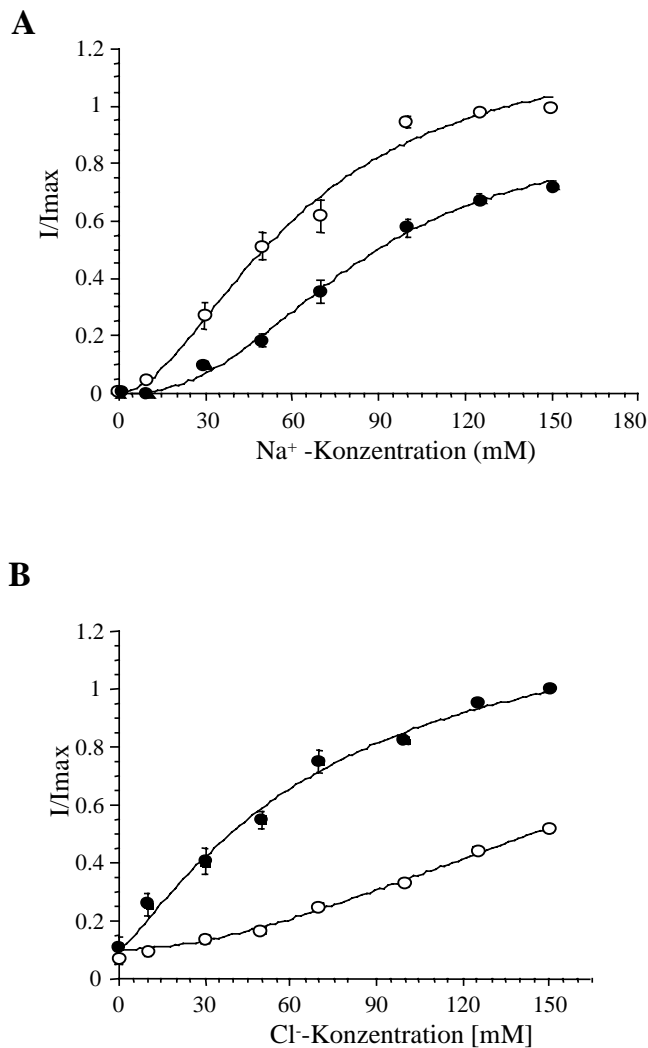
Um zu untersuchen, ob die GABA-Konzentration die  $\text{Na}^+$ -Bindung beeinflusst, wurde die GABA-Konzentration von 1 mM auf 0.3 mM verringert. Diese Verringerung der GABA-Konzentration erhöhte die für die Halbsättigung nötige  $\text{Na}^+$ -Konzentration von  $55 \pm 2$  mM auf über 120 mM (Abb. 40).



**Abb. 40.** Einfluß von GABA auf die  $\text{Na}^+$ -Bindung.  $I/I_{\text{max}}$  unter Variation der  $\text{Na}^+$ -Konzentration bei 1 mM (○) und 0.03 mM GABA (●) (-80 mV). 1 mM GABA: Halbsättigung bei  $55 \pm 2$  mM  $\text{Na}^+$ ; 0.03 mM GABA: Halbsättigung bei  $>120$  mM  $\text{Na}^+$ .

#### 2.5.4.5 Einfluss der $\text{Na}^+$ - und $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen auf den GABA-Transport

Um die Wechselwirkungen zwischen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$  beim GABA-Transport zu untersuchen, wurden bei sättigender GABA-Konzentration (1 mM) sowohl die  $\text{Na}^+$ - als auch die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration variiert. Bei einer Verringerung der extrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration von 150 mM auf 80 mM stieg die zur Halbsättigung nötige  $\text{Na}^+$ -Konzentration von  $54 \pm 3$  mM auf  $82 \pm 7$  mM (Abb. 41A). Der Hill-Koeffizient für  $\text{Na}^+$  lag für beide  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen bei  $2.5 \pm 0.2$ . Andererseits betrug die zur Halbsättigung nötige  $\text{Cl}^-$ -Konzentration  $72 \pm 3$  mM bei einer extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 150 mM (Abb. 41B); eine Verringerung auf 80 mM  $\text{Na}^+$  führte zu einer nicht-sättigbaren Abhängigkeit der GABA-induzierten Ströme von der Chlorid-Konzentration (Abb. 41B). Der Hill-Koeffizient von  $\text{Cl}^-$  lag bei  $1.1 \pm 0.2$ .

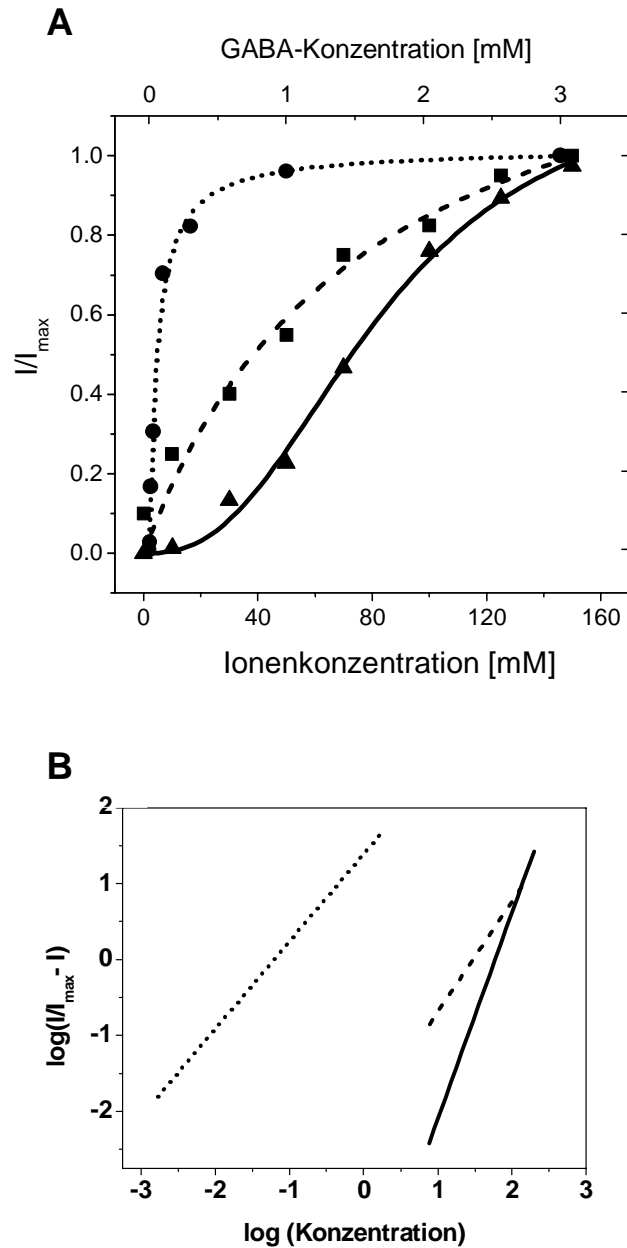


**Abb. 41.** Einfluss von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen auf den GABA-induzierten Strom. (A) Effekt der Cl<sup>-</sup>-Konzentration auf die Na<sup>+</sup>-Affinität. Cl<sup>-</sup>-Konzentration von 150 mM (○): Halbsättigung bei 54 ± 3 mM Na<sup>+</sup>; 80 mM Cl<sup>-</sup> (●): Halbsättigung bei 82 ± 7 mM Na<sup>+</sup>; Hill-Koeffizient für Na<sup>+</sup>: 2.5 ± 0.2. (B) Effekt der Na<sup>+</sup>-Konzentration auf die Cl<sup>-</sup>-Affinität. Na<sup>+</sup>-Konzentration von 150 mM (●): Halbsättigung bei 72 ± 3 mM Cl<sup>-</sup>; 80 mM Na<sup>+</sup> (○): nicht sättigbare Chlorid-Abhängigkeit.

#### 2.5.4.6 Vergleich der Hill-Koeffizienten des BGT-1 für GABA, Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>

Für alle drei Cosubstrate des BGT-1 gilt, dass deren Hill-Koeffizienten unabhängig von Spannung und Konzentration der anderen Substrate sind. Wie aus dem Hill-Diagramm in

Abb. 42 zu ersehen ist, liegen die Hill-Koeffizienten von GABA und Chlorid nahe 1, während der Hill-Koeffizient von  $\text{Na}^+$  über 2 liegt.



**Abb. 42.** Abhängigkeit des durch GABA induzierten Stroms von der Konzentration der Substrate GABA,  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Cl}^-$ . A: lineare Auftragung. B: Auftragung als Hill-Diagramm. GABA (●); Chlorid (■);  $\text{Na}^+$  (▲).

### 2.6 Diskussion zu 2.5

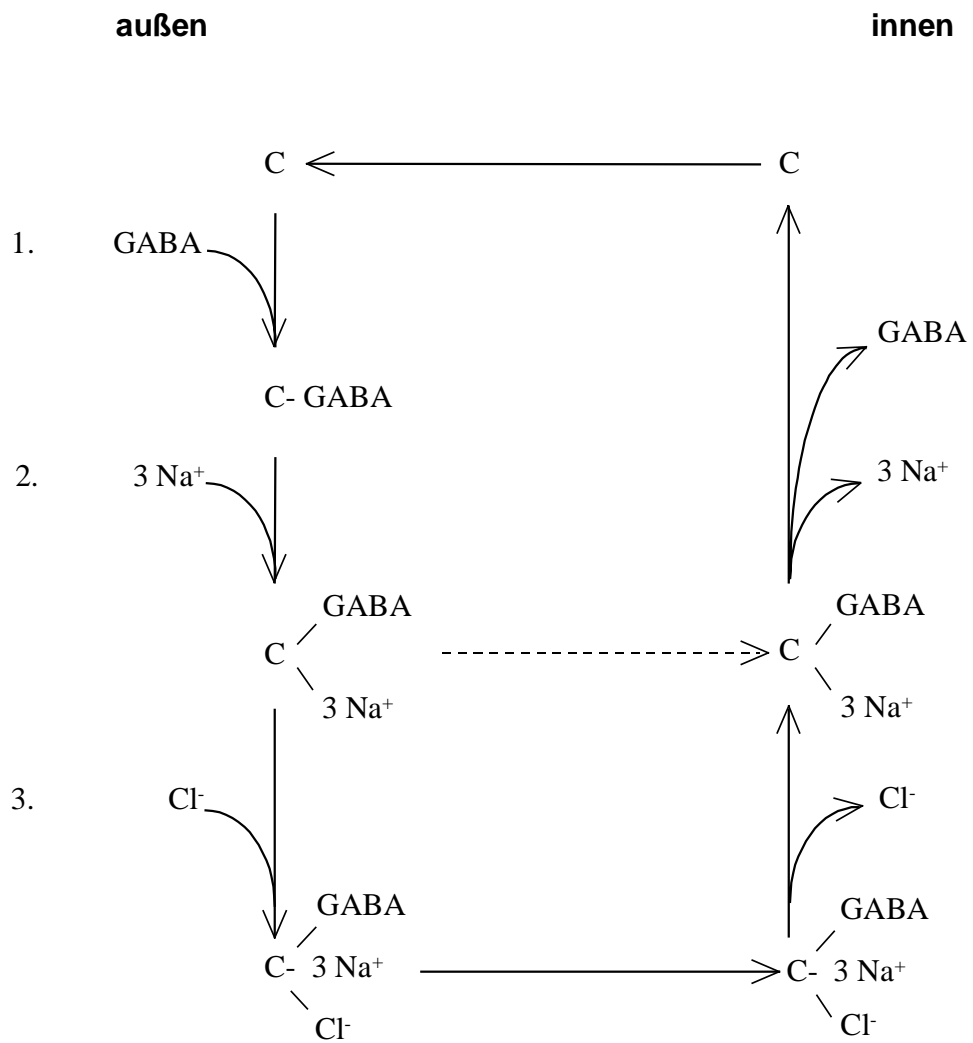
Die Untersuchung des Substratspektrums des Transporters BGT-1 zeigte, dass zur Substrat-Erkennung eine Aminogruppe wesentlich ist. Methylierte Amine werden akzeptiert, haben aber eine geringere Affinität. Guanidino-Gruppen werden dagegen kaum erkannt. Eine zusätzliche negativ geladene Gruppe wird vorgezogen, ist aber nicht essentiell. Die Substraterkennung erscheint flexibel in Bezug auf den Abstand zwischen den beiden Gruppen. Die bisher als Inhibitoren geltenden Substanzen Chinidin,  $\beta$ -Alanin und 2,4-DABA (Yamauchi et al., 1992) sind auch Substrate des BGT-1.

Wie schon früher gezeigt wurde (Yamauchi et al., 1992; Lopez-Corcuera et al., 1992; Borden et al., 1995b; Rasola et al., 1995), ist der substrat-induzierte Strom  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -abhängig. Diese Abhängigkeit erscheint für das  $\text{Na}^+$  absolut zu sein, für das Chlorid aber nur teilweise, da der GABA-Transport in chlorid-freiem Medium nur zu ca. 70% gehemmt ist. Die Kopplung des Transports von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und GABA wurde zunächst mittels radioaktiver Fluxmessungen untersucht. Hier ergab sich ein Verhältnis von 3  $\text{Na}^+$ -Ionen pro transportiertem GABA-Molekül. Für das Chlorid ergab sich ein Verhältnis von einem Chlorid-Ion pro GABA-Molekül. Daraus ergäbe sich eine Kopplung von 1:3:1 für GABA :  $\text{Na}^+$  :  $\text{Cl}^-$  und damit der Transport von zwei positiven Ladungen mit einem neutralen GABA-Molekül. Der direkte Vergleich von substratinduzierten Strömen und Fluxraten ist nur bedingt möglich. Die Fluxmessungen liefern einen Gesamtwert für die Aufnahme innerhalb eines Zeitraums von 30 min, wohingegen die elektrophysiologischen Messungen des substratinduzierten Stroms innerhalb weniger Minuten abgeschlossen sind. Daher müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein: 1. Die GABA-Aufnahme muss über den gesamten Messzeitraum proportional zur Zeit sein. 2. Das Membranpotential darf sich durch die Aufnahme von GABA nicht wesentlich verändern. Daher wurde sichergestellt, dass die Aufnahme über einen Zeitraum von mindestens 30 min konstant blieb, d.h. das Gleichgewicht noch nicht innerhalb des Messzeitraumes erreicht wurde. Die Messung des Membranpotentials während der Überspülung mit Substrat ergab, dass das Membranpotential bei Zugabe des Substrats zwar zunächst sank, dann aber wieder auf den Normalwert stieg. Dennoch ist eine Umrechnung schwierig, denn im Falle der Fluxmessungen ist das genaue Ruhe-Membranpotential der Oocyten unbekannt. Es kann zwischen -15 und -40 mV liegen. Für die elektrophysiologischen Messungen dagegen wurden nur Oocyten verwendet, die ein Membranpotential von mehr als -20 mV hatten. Die substratinduzierten Ströme wurden dann

bei einer Spannungsklemme von  $-40$  bis  $-50$  mV gemessen. Der Vergleich mit dem tatsächlich gemessenen Strom erlaubt daher nur eine Abschätzung, dass pro transportiertem GABA-Molekül zwei Ladungsäquivalente transportiert werden. Dies würde tatsächlich für ein Verhältnis von 3  $\text{Na}^+$ -Ionen zu 1  $\text{Cl}^-$ -Ion sprechen. Im Falle des gekoppelten Transports von Betain wurde allerdings ein Verhältnis von  $\text{Na}^+$  zu  $\text{Cl}^-$  von 3:2 gefunden. In der Literatur findet sich für den humanen BGT-1 eine GABA: $\text{Na}^+$ : $\text{Cl}^-$ -Kopplung von 1:3:2 (Rasola et al., 1995), während für GAT-1 eine Stöchiometrie von 1:2:1 beschrieben worden ist (Cammack et al., 1994). Somit scheinen die verschiedenen Isoformen des GABA-Transporters in der Tat unterschiedliche Cotransportstöchiometrien aufzuweisen.

Aus den Experimenten lassen sich auch Schlüsse auf die Bindungsreihenfolge der Substrate ziehen. Hierbei gilt die Annahme, dass die Diffusion der Substrate zum Transporter nicht limitierend für den Transport ist, sondern die Aufnahmegeschwindigkeit von der Zahl der vollbesetzten Transporter abhängt. Das bedeutet, dass  $V_{\max}$  (hier gemessen als  $I_{\max}$ ) bei Sättigung mit dem zuletzt bindenden Substrat erreicht wird. In elektrophysiologischen Messungen wurde gezeigt, dass  $I_{\max}$  des GABA-induzierten Stroms bei verringerter  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Cl}^-$ -Konzentration sinkt, während verringerte GABA-Konzentrationen den  $I_{\max}$ -Wert nicht verändern. Das bedeutet, dass  $I_{\max}$  von der  $\text{Na}^+$ -Konzentration abhängig ist und dass somit GABA vor  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  bindet. Die Messungen zu Wechselwirkungen von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  gaben keinen Aufschluss über die Bindungsreihenfolge. Der einzige Hinweis darauf, dass Chlorid als letztes binden könnte, ist, dass der GABA-Transport partiell  $\text{Cl}^-$ -unabhängig ist. Das heißt, dass die Bindung von GABA und  $\text{Na}^+$  für eine Translokation ausreichend ist. Daraus ergibt sich das folgende Modell (Abb. 43): Auf der extrazellulären Seite des Transporters binden 1.) ein GABA-Molekül, 2.) drei  $\text{Na}^+$ -Ionen, 3.) ein bis zwei  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Die Translokation erfolgt nach dem 3. Schritt, kann aber auch schon nach dem 2. Schritt - d.h. ohne die Bindung von  $\text{Cl}^-$  erfolgen. Die Reihenfolge der Freisetzung auf der Innenseite der Membran ist unklar. Zur Untersuchung der Reihenfolge der intrazellulären Freisetzung wäre ein System nötig, in dem man die Zusammensetzung des Mediums sowohl auf der Innen- als auch auf der Außenseite beliebig variieren könnte. Hierfür bieten sich zum Beispiel rekonstituierte Erythrocyten („ghosts“) oder Vesikel an, wie sie zur Erstellung des Bindungsmodells für den NKCC verwendet worden sind (Lytle et al., 1998).





**Abb. 43.** Bindungsmodell für den Cotransport von GABA, Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> durch BGT-1

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte

Autoklav Webeco	Webecke & Co, Bad Schwartau
Beckman 152 Microfuge	Beckman Instruments, München
Biofuge 22R	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Dampfsterilisator Typ 669	Aigner, München
Digital-pH-Meter 646	Knick, Freiburg
Dri Block <sup>®</sup> DB2A, Techne	Labtech International, Jahnsdorf
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Optiphot, Düsseldorf
Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau
Hybridisierungsöfen Mini Hybi	H. Sauer Laborbedarf, Reutlingen
Hybridisierungsöfen, Hybaid	Biometra, Göttingen
Inverses Mikroskop IM	Zeiss, Oberkochen
Kapillarenzieher DMZ-Universal Puller	Zeitz-Instrumente, Augsburg
Kapillarenzieher PN-3	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifuge Zentrifuge H-401	Kontron, München
Magnetrührer Ikamag RCT	Bachofer, Reutlingen
Medikamentenkühlschrank (18 °C)	Kirsch, Offenburg
Microcentrifuge MC 13	Amicon, Austin, Texas, USA
Microinjector	World Precision Instruments, Berlin
Mikropumpe	Bachhofer, Reutlingen
Mini Transblot <sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München
Mini-Protean <sup>®</sup> II Electrophoresis Cell:	Bio-Rad, München
Osmometer	Knauer, Eppelheim
Potter-Elvehjem-Homogenisatoren	Braun, Melsungen
Roll-Inkubator	Werkstatt, Physiologisch-chemisches Institut
Schüttelwasserbad Haake SWB 20	Haake, Karlsruhe
Sequenziergerät S2	Life Technologies, Eggenstein

Spannungsquelle Feather Volt 500	Stratagene, Heidelberg
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad, München
Spannungsquelle PS 9009 TC	Life Technologies, Eggenstein
Spektralphotometer Uvikon 860	Kontron, München
Stereomikroskop M5A	Wild Leitz, Heerbrugg, Schweiz
Stereomikroskop MSZ 5000,	A. Krüss Optronic Multimed,
	Kirchheim u. Teck
Sterile Werkbank, Laminair HLB 2448	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler Rackbeta 1214	LKB, Gräfeling
Szintillationszähler Wallac 1409	Wallac, Freiburg
Thermoblock DB-2A	Thermodux, Wertheim
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank UF 85-300S	Colora Messtechnik, Lorch
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Illuminator Vilber Lourmat	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
UV-Spectrometer GeneQuant	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Videodokumentationsgerät GDS 1	Advanced Bio-Solutions, Adelebsen
Vortex Genie 2:	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad julabo SW20-C	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserreinigungsanlage Seralpur UP 50	Seral, Ransbach-Baumbach
Zellinkubator Typ B 5060EK, CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau

### 3.2 Reagenzien und Materialien

Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid	Applichem, Darmstadt
Agarose	Life Technologies, Eggenstein
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma-Aldrich/Deisenhofen
anti-Flag-IgG aus Maus, M2	Sigma-Aldrich/Deisenhofen
anti-Maus IgG aus Ziege, Alexa546-gekoppelt	Mo Bi Tec, Göttingen
anti-Maus-IgG aus Ziege, AP-gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Cap-Analog m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G	New England Biolabs, Schwalbach

### 3 Material und Methoden

---

Collagenase (Serva17449; 0.88 U/mg)	Serva, Heidelberg
Dafilon DSM 11, nicht-resorbierbarer Faden	Braun-Dexon, Spangenberg
Dexon HR 13, resorbierbarer Faden	Braun-Dexon, Spangenberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich/Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich/Deisenhofen
DNA-Leiter, 1kb und 100 bp	Life Technologies, Eggenstein
DNase (RNase-frei)	Roche, Mannheim
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Köln
Immobilon-NC Transfer Membrane	Millipore, Eschborn
ImmunoPure Immobilized Streptavidin	Pierce, Köln
Immunount, Einbettflüssigkeit	Shandon, Frankfurt
Pfu-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinbestimmungsreagenz	Bio-Rad, München
Protein-Leiter, gefärbt	Life Technologies, Eggenstein
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Röntgenfilm, Kodak X-omat, XAR-5	Sigma-Aldrich/Deisenhofen
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
Sure clone Ligation Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Szintillationsflüssigkeit, Ultima Gold	Packard, Frankfurt
T3 und T7 RNA-Polymerase	Life Technologies, Eggenstein
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Tropix-Reagenz	PerSeptive Biosystems, Wiesbaden

Alle weiteren Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), E.Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Roche (Mannheim). Alle Restriktionsendonucleasen waren von den Firmen Life Technologies (Eggenstein), Stratagene (Heidelberg), MBI (St. Leon-Roth), Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach) und wurden mit dem mitgelieferten Puffer den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

### 3.3 Medien, Lösungen und Puffer

LB-Medium:	1 % (w/v) Bactotrypton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl
LB-Agar:	LB-Medium mit 1.5 % (w/v) Bactoagar
PBS:	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,9 % (w/v) NaCl, pH 7.4
SOB-Medium:	2 % (w/v) Bactotrypton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7.0
SOC-Medium:	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
TAE-Puffer:	40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0
6x-DNA-Probenpuffer:	37.5 % Ficoll400, je 0.63 % (w/v) Bromphenolblau, Xylencyanol in TAE-Puffer
4x-SDS-Probenpuffer:	1.9 ml H <sub>2</sub> O, 1 ml 0.5 M Tris/HCl, 0.8 ml Glycerol, 1.6 ml 10 % (w/v) SDS, 0.4 ml 2-Mercaptoethanol, 0.4 ml 1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8
5 x SDS-Elektrophoresepuffer:	15 g/l Tris/HCl, 72 g/l Glycin, 5 g/l SDS, pH 8.3

**Tab. 6.** Puffer für Transportmessungen an adhärenen Zellen

Puffername	VBH	VBI	TPH	TPI	TPO	VBIa	TPIa
Substanz	Konzentration der Pufferbestandteile [mM]						
NaCl	167	92	210	138	63	138	138
KCl	5	5	5	5	5	5	5
CaCl <sub>2</sub>	2	2	2	2	2	2	2
NaHCO <sub>3</sub>	44	44	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1	-	-	-	1	1
MgSO <sub>4</sub>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.5	0.5
D-Glucose	5.5	5.5	-	-	-	5.5	-
Glutamin	2	2	-	-	-	2	-
HEPES	10	10	10	10	10	10	10
pH-Wert	7.4 (10 % CO <sub>2</sub> )	7.4 (10 % CO <sub>2</sub> )	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
mOsmol/l	450	300	450	300	150	300	300

**Tab. 7.** Puffer für Präparation und Transportmessungen von Oocyten

Puffername	OR2 <sup>-</sup>	OR2 <sup>+</sup>	ND96	ND44	ND96/Gluc	ND44/Gluc
Substanz	Konzentration der Pufferbestandteile [mM]					
NaCl	82.5	82.5	96	44	-	-
NaGluconat	-	-	-	-	96	44
KCl	2.5	2.5	2	2	2	2
CaCl <sub>2</sub>	-	1	1.8	1.8	1.8	1.8
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1	-	-	-	-
HEPES	5	5	5	5	5	5
pH-Wert	7.8	7.8	7.4	7.4	7.4	7.4
mOsmol/l	ca. 187	ca. 187	ca. 220	ca. 110	ca. 220	ca. 110

### 3.4 Kultivierung von Säugetierzellen und Bakterien

#### 3.4.1 Säugetierzellen

##### 3.4.1.1 Lösungen und Medien

Die verwendeten Lösungen und Materialien entsprechen den Beschreibungen von Hamprecht und Löffler (1985).

##### 3.4.1.2 Anlegen von astrogliareichen Primärkulturen

Die Kulturen wurden aus Gehirnen neugeborener NMRI-Mäuse und Wistar-Ratten angelegt. Alle Schritte wurden auf der Sterilbank durchgeführt. Fünf Kulturschalen (A-E, 100 mm Durchmesser) wurden mit 10 ml Präparierpuffer (137 mM NaCl, 58 mM Saccharose, 5.5 mM Glucose, 5.4 mM KCl, 0.22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.17 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) gefüllt und auf Eis gestellt. Ein mit 70 % Ethanol desinfiziertes Präparierbesteck wurde bereitgelegt. In die Schale C wurde ein Nylonnetz mit Maschenweite 211 µm gelegt, in Schale D eines mit 134 µm. Der Puffer in Schale E diente zum Nachspülen. Das Tier wurde nach kurzem Baden in Schale A mit einer Schere dekapitiert. Sodann wurde das Gehirn mit einer abgewinkelten Pinzette aus dem Kopf in eine leere Petrischale gedrückt. Dieses und alle weiteren Gehirne

wurden in Schale B aufbewahrt. Danach wurden die Gehirne mit der Pinzette in das erste Nylonnetz überführt und durch dieses in Schale C passiert. Die suspendierten Zellen wurden mit einer Pipette in das zweite Nylonnetz überführt und durch dieses in Schale D passiert. Die Zellsuspension wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und bei 500 g 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag durch Trituration in vorgewärmtem DMEM/10 %FCS/PS resuspendiert. Die Zelldichte wurde bestimmt und die Suspension so verdünnt, dass eine Konzentration von  $3 \times 10^6$  lebenden Zellen/5 ml erreicht wurde. Je 5 ml Zellsuspension wurden pro 60 mm-Kulturschale ausgesät. Die Kulturen wurden im Zellinkubator bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und Begasung mit 10 % CO<sub>2</sub> gehalten. Das Medium wurde alle 7 Tage erneuert. Die Antibiotica wurden ab dem ersten Medienwechsel weggelassen.

#### 3.4.1.3 Kultivierung von Zelllinien

C6-Zellen bezeichnen Zellen eines C6-geannten Klonen einer von Benda et al. (1968) beschriebenen Ratten-Gliom-Zelllinie. Bei den HEK-293-Zellen handelt es sich um Leberzellen epithelialer Herkunft (Graham et al., 1977). Beide Zelllinien wurden in 90 % DMEM/10 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden zwischen den Passagen 20 und 30 verwendet.

#### 3.4.2 Bakterien

Für die Vermehrung der Plasmide wurden die *E. coli*-Stämme XL-1 (Stratagene, Heidelberg), DH10B (Life Technologies, Eggenstein) verwendet. Alle Stämme wurden in Medium nach Luria und Bertani (Bertani, 1952) kultiviert. Um selektive Bedingungen zu erzeugen, wurde dem Medium Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) beigegeben. Für das Wachstum auf Agarplatten wurde das Flüssigmedium mit 15 g/l Agar versetzt.

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

**Anmerkung:** Bei den beschriebenen Methoden wurden für die Nucleinsäuren grundsätzlich Mengenangaben verwendet. Die Konzentrationen von Nucleinsäuren lagen üblicherweise zwischen 0.1 mg/ml und 1 mg/ml. Als Lösungsmittel wurde entweder Wasser oder TE-Puffer

(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) verwendet. Die genannten Endvolumina der Ansätze wurden dann durch Zugabe von Wasser erreicht. Als Wasser wurde grundsätzlich entionisiertes Wasser verwendet, das zusätzlich über eine Seralpuranlage gereinigt wurde. Für die RNA-Methoden wurde dieses Wasser destilliert und nachfolgend mit Diethylpyrocarbonat (Endkonzentration 0.1 %) behandelt. Nach dem Autoklavieren konnte dieses Wasser für alle Methoden benutzt werden.

#### **3.5.1 Molekularbiologische Standardmethoden**

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wurden entsprechend den Angaben im Laborhandbuch von Sambrook et al. (1989) oder der Methodensammlung von Kimmel und Berger (1987) durchgeführt.

##### **3.5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren**

Die Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bei  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Eine Extinktion von 1.0 entspricht einer Konzentration von ca. 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Für zuverlässige Bestimmungen sollte die Extinktion zwischen 0.1 und 1 betragen (entsprechende Verdünnung). Um Proteinverunreinigungen zu registrieren, wurde zusätzlich die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm bestimmt. Für „reine“ DNA ergab sich ein Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zur Extinktion bei 280 nm von 1.6 bis 1.9 bzw. von ca. 2.0 für RNA.

##### **3.5.1.2 Extraktion von DNA mittels Phenol/Chloroform**

Die zu reinigende DNA-Lösung wurde mit  $\frac{1}{2}$  Volumen TE-gesättigtem Phenol und  $\frac{1}{2}$  Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt und 1 min lang gemischt. Nach Trennung der organischen und der wässrigen Phase mittels Zentrifugation (14000 Upm, 3 min) wurde die wässrige Phase abgenommen.

##### **3.5.1.3 Fällern, Waschen und Trocknen von DNA und RNA**

DNA wurde in 70 % Ethanol mit 0.3 M NaAc (Endkonzentrationen) mindestens 2 h bei  $-20$  °C gefällt und bei 14000 Upm (4 °C, 20 min) abzentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14000 Upm, 4 °C, 15 min). Der Niederschlag wurde in der „Speed-Vac“-Zentrifuge oder im



Ekksikator unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in einem angemessenen Volumen Wasser oder TE (Endkonzentration 0.25-1.0 µg/µl) wieder aufgenommen und bei -20 °C gelagert. RNA wurde in 70 % Ethanol mit 0.3 M NaAc (Endkonzentrationen) über Nacht bei -70 °C gefällt und durch Zentrifugation (14000 Upm, 4 °C, 45 min) sedimentiert, der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14000 Upm, 4 °C, 30 min). Der Niederschlag wurde in der "Speed-Vac"-Zentrifuge oder im Ekksikator unter Vakuum getrocknet. Die RNA wurde in einem angemessenen Volumen Wasser (Endkonzentration 0.5-1.0 µg/µl) wieder aufgenommen und bei -70 °C gelagert. Alle verwendeten Glasgeräte wurden zuvor ausgebacken, RNase-freies Plastikmaterial und Chemikalien wurden verwendet. Wasser wurde vor Verwendung mit DEPC (1 ml/l) versetzt, über Nacht gerührt und danach autoklaviert.

#### **3.5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Plasmid-DNA wurde aus 3-4 ml einer Bakterien-Übernachtskultur mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

#### **3.5.1.5 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonucleasen**

1 bis 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 2-4 U der entsprechenden Restriktionsendonuclease in dem mitgelieferten Puffer in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei der optimalen (enzym-spezifischen) Temperatur nach den Angaben des Herstellers inkubiert.

#### **3.5.1.6 Agarosegelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden in 1% (w/v)-igen horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Lauf- und Gelpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Banden wurden durch Inkubation in TAE mit 100 ng/ml Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zur Darstellung der Gele wurde die Agarose in TAE suspendiert und aufgekocht. Die klare, heiße Lösung wurde auf ca. 55 °C abgekühlt. Die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen und Taschen durch einen Teflonkamm eingebracht. Die DNA-Proben wurden vor Auftragung mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 5-10 V/cm. Als Längenstandard wurde die 100 bp DNA-Leiter oder die 1 kb DNA-Leiter von Life Technologies (Eggenstein) verwendet.

### 3.5.1.7 Gelextraktion

Die DNA wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und ein Teil mit Ethidiumbromid angefärbt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Die weitere Reinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltenen Lösungen der DNA-Fragmente wurden direkt oder nach Behandlung des linearisierten Vektors mit alkalischer Phosphatase in die Ligationsreaktion eingesetzt.

### 3.5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurden ca. 100 ng dephosphorylierter Vektor-DNA mit der Fragment-DNA in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 eingesetzt. Ligiert wurde mittels T4-Ligase und 5-fach Ligationspuffer (Roche, Mannheim) bei 21 °C für 2 h oder bei 4 °C oder 16 °C über Nacht.

### 3.5.1.9 Transformation elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Verwendet wurden die Stämme XL-1 und DH5 $\alpha$ . 100  $\mu$ l der bei -70 °C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit einem Teil des Ligationsansatzes oder Plasmid vorsichtig gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad, Elektrodenabstand 0.2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$ . Sofort nach dem Puls wurde 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden aliquote Teile oder Verdünnungen (in LB-Medium) des Ansatzes auf LB-Platten mit dem dem Plasmid entsprechenden Antibioticum ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht konnten Einzelkolonien isoliert werden.

### 3.5.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden die Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*; Qiagen) oder die Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*; Stratagene) verwendet. Ein 100  $\mu$ l-Ansatz enthielt 0.1-10 ng Plasmid, 20-100 pmol von jedem Oligodesoxynucleotid, 2  $\mu$ l dNTP-Gemisch (jedes Desoxynucleotid 10 mM), 10  $\mu$ l Reaktionspuffer (Taq: 15mM MgCl<sub>2</sub>, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Pfu: 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 1 % Triton X-100, 200 mM Tris-

HCl (pH 8.7)) und 1-5 U Polymerase. Der fertige Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Folgendes Zyklusprotokoll wurde benutzt: je 20 bis 35 Zyklen 30 s-1 min bei 94 °C, 45 s-1.5 min bei 50 °C, 1-2 min bei 72 °C. Es wurden Oligonucleotide mit einer Länge von 18 bis 31 Nucleotiden verwendet.

#### **3.5.1.11 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung wurde mit geringen Modifikationen nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Zellkulturen wurden auf Schalen mit 10 cm Durchmesser angelegt. Konfluente Kulturen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und dann mit 2.5 ml Denaturierungslösung (4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Trinatriumcitrat, 0.1 M Mercaptoethanol, pH 7.0) lysiert. Das Lysat wurde mit einem Gummischaber zusammengesoben und in ein steriles Plastikgefäß überführt. Die DNA wurde im Potter-Elvehjem-Homogenisator solange geschert, bis das Lysat keine Fäden mehr zog. Dem Lysat wurde dann N-Laurylsarcosinat mit einer Endkonzentration von 0.5 % (w/v) zugegeben. Aus dieser Lösung wurde durch Zugabe von 0.8 ml Ethanol bei 4 °C in 5 min die RNA ausgefällt. Das Lysat wurde 40 min lang bei 4000 g zentrifugiert, sodann wurde das Sediment in 1.25 ml Denaturierungslösung aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 0.125 ml 2 M Natriumacetat, pH 4.0, 1.25 ml wassergesättigtes Phenol und 0.25 ml Chloroform gegeben. Nach kräftigem Schütteln des Gemisches wurden die Phasen durch 15-minütige Inkubation auf Eis und anschließendes Zentrifugieren (4 °C, 4000 g, 30 min) getrennt. Die wässrige Phase wurde sorgfältig von der Interphase getrennt und in ein neues Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 1.4 ml Isopropanol und Inkubation bei -20 °C für 1 h wurde die RNA nochmals gefällt. Nach Zentrifugation (4 °C, 4000g, 30 min) wurde das Sediment in 0.6 ml Denaturierungslösung aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde 0.6 ml Isopropanol gegeben und die RNA über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Nach einer Zentrifugation in der Tischzentrifuge (10 min, 10000 g) wurde das Sediment einmal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, bevor es getrocknet und in Wasser aufgenommen wurde.

#### **3.5.1.12 mRNA-Isolierung**

mRNA wurde entsprechend den Angaben im Laborhandbuch von Sambrook et al. (1989) isoliert.

#### **3.5.1.13 Reverse Transcription**

Ein 12 µl-Ansatz, der 500 ng Oligo(dT)<sub>12-18</sub> und 1 µg RNA enthielt, wurde 10 min lang auf 70 °C erhitzt und dann schnell auf Eis gekühlt. Danach wurden 4 µl 5 x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP zugegeben. Der Ansatz wurde 2 min lang auf 42 °C erhitzt, bevor 200 U Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) zugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde 1 h lang bei 42 °C inkubiert. Sodann wurde die Reverse Transcriptase durch 15 minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Alternativ wurde die Reaktionsmischung mit 200 ng mRNA und 200 ng zufallskodierten Hexameren angesetzt. In diesem Falle wurde vorher für 10 min bei 25 °C inkubiert. Ein Anteil von 2 µl wurde direkt in einer PCR-Reaktion als Matrize eingesetzt.

#### **3.5.1.14 Klonierung von PCR-Produkten**

Zur Sequenzierung wurden RT-PCR-Fragmente in den Vektor pUC18 kloniert. In einem 20 µl-Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt: 60 - 100 ng PCR-Produkt, 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 10 mM Magnesiumacetat, 0.5 mM ATP, 0.2 mM dNTP, 6 U Polynucleotidkinase, 6 U Klenow-Polymerase. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Um die Nucleotide abzutrennen, wurde der Ansatz durch eine Gelfiltrationssäule (Sephacryl S-200) zentrifugiert, die mit 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA äquilibriert und dann trocken zentrifugiert wurde. Der 20 µl-Ansatz wurde auf die Säule gegeben, bevor nochmals zentrifugiert wurde. Das Eluat besaß ein Volumen von ca. 20 µl. Die Ligation wurde in einem 20 µl-Ansatz folgender Zusammensetzung durchgeführt: 10 ng PCR-Produkt, 50 ng SmaI-geschnittener dephosphorylierter Vektor, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 5 % Polyethylenglycol 5000, 10 mM DTT, 6U T4-DNA-Ligase. Die Ligation bei 4, 16 oder 25 °C dauerte 2 h bis 16 h. Der Ligationsansatz konnte dann für die Transformation benutzt werden. Für die Klonierung von RT-PCR-Produkten der Pfu-Polymerase konnte das PCR-Produkt direkt für eine Ligationsreaktion mit dem Vektor pUC18 verwendet werden.

#### **3.5.1.15 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungen wurden mit doppelsträngigen Plasmiden unter Verwendung von Universalprimern durchgeführt. Dazu wurde das Sequenase-Version 2.0-System (Amersham)

verwendet. Um Plasmide direkt sequenzieren zu können, müssen diese zunächst denaturiert werden. 5 µg Plasmid wurden in 100 µl Wasser gelöst und durch Zugabe von 10 µl 2 M NaOH, 2 mM EDTA denaturiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde die Plasmidlösung durch Zusatz von 10 µl 3 M Natriumacetat-Puffer (pH 5.2) neutralisiert und die DNA durch Zugabe von 300 µl Ethanol bei -70 °C in 15 min ausgefällt. Das durch Zentrifugation erzeugte Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 7 µl Wasser aufgenommen. Dazu wurden 2 µl Pufferkonzentrat (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl) und 0.5 pmol Universalprimer gegeben. Die Hybridisierung des Primers wurde durch vollständige Denaturierung während einer 2 minütigen Inkubation bei 65 °C und langsames Abkühlen der Mixtur auf 30 °C erreicht. Nach Kühlung auf Eis wurden 1 µl 0.1 M DTT, 2 µl dGTP/dCTP/dTTP-Gemisch (je 1.5 µM), 0.5 µl [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP und 3.2 U Sequenase zugegeben. Der Ansatz wurde 2 bis 5 min bei RT inkubiert. Die Polymerisation wurde gestoppt, indem jeweils 3.5 µl der Mixtur zu 2.5 µl Terminationslösung (80 µM von jedem dNTP, 8 µM eines ddNTP, 50 mM NaCl) gegeben wurden. Zur vollständigen Beendigung der Reaktion wurden noch 4 µl Stopplösung zugegeben (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylencyanol).

Die Proben wurden in einem denaturierenden 5.5 %igen Acryamidgel (Dimensionen 300 mm x 400 mm x 0.4 mm) bei einer konstanten Leistung von 50 W aufgetrennt. Als Laufpuffer dient TBE-Puffer (0.1 M Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8.3); dem Gel war 8.3 M Harnstoff zugesetzt worden. Nach der Elektrophorese wurde der Harnstoff durch Inkubation in 15 % Methanol, 5 % Essigsäure entfernt, das Gel auf Filterpapier aufgezogen und getrocknet und über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt. Im Falle von automatischer Sequenzierung wurden die DNA-Proben an die technischen Assistentinnen (Fr. Tolle, Universität Bochum; Fr. Tippmann, Universität Tübingen) zur „dye-terminator-cycle“-Sequenzierung gegeben.

#### **3.5.1.16 *in vitro*-Transcription**

3 µg Plasmid wurden durch Restriktionsverdau auf der 3'-Seite der cDNA linearisiert. Der Ansatz wurde deproteinisiert, das Plasmid gefällt und getrocknet. In einem 20 µl-Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt: 1-2 µg linearisiertes Plasmid, 4 µl Transcriptionspuffer (0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin-3 HCl, 125 mM NaCl) 2 µl 0.1 M DTT, 2 µl 10 mM dNTP, 2 µl 10 mM CAP-Analog, 40 U RNase-

Inhibitor, 50 U RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde bei 37 °C 1 h lang inkubiert, bevor 10 U DNase I (RNase-frei) zugegeben wurden und nochmals für 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nachfolgend wurde der Ansatz deproteinisiert und die RNA gefällt. Üblicherweise erhielt man bei diesem Verfahren 10 µg RNA.

#### 3.5.1.17 RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von CLC-2, CLC-3 und I<sub>CLN</sub>

Zunächst wurde RNA aus fetalem und adultem Gesamtgehirn und aus neuronenreicher bzw. astrogliareicher Primärkultur isoliert. Diese RNA wurde für die Synthese von cDNA verwendet, die in einer anschließenden PCR eingesetzt wurde. Zur Amplifikation der entsprechenden cDNA-Abschnitte wurden die Oligonucleotide rCIC2s, rCIC2a, rICLN<sub>s</sub>, rICLN<sub>a</sub>, rCIC3s und rCIC3a verwendet (s. Tab. 8). Als Positivkontrolle diente Plasmid-DNA, die die jeweilige cDNA-Sequenz enthielt (s. Tab. 11). Im Falle des I<sub>CLN</sub> lag ein Plasmid mit der cDNA des Hunde-I<sub>CLN</sub> vor. Daher wurden die Oligonucleotide so ausgewählt, dass sie auf beide Sequenzen passten. Für den CLC-2 wurde die Position der Oligonucleotide so gewählt, dass eine Unterscheidung der zwei Spleißvarianten CLC-2L und CLC-2S (Chu und Zeitlin, 1997) möglich war. Die Länge und das Restriktionsmuster der RT-PCR-Produkte wurden mittels Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

**Tab. 8.** Oligonucleotide

Name	Nucleotidsequenz (5' - 3') (veränderte Sequenzen: kursiv)	Position	Referenz (GenBank Accession Number)	Produkt- länge [bp]
rCIC2s	CACAGAGGACTCAGGCTTCC	2220 – 2239	AF005720	275 oder 215
rCIC2a	TCATCTTGCCTTCCAGGTCT	2494 - 2475		
rICLN <sub>s</sub>	AGCTTCCTCAAAAGCTTCCC	45 – 64	L26450	177
rICLN <sub>a</sub>	GGTGGGGTACTCCAGTGAGA	221 - 202		
rCIC3s	CAGCCATTACTGCTGTGATAGCC	1628 – 1650	D17521	336
rCIC3a	GCTCCACAGCAATCCCCTCAATC	1963 - 1941		
rCIC3bs	<i>CGGGATCCTGCAAGGAACTCATTATACAATG</i>	479-500	D17521	2318
rCIC3xa	<i>GCTCTAGACCTCATCTACAGGACTCAGTTG</i>	2797-2775		
rCLC3fs	<i>CGGGATCCATGGACTACAAGGACGACGATGA</i>	494-510	D17521	2322
rCLC3xa	<i>TAAGACAAATGGAGGCAGC</i> <i>GCTCTAGACCTCATCTACAGGACTCAGTTG</i>	2797-2775		

### 3.5.1.18 Klonierung der CLC-3-codierenden Sequenz aus astrogliareicher Primärkultur

Aus astrogliareicher Ratten-Primärkultur wurde mRNA isoliert und diese zur cDNA-Synthese verwendet. Anschließend wurde diese cDNA in einer PCR eingesetzt. Um die Gefahr von Mutationen während der PCR zu minimieren, wurde Pfu-DNA-Polymerase verwendet, die aufgrund einer intakten 3'→5' Exonucleaseaktivität mit sehr geringer Fehlerrate polymerisiert. Zur Amplifikation der CLC-3 codierenden Sequenz wurden die Oligonucleotide rCLC3bs und rCLC3xa verwendet. Diese Oligonucleotide enthalten eine endständige Schnittstelle für BamHI bzw. XbaI, welche das gerichtete Einfügen in einen geeigneten Vektor erleichtern sollen. Das 2318 bp-lange PCR-Produkt wurde zunächst in den pUC18-Vektor eingefügt. Zur Sequenzierung wurde die rCLC-3-codierende DNA-Sequenz in Abschnitten von 50 bp bis 800 bp subkloniert. Für die Expression in *Xenopus*-Oocyten wurde die rCLC-3 codierende Sequenz mithilfe der BamHI- und der XbaI-Schnittstellen in die entsprechenden Schnittstellen des Oocyten-Expressionsvektors pGemHeJuel eingefügt. Für die Expression in Säugetierzellen wurde die Sequenz auf die gleiche Weise in den Expressionsvektor pcDNA3.1 eingefügt. Um die Detektion des rCLC-3-Proteins mittels eines Epitop-Antikörpers zu ermöglichen, wurde eine DNA-Sequenz, die für das Flag-Epitop codiert, an das 5'-Ende der CLC-3-codierenden Sequenz angefügt. Hierzu wurde eine PCR unter Verwendung der Oligonucleotide rCLC3fs und rCLC3xa durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in die Expressionsvektoren pGemHeJuel und pcDNA3.1 eingefügt.

**Tab. 9.** Klonierungs- und Expressionsvektoren

Name	GenBank- bzw. Literatur-Referenz	Verwendung
pUC18	L08752	Klonierung von PCR-Produkten
pBluescriptIIKS(-)	X52329	<i>in vitro</i> -Transcription von cDNAs
pcDNA3.1	Invitrogen	Expression von cDNAs in Säugetierzellen
pGemHeJuel	Liman et al., 1992	<i>in vitro</i> -Transcription von cDNAs

### 3 Material und Methoden

**Tab. 10.** Vorhandene Plasmide

cDNA	GenBank-Referenz bzw. Herkunft	Vektor (Klonierungsstelle)	<i>in vitro</i> - Transcription: Linearisierung/ RNA-Polymerase	Verwendung für Transfektion
rCLC-2	AF005720 Thiemann et al., 1992	pBluescriptSK (mit CIC0-5`NTR) (XhoI, EcoRI)	NotI/T7	-
cBGT-1	M80403 Yamauchi et al., 1992	pSPORT (Sall/NotI)	NotI/T7	-
cpICln	L26450 Paulmichl et al., 1992	pcDNA3.1	-	-
EGFP	U76561 Melzig pers. Gabe	pcDNA3.1	-	+
rMCT1	Rahman, 1999	pGemHeJuel (EcoRI)	EcoRI/T7	-

**Tab. 11.** Neu konstruierte Plasmide

cDNA	Position	Vektor (Klonierungsstelle)	<i>in vitro</i> -Transcription: Linearisierung/ RNA-Polymerase	Verwendung für Transfektion
rCLC-3	479-2797	pUC18 (SmaI)	-	-
rCLC-3	479-2797	pGemHeJuel (BamHI, XbaI)	NotI/T7	-
FLAG- rCLC-3	481-2797	pGemHeJuel (BamHI, XbaI)	NotI/T7	-
rCLC-3	479-2797	pcDNA3.1 (BamHI, XbaI)	-	+
FLAG- rCLC-3	481-2797	pcDNA3.1 (BamHI, XbaI)	-	+
cpICln	1-1569	pBluescriptKS (HindIII, XhoII)	NotI/T7	-



## 3.6 Expressionssysteme

### 3.6.1 *Xenopus laevis*-Oocyten

#### 3.6.1.1 Präparation der Oocyten

Ein weiblicher Frosch der Art *Xenopus laevis* wurde durch 15 minütiges Eintauchen in 1 l Wasser mit 1g/l 3-Aminobenzoessäureethylester narkotisiert. Der Frosch wurde mit dem Rücken auf ein feuchtes, eisgekühltes Tuch gelegt. Mit einem Skalpell wurde ein ca. 1 cm langer Einschnitt in die Bauchhaut und anschließend in die Muskelschicht gemacht. Durch diesen Einschnitt wurden die Ovarloben herausgeholt, von denen eine für ein Experiment erforderliche Menge abgeschnitten wurde. Nach der Entnahme wurde die Muskelschicht durch einen resorbierbaren Faden genäht (Dexon HR 13, 45 cm, 1 metrisch, 5/0 USP, Braun-Dexon) und die Haut mit einem nichtresorbierbaren Faden genäht (Daifilon DSM 11, 45 cm, 0.7 metrisch, 6/0 USP, Braun-Dexon). Das entnommene Ovar wurde in ein Becherglas mit 5 ml MBSH (110 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM Tris-HCl, pH 7.6) gelegt. Der Frosch wurde zum Aufwachen unter ein feuchtes Tuch gelegt. Das Ovar wurde mit MBHS gewaschen und dann in eine Petrischale mit OR2<sup>-</sup> (82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.0 mM HEPES-NaOH, pH 7.2) überführt und in kleine Stücke geschnitten. Aus den Ovarstücken wurden die Oocyten durch Inkubation in einem Erlenmeyerkolben mit 25 ml OR2<sup>-</sup>-Lösung, die 2 mg/ml Collagenase (Serva 17449; 0.88 PZ U/mg) enthält, bei 28 °C und leichtem Schütteln freigesetzt. Der Vorgang dauerte je nach Bindegewebsstärke 2-5 h. Die Collagenasebehandlung wurde beendet, wenn keine Blutgefäße auf den Oocyten mehr sichtbar waren und bei einem Großteil der Oocyten die Follikelschicht abgedaut war. Um die Collagenase zu entfernen, wurden die Oocyten mit ca. 1 l OR2<sup>-</sup> gewaschen und zuletzt in OR2<sup>+</sup> (OR2<sup>-</sup>, das 1 mM CaCl<sub>2</sub> enthält) überführt. Die Oocyten wurden über Nacht bei 18 °C inkubiert und am nächsten Tag aussortiert. Für die Injektion eignen sich nur Oocyten der Stadien 5 und 6, in denen die Oocyten gleichmäßig gefärbt sind und eine scharfe Grenze zwischen animalelem und vegetativem Pol haben. Der animale Pol sollte nicht aufgehellert sein, und die Oocyten sollten einen Durchmesser von ca. 1 mm haben.

#### 3.6.1.2 Expression von cRNA und mRNA in Oocyten

In *Xenopus laevis*-Oocyten kann *in vitro* synthetisierte RNA oder mRNA exprimiert werden (Gurdon et al., 1971). Dazu wurden gesunde Oocyten der Stadien 5 und 6 aussortiert und in einen sogenannten "Eierbecher" plaziert. Dabei handelt es sich um eine Petrischale, in deren Boden Vertiefungen mit 1 mm Durchmesser und 0.5 mm Tiefe eingelassen sind. Mit Hilfe eines Microinjektors wurden bis zu 50 nl in jede Oocyte injiziert. Um eine Injektion in den Kern zu vermeiden, wurden die Oocyten so angestochen, dass die Spitze der Nadel in den vegetativen Pol zeigt. Bei einer üblichen Konzentration der RNA von 1 µg/µl entsprach dies 50 ng. Als Matrizen für die *in vitro*-Transcription der cRNA von rCLC-2, rCLC-3 und I<sub>CLn</sub> wurden linearisierte Plasmide verwendet, die die entsprechende cDNA-Sequenz in einem Transkriptionsvektor enthielten. Pro Oocyte wurden 15 bis 25 ng der cRNA injiziert. Die injizierten Oocyten konnten bei 18 °C bis zu 10 Tage in OR2<sup>+</sup> gehalten werden, dem 10 mg/l Gentamycin zugesetzt wurde. Nach 3 bis 6 Tagen Expression wurden die Transportmessungen durchgeführt.

#### 3.6.2 Transfektion von HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden in einer Dichte von  $2.5 \cdot 10^5$  Zellen pro cm<sup>2</sup> in den Kulturschalen der gewünschten Größe ausgesät. Nach 6-8 h im Brutschrank wurden die Zellen nach der modifizierten Calciumphosphat-Methode von Chen und Okayama (1988) transfiziert. Hierzu wurde die frisch hergestellte CaCl<sub>2</sub>-haltige Plasmid-DNA-Lösung (20 µg/ml Plasmid-DNA, 20 mM CaCl<sub>2</sub>) 1:2 mit einem BES-Puffer (0.28 M NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM BES, pH 6.95) durch 1-minütige Behandlung mit dem Vortex-Mixer gemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde dieses Gemisch tropfenweise in das Medium der Zellkulturschalen gegeben (1 µg DNA/ml). Nach 12-16 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Experimente wurden 40 bis 52 Stunden nach der Transfektion durchgeführt.

## 3.7 Transportmessungen

### 3.7.1 Transportmessungen an adhärennten Zelllinien

Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von  $3 \times 10^6$  pro 60 mm-Kulturschale herangezogen. Die Transportmessungen wurden bei 37 °C oder bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen dreimal mit 3 ml isotonem Puffer gewaschen (138 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.8). Für die Effluxmessungen wurden die Zellen in einigen Experimenten zwei Tage vor der Messung in hypertonem DME-Medium (450 mOsmol/l nach Zugabe von NaCl) inkubiert. Dem Vorbeladungs- oder Transportpuffer wurden 1 mM unmarkiertes Substrat und [<sup>3</sup>H]-markiertes Substrat (18 pM; spezifische Aktivität im Puffer: 12 kBq/mmol) hinzugefügt. Zur Vorbeladung wurden die Zellen 2 h lang in einem speziellen Vorbeladungspuffer (VBH, VBI bzw. VBHa; s. Tab. 6) bei 37 °C mit radioaktivem Substrat inkubiert. Für die Effluxmessungen wurden, relativ zum Vorbeladungspuffer, isoosmotische und hypoosmotische Transportpuffer (TPH, TPI bzw. TPO; s. Tab. 6) ohne radioaktives Substrat verwendet (3-5 bzw. 8-12 ml pro 9.6 cm<sup>2</sup>- bzw. 28 cm<sup>2</sup>-Schale). Aus dem Transportpuffer wurden regelmäßig aliquote Proben von 100 bis 500 µl entnommen und mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Für Aufnahmemessungen wurde ein Na<sup>+</sup>-freier Transportpuffer verwendet, der Cholinchlorid statt NaCl und K<sup>+</sup>-Salze statt der übrigen Na<sup>+</sup>-Salze enthielt. Um die Messung zu beenden, wurde der Transportpuffer abgesaugt und die Kulturschale dreimal mit 3 ml eiskaltem isoosmotischen Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde 1 ml 0.1 M HCl auf die Kulturschale gegeben, um die Zellen zu lysieren. Von der entstehenden Suspension wurden 900 µl mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität bestimmt. 100 µl wurden in die Proteinbestimmung eingesetzt, die nach Bradford (Bradford, 1976) mit dem Bio-Rad Proteinbestimmungsreagenz (Bio-Rad, München) durchgeführt wurde.

### 3.7.2 Transportmessungen an Oocyten

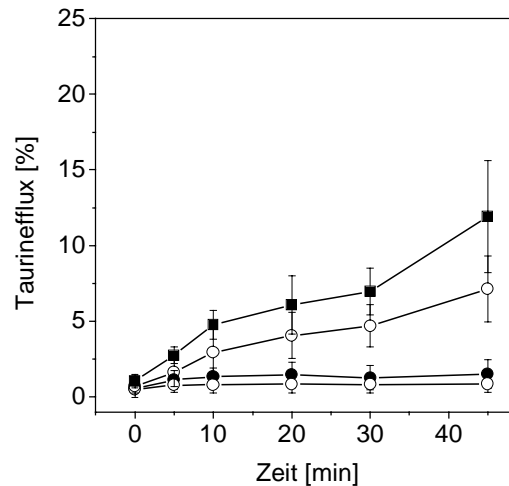
Für jeden Messpunkt wurde die Transportaktivität von 5 bis 7 Oocyten bestimmt. Als Kontrolle wurden 5 bis 7 Oocyten verwendet, denen Wasser injiziert wurde, oder die nicht injiziert wurden (s. 3.7.2.1). Für Aufnahmemessungen wurden die Oocyten mit einer Plastik-Pasteurpipette in ein 5 ml-Polypropylenröhrchen überführt und zweimal mit 4 ml eiskaltem

OR2<sup>+</sup> oder ND96 gewaschen. Der Waschpuffer wurde abgesaugt und durch 70 µl OR2<sup>+</sup> oder ND96 ersetzt, das radioaktives und nichtradioaktives Substrat in der gewünschten Konzentration enthielt. Für Messungen in Na<sup>+</sup>-freiem Puffer wurde NaCl durch Cholinchlorid ersetzt und andere Natriumsalze durch Kaliumsalze. Nach Stoppen des Transports durch dreimaliges Waschen mit 4 ml eiskaltem OR2<sup>+</sup> oder ND96 wurden die Oocyten einzeln in Szintillationsgefäße überführt. Dort wurden sie durch Zugabe von 200 µl 10 % SDS aufgelöst, bevor 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard) zugegeben wurde. Die aufgenommene Radioaktivität wurde danach im Szintillationszähler bestimmt.

Für Effluxmessungen wurden die Oocyten durch Injektion mit Substrat vorbeladen, ähnlich wie bereits von Hand et al. (1997) beschrieben. Zur Injektion wurden folgende Stammlösungen verwendet: Lactat: 100 mM Lactat und 3.7 kBq/µl [<sup>14</sup>C]Lactat in ND96 (pH 7.6); Taurin: 100 mM Taurin und 24 kBq/µl [<sup>3</sup>H]Taurin in 100 mM HEPES (pH 7.6); Inulin: 1.3 mM Inulin, 37 kBq/µl [<sup>3</sup>H]Inulin in 100 mM HEPES (pH 7.6). Chlorid: 115 mM Na<sup>36</sup>Cl (0.925 kBq/µl) in 100 mM HEPES (pH 7.6). Nach der Injektion wurden Gruppen von je 5 Oocyten in 5 ml-Polypropylenröhrchen überführt und dreimal mit ND96 gewaschen. Der Waschpuffer wurde abgesaugt und durch 200 µl bis 1 ml Transportpuffer ersetzt. Als isotone Transportpuffer dienen OR2<sup>+</sup> oder ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM HEPES, pH 7.4, 210 mOsmol/l), als hypotoner Transportpuffer wurde entweder der OR2<sup>+</sup>-Puffer durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O verdünnt oder ND48 verwendet (105 mOsmol/l, NaCl reduziert auf 48 mM). Im Fall der Chloridmessungen wurde das NaCl des Transportpuffers durch Natriumgluconat ersetzt. Pro Messpunkt wurden 70 bis 100 µl des Transportpuffers zur Radioaktivitätsbestimmung entnommen.

#### **3.7.2.1 Wahl der Kontroll-oocyten**

Um den Versuchsaufbau zu vereinfachen, wurde untersucht, ob außer wasser-injizierten Oocyten auch nicht-injizierte Oocyten eine korrekte Kontrolle darstellen. 4 Tage vor der Efflux-Messung wurden eine Gruppe der Oocyten mit 50 nl dH<sub>2</sub>O injiziert, während eine andere Gruppe nicht injiziert wurde. Bei einem Vergleich der Taurineffluxkinetiken zeigte sich, dass der Taurinefflux von wasser-injizierten Oocyten etwas höher lag als der nicht-injizierter Oocyten, dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant (Abb. 44). Aufgrund dieses Experimentes wurden in den nachfolgenden Experimenten nur uninjizierte Oocyten als Kontrollzellen verwendet.



**Abb. 44.** Vergleich des Taurineffluxes in Wasser-injizierten und in uninjizierten Oocyten. Die Oocyten wurden 4 Tage nach der Injektion der „wasser-injizierten“ Oocyten durch Injektion von 50 nl einer Stammlösung vorbeladen, die 100 mM Taurin und 24 kBq/ $\mu$ l [ $^3$ H]Taurin in HEPES-Puffer enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit OR2<sup>+</sup> wurden je 5 Oocyten in 1 ml OR2<sup>+</sup> (isoton) oder in 1 ml 1:2 mit Wasser verdünntem OR2<sup>+</sup> (hypoton) inkubiert und je 100  $\mu$ l dieses Transportpuffers zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Isoton ○, ●; hypoton □, ■; nicht-injiziert ○, □; wasser-injiziert, ● ■. (M  $\pm$  SD)

## 3.8 Immunologische und Proteinbiochemische Methoden

### 3.8.1 Immunanfärbung intrazellulärer Antigene in adhärennten Zellen

Die Zellen wurden in Kulturschalen angesät, auf deren Boden 1 bis 3 Deckgläschen mit autoklavierbarem Schliff fett befestigt waren. Nach 2 bis 3 Tagen wurde das Medium abgesaugt, sodann wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen 10 min lang in 3.5 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach Entfernen des Paraformaldehyds wurden die Zellen mit PBS gespült und 2 mal 10 min lang in PBS inkubiert. Danach folgten eine 5-minütige Inkubation in Glycin/PBS und eine 10-minütige Inkubation in 0.3 % Triton/PBS zur Permeabilisierung. Nach Absaugen des Puffers wurden auf die Mitte jedes Deckgläschens je 30 bis 50  $\mu$ l der Primär-Antikörperlösung (1:1000 in 0.1 % Triton/PBS, 10 % FCS) pipettiert und durch leichtes Schwenken der Kulturschale verteilt. Danach wurde die Schale mit Deckel 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper wurden die Zellen 2 mal 10 min mit 0.1 % Triton/PBS gewaschen. Nach Aufbringen des an einen Fluoreszenzfarbstoff (Alexa456) gekoppelten Sekundär-Antikörpers (1:2000 in 0.1 % Triton/PBS, 10 % FCS) wurden die Schalen mit Deckel bei Raumtemperatur für 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach folgten zwei 10-minütige

Waschschritte in 0.1 % Triton/PBS. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Deckgläschen umgedreht auf einen Tropfen Einbettungsflüssigkeit (Immunmount) gelegt, der auf einen Objektträger aufgebracht worden war, und ggf. bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Es wurden Filter von 550 nm für Alexa-behandelte Zellen und von 500 nm für EGFP-transfizierte Zellen verwendet.

#### **3.8.2 Anreicherung membranständiger Proteine**

Je Ansatz wurden ca. 3 Millionen Zellen verwendet. Diese wurden mit Trypsin/EDTA von den Kulturschalen gelöst, abzentrifugiert (1000 Upm), einmal mit DMEM/10 % FCS und dreimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen (pH 8.0). Anschließend wurden die Zellen 10 min lang bei Raumtemperatur in 0.5 ml PBS-Puffer mit 0.5 mg/ml EZ-Link<sup>™</sup> Sulfo-NHS-LC-Biotin (Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoat) inkubiert. Danach wurden die Zellen viermal mit 4 ml eiskaltem PBS-Puffer (pH 8.0) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 1 % Triton X-100, pH 7.6) 30 min unter gelegentlichem leichtem Schütteln lysiert. Die lysierten Zellen wurden 15 min lang bei 14000 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt und das Sediment verworfen. Nach Zugabe von 50 µl ImmunoPure<sup>®</sup> Immobilized Streptavidin wurden die Überstände unter leichtem Schütteln bei 4 °C 1-2 h lang inkubiert. Anschließend wurde 10 min lang bei 14.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als „cytosolische“ Fraktion aufbewahrt, während das Sediment, das aus den an die Streptavidin-Agarose gebundenen biotinylierten Membranproteinen bestand, mit denselben Zentrifugationsbedingungen viermal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen wurde. Sowohl das so gereinigte Sediment (Membranprotein-Fraktion“) als auch die „cytosolische Fraktion“ wurde 1:4 mit SDS-Probenpuffer (1.9 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 0.5 M Tris/HCl, 0.8 ml Glycerol, 1.6 ml 10 % (w/v) SDS, 0.4 ml Mercaptoethanol, 0.4 ml 1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8) versetzt und vor der Auftragung auf das Gel 5 min lang auf 56 °C erhitzt.

### 3.8.3 Natriumdodecylphosphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach Reinigung der beiden Glasplatten mit Wasser und Ethanol wurden diese in die dafür vorgesehenen Rahmen (Biorad) eingespannt. In jede Gelkammer wurden darauf ca. 3.5 ml der Trenngel-Lösung (7.2 ml 30 % Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid-Stammlösung, 2.5 ml 1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 10.2 ml H<sub>2</sub>O, 200 µl 10 % SDS, 40 µl TEMED, 76 µl APS) pipettiert und zur Glättung der Oberfläche umgehend mit Isopropanol beschichtet, welches nach Polymerisation des Gels mit Hilfe von Filterpapier wieder abgenommen wurde. Im zweiten Schritt wurde das Sammelgel (1.4 ml 30 % Acrylamid/ N,N-Methylenbisacrylamid-Stammlösung, 1.26 ml 0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 7.2 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl 10 % SDS, 10 µl TEMED, 400 µl 10 % APS) auf das Trenngel pipettiert. Danach wurden die Kämme eingeführt. Von den zuvor 5 min lang im SDS-Probenpuffer auf 56 °C erhitzten Proben wurden ca. 25-35 µl in die Geltaschen pipettiert und bei einer konstanten Spannung von max. 200 V im Gel aufgetrennt, bis der den Proben zugesetzte Farbmarker die untere Kante der Glasscheiben erreicht hatte. Die SDS-PAGE-Kammer besaß ein Volumen von ca. 300 ml Elektrophoresepuffer (5 x Elektrophoresepuffer: 15 g/l Tris/HCl, 72 g/l Glycin, 5 g/l SDS, pH 8.3).

### 3.8.4 Elektrotransfer der Proteine (Western Transfer)

An die SDS-PAGE anschließend wurde ein Elektrotransfer der Proteine bei konstanter Spannung (30-35 V) und bei 250 mA über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Proteine wurden hierbei aus dem Gel auf eine Immobilon-NC-Transfer Membran überführt. Die Kammer des „Tank-Blot“ (Biorad) wurde vollständig mit Transferpuffer (20 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8.3-8.5; um eine Erhöhung der Ionenkonzentration zu vermeiden, wurde der pH-Wert nicht eingestellt) aufgefüllt.

### 3.8.5 Detektion der Proteine mit Antikörpern

Nach dem Elektrotransfer wurden unspezifische Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran durch Inkubation des Western Transfers in PBS (pH 7.4)/ 0.05 % (w/v) Tween 20/ 5 %

### 3 Material und Methoden

---

Milchpulver 1-3 h lang abgeblockt. Die Bindung des ersten Antikörpers (Anti Flag<sup>®</sup> M2 monoklonaler Antikörper, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1:1000) wurde in PBS (pH 7.4)/ 0.15 % Tween 20/ 2.5 % Milchpulver 1-2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Darauf wurde die Membran 2 x 5 min lang mit PBS (pH = 7.4)/ 0.15 % Tween 20 gewaschen. Die Bindung des zweiten Antikörpers mit gekoppeltem Enzym (Ziege-Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase, Verdünnung 1:2000) erfolgte erneut in PBS (pH 7.4)/ 0.15 % Tween 20/ 2.5 % Milchpulver 1-2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Danach wurde erneut 2 x 5 min lang mit PBS (pH 7.4)/ 0.05 % Tween 20 gewaschen. Die Membran wurde noch 2 x mit einem alkalischen Puffer (100 mM Tris/ 100 mM NaCl/ pH 9.5) gewaschen und danach 5 min lang mit dem Tropix-Reagenz (PerSeptive Biosystems) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran in Klarsichtfolie verpackt, bevor ihr 30 s bis 3 min lang ein Röntgenfilm exponiert wurde. Der entwickelte Film diente zur Auswertung.



## 4 Literatur

Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger JD, Rotin D und Staub O (1999) Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 103:667-673.

Ackerman MJ, Wickman KD und Clapham DE (1994) Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103:153-179.

Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G und Canessa CM (1999) The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 274:37834-37839.

Asher C, Wald H, Rossier BC und Garty H (1996) Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits. *Am J Physiol* 271:C605-C611.

Bagnasco SM, Murphy HR, Bedford JJ und Burg MB (1988) Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. *Am J Physiol* 254:C788-C792.

Bairamian D, Johanson CE, Parmelee JT und Epstein MH (1991) Potassium cotransport with sodium and chloride in the choroid plexus. *J Neurochem* 56:1623-1629.

Ballatori N, Truong AT, Jackson PS, Strange K und Boyer JL (1995) ATP depletion and inactivation of an ATP-sensitive taurine channel by classic ion channel blockers. *Mol Pharmacol* 48:472-476.

Banderali U und Roy G (1992) Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am J Physiol* 263:C1200-C1207.

Baquet A, Hue L, Meijer AJ, van Woerkom GM und Plomp PJ (1990) Swelling of rat hepatocytes stimulates glycogen synthesis. *J Biol Chem* 265:955-959.

#### 4 Literatur

---

Bauernschmitt HG und Kinne RK (1993) Metabolism of the 'organic osmolyte' glycerophosphorylcholine in isolated rat inner medullary collecting duct cells. II. Regulation by extracellular osmolality. *Biochim Biophys Acta* 1150:25-34.

Beetsch JW und Olson JE (1996) Hyperosmotic exposure alters total taurine quantity and cellular transport in rat astrocyte cultures. *Biochim Biophys Acta* 1290:141-148.

Beetsch JW und Olson JE (1998) Taurine synthesis and cysteine metabolism in cultured rat astrocytes: effects of hyperosmotic exposure. *Am J Physiol* 274:C866-C874.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L und Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161:370-371.

Berdiev BK, Prat AG, Cantiello HF, Ausiello DA, Fuller CM, Jovov B, Benos DJ und Ismailov II (1996) Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *J Biol Chem* 271:17704-17710.

Bertani G (1952) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Echerichia coli*. *J Bacteriol* 62:293-300.

Biden TJ und Wollheim CB (1986)  $Ca^{2+}$  regulates the inositol tris/tetrakisphosphate pathway in intact and broken preparations of insulin-secreting RINm5F cells. *J Biol Chem* 261:11931-11934.

Borden LA, Smith KE, Hartig PR, Branchek TA und Weinshank RL (1992) Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *J Biol Chem* 267:21098-21104.

Borden LA, Smith KE, Vaysse PJ, Gustafson EL, Weinshank RL und Branchek TA (1995a) Re-evaluation of GABA transport in neuronal and glial cell cultures: correlation of pharmacology and mRNA localization. *Receptors Channels* 3:129-146.

Borden LA, Smith KE, Gustafson EL, Branchek TA und Weinshank RL (1995b) Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *J Neurochem* 64:977-984.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Brand A, Leibfritz D, Hamprecht B und Dringen R (1998) Metabolism of cysteine in astroglial cells: synthesis of hypotaurine and taurine. *J Neurochem* 71:827-832.

Brew H und Attwell D (1985) Is the potassium channel distribution in glial cells optimal for spatial buffering of potassium? *Biophys J* 48:843-847.

Buckingham L und Duncan JL (1983) Approximate dimensions of membrane lesions produced by streptolysin S and streptolysin O. *Biochim Biophys Acta* 729:115-122.

Burg MB (1994) Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells. *J Exp Zool* 268:171-175.

Burg MB (1995) Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 268:F983-F996.

Burg MB (1996) Coordinate regulation of organic osmolytes in renal cells. *Kidney Int* 49:1684-1685.

Buyse G, Voets T, Tytgat J, De Greef C, Droogmans G, Nilius B und Eggermont J (1997) Expression of human pICln and ClC-6 in *Xenopus* oocytes induces an identical endogenous chloride conductance. *J Biol Chem* 272:3615-3621.

Cammack JN und Schwartz EA (1996) Channel behavior in a gamma-aminobutyrate transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:723-727.

Cammack JN, Rakhilin SV und Schwartz EA (1994) A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. *Neuron* 13:949-960.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW und Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.

Chen CA und Okayama H (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6:632-638.

Chen L, Wang L und Jacob TJ (1999) Association of intrinsic pICln with volume-activated Cl<sup>-</sup> current and volume regulation in a native epithelial cell. *Am J Physiol* 276:C182-C192.

Chiang CM und Roeder RG (1993) Expression and purification of general transcription factors by FLAG epitope-tagging and peptide elution. *Pept Res* 6:62-64.

Chomczynski P und Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

Christensen O (1987) Mediation of cell volume regulation by Ca<sup>2+</sup> influx through stretch-activated channels. *Nature* 330:66-68.

Chu S und Zeitlin PL (1997) Alternative mRNA splice variants of the rat CIC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of CIC-2. *Nucleic Acids Res* 25:4153-4159.

Coca-Prados M, Sanchez-Torres J, Peterson-Yantorno K und Civan MM (1996) Association of CIC-3 channel with Cl<sup>-</sup> transport by human nonpigmented ciliary epithelial cells. *J Membr Biol* 150:197-208.

Cormack BP, Valdivia RH und Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.

Cornet M, Ubl J und Kolb HA (1993) Cytoskeleton and ion movements during volume regulation in cultured PC12 cells. *J Membr Biol* 133:161-170.

Cserr HF, DePasquale M und Patlak CS (1987) Regulation of brain water and electrolytes during acute hyperosmolality in rats. *Am J Physiol* 253:F522-F529.

Davis-Amaral EM, Musch MW und Goldstein L (1996) Chloride and taurine effluxes occur by different pathways in skate erythrocytes. *Am J Physiol* 271:R1544-R1549.

Davis-Amaral EM, Musch MW und Goldstein L (1997) Volume-activated osmolyte channel in skate erythrocytes: inhibition by pyridoxal derivatives. *J Exp Zool* 279:456-461.

Dermietzel R, Hwang TK, Buettner R, Hofer A, Dotzler E, Kremer M, Deutzmann R, Thinnies FP, Fishman GI, Spray DC und Siemen D (1994) Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:499-503.

Dietzel I, Heinemann U und Lux HD (1989) Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 2:25-44.

Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR und Horowitz B (1997) Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390:417-421.

Duan D, Cowley S, Horowitz B und Hume JR (1999) A serine residue in ClC-3 links phosphorylation-dephosphorylation to chloride channel regulation by cell volume. *J Gen Physiol* 113:57-70.

Emma F, McManus M und Strange K (1997) Intracellular electrolytes regulate the volume set point of the organic osmolyte/anion channel VSOAC. *Am J Physiol* 272:C1766-C1775.

Eveloff J und Warnock DG (1987) K-Cl transport systems in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 252:F883-F889.

Ferraris JD, Williams CK, Martin BM, Burg MB und Garcia-Perez A (1994) Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. Proc Natl Acad Sci USA 91:10742-10746.

Fievet B, Gabillat N, Borgese F und Motais R (1995) Expression of band 3 anion exchanger induces chloride current and taurine transport: structure-function analysis. EMBO J 14:5158-5169.

Fliegel L und Fröhlich O (1993) The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. Biochem J 296:273-285.

Furukawa T, Ogura T, Katayama Y und Hiraoka M (1998) Characteristics of rabbit CIC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. Am J Physiol 274:C500-C512.

Galiotta LJ, Romeo G und Zegarra-Moran O (1996) Volume regulatory taurine release in human tracheal 9HTEo- and multidrug resistant 9HTEo-/Dx cells. Am J Physiol 271:C728-C735.

Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM und Hebert SC (1993) Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. Proc Natl Acad Sci USA 90:2749-2753.

Garcia-Perez A und Burg MB (1991) Renal medullary organic osmolytes. Physiol Rev 71:1081-1115.

Gillen CM und Forbush B (1999) Functional interaction of the K-Cl cotransporter (KCC1) with the Na-K-Cl cotransporter in HEK-293 cells. Am J Physiol 276:C328-C336.

Gillen CM, Brill S, Payne JA und Forbush B (1996) Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. J Biol Chem 271:16237-16244.

Gonzalez E, Sanchez-Olea R und Pasantes-Morales H (1995) Inhibition by Cl<sup>-</sup> channel blockers of the volume-activated, diffusional mechanism of inositol transport in primary astrocytes in culture. *Neurochem Res* 20:895-900.

Graham FL, Smiley J, Russell WC und Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.

Grossman EB und Hebert SC (1989) Renal inner medullary choline dehydrogenase activity: characterization and modulation. *Am J Physiol* 256:F107-F112.

Gründer S, Thiemann A, Pusch M und Jentsch TJ (1992) Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360:759-762.

Guizouarn H und Motais R (1999) Swelling activation of transport pathways in erythrocytes: effects of Cl<sup>-</sup>, ionic strength, and volume changes. *Am J Physiol* 276:C210-C220.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR und Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233:177-182.

Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA und Hundal HS (1998) Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47:1006-1013.

Hall AC und Ellory JC (1986) Evidence for the presence of volume-sensitive KCl transport in 'young' human red cells. *Biochim Biophys Acta* 858:317-320.

Hamprecht B und Löffler F (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* 109:341-345.

Hand M, Morrison R und Strange K (1997) Characterization of volume-sensitive organic osmolyte efflux and anion current in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 157:9-16.

Handler JS und Kwon HM (1993) Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *Am J Physiol* 265:C1449-C1455.

Hansen AJ (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65:101-148.

Hazama A und Okada Y (1988)  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of volume-regulatory  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol (Lond)* 402:687-702.

Heilig CW, Stromski ME, Blumenfeld JD, Lee JP und Gullans SR (1989) Characterization of the major brain osmolytes that accumulate in salt-loaded rats. *Am J Physiol* 257:F1108-F1116.

Hill MM, Clark SF, Tucker DF, Birnbaum MJ, James DE und Macaulay SL (1999) A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol Cell Biol* 19:7771-7781.

Hoffmann EK (1986) Anion transport systems in the plasma membrane of vertebrate cells. *Biochim Biophys Acta* 864:1-31.

Hoffmann EK und Simonsen LO (1989) Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* 69:315-382.

Hoffmann EK, Simonsen LO und Lambert IH (1984) Volume-induced increase of  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  permeabilities in Ehrlich ascites tumor cells. Role of internal  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Membr Biol* 78:211-222.

Holtzman EJ, Kumar S, Faaland CA, Warner F, Logue PJ, Erickson SJ, Ricken G, Waldman J, Kumar S und Dunham PB (1998) Cloning, characterization, and gene organization of K-Cl cotransporter from pig and human kidney and *C. elegans*. *Am J Physiol* 275:F550-F564.

Hudson RL und Schultz SG (1988) Sodium-coupled glycine uptake by Ehrlich ascites tumor cells results in an increase in cell volume and plasma membrane channel activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:279-283.



Huxtable RJ (1989) Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol* 32:471-533.

Isaacks RE, Bender AS, Kim CY, Prieto NM und Norenberg MD (1994) Osmotic regulation of *myo*-inositol uptake in primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* 19:331-338.

Jackson PS und Strange K (1993) Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol* 265:C1489-C1500.

Jackson PS, Morrison R und Strange K (1994) The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. *Am J Physiol* 267:C1203-C1209.

Jackson PS, Churchwell K, Ballatori N, Boyer JL und Strange K (1996) Swelling-activated anion conductance in skate hepatocytes: regulation by cell  $\text{Cl}^-$  and ATP. *Am J Physiol* 270:C57-C66.

Janzer RC und Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-257.

Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A und Yamada H (1999) The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch* 437:783-795.

Jordt SE und Jentsch TJ (1997) Molecular dissection of gating in the  $\text{ClC-2}$  chloride channel. *EMBO J* 16:1582-1592.

Kaplan MR, Mount DB und Delpire E (1996) Molecular mechanisms of  $\text{NaCl}$  cotransport. *Annu Rev Physiol* 58:649-668.

Katsura T, Gustafson CE, Ausiello DA und Brown D (1997) Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 272:F817-F822.

Kavanaugh MP, Arriza JL, North RA und Amara SG (1992) Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 267:22007-22009.

Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Marumo F und Sasaki S (1994) Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* 12:597-604.

Keep RF, Xiang J und Betz AL (1994) Potassium cotransport at the rat choroid plexus. *Am J Physiol* 267:C1616-C1622.

Kimelberg HK und Frangakis MV (1985) Furosemide- and bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Res* 361:125-134.

Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S und Waniewski RA (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10:1583-1591.

Kimmel AR und Berger SL (1987) Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview. *Methods Enzymol* 152:307-316.

Kirk J und Kirk K (1994) Inhibition of volume-activated I- and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J Biol Chem* 269:29389-29394.

Kirk K, Ellory JC und Young JD (1992) Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J Biol Chem* 267:23475-23478.

Koyama Y, Ishibashi T, Tanaka K und Baba A (1994) L-glutamate-stimulated taurine release from rat cerebral cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 38:75-80.

Krapivinsky GB, Ackerman MJ, Gordon EA, Krapivinsky LD und Clapham DE (1994) Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell* 76:439-448.

Kuriyama K, Ida S und Ohkuma S (1984) Alteration of cerebral taurine biosynthesis in spontaneously hypertensive rats. *J Neurochem* 42:1600-1606.

Kwon HM und Handler JS (1995) Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr Opin Cell Biol* 7:465-471.

Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB und Handler JS (1992) Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* 267:6297-6301.

Kyte J und Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132.

Lambert IH und Hoffmann EK (1994) Cell swelling activates separate taurine and chloride channels in Ehrlich mouse ascites tumor cells. *J Membr Biol* 142:289-298.

Lansman JB, Hallam TJ und Rink TJ (1987) Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325:811-813.

Lester HA, Mager S, Quick MW und Corey JL (1994) Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:219-249.

Levitan I, Almonte C, Mollard P und Garber SS (1995) Modulation of a volume-regulated chloride current by F-actin. *J Membr Biol* 147:283-294.

Lien YH, Zhou HZ, Job C, Barry JA und Gillies RJ (1991) In vivo <sup>31</sup>P NMR study of early cellular responses to hyperosmotic shock in cultured glioma cells. *Am J Physiol* 260:C791-C804.

Liman ER, Tytgat J und Hess P (1992) Subunits stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861-871.

Liu QR, Mandiyan S, Nelson H und Nelson N (1992) A family of genes encoding neurotransmitter transporters. Proc Natl Acad Sci USA 89:6639-6643.

Lopez-Corcuera B, Liu QR, Mandiyan S, Nelson H und Nelson N (1992) Expression of a mouse brain cDNA encoding a novel gamma-aminobutyric acid transporter. J Biol Chem 267:17491-17493.

Lorenz C, Pusch M und Jentsch TJ (1996) Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. Proc Natl Acad Sci USA 93:13362-13366.

Lytle C und Forbush B (1992) Na-K-Cl cotransport in the shark rectal gland. II. Regulation in isolated tubules. Am J Physiol 262:C1009-C1017.

Lytle C, McManus TJ und Haas M (1998) A model of Na-K-2Cl cotransport based on ordered ion binding and glide symmetry. Am J Physiol 274:C299-C309.

Mager WH und Varela JC (1993) Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. Mol Microbiol 10:253-258.

Manolopoulos VG, Voets T, Declercq PE, Droogmans G und Nilius B (1997) Swelling-activated efflux of taurine and other organic osmolytes in endothelial cells. Am J Physiol 273:C214-C222.

Matskevitch I, Wagner CA, Stegen C, Bröer S, Noll B, Risler T, Kwon HM, Handler JS, Waldegger S, Busch AE und Lang F (1999) Functional characterization of the Betaine/gamma-aminobutyric acid transporter BGT-1 expressed in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem 274:16709-16716.

May A, Puoti A, Gaeggeler HP, Horisberger JD und Rossier BC (1997) Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel alpha subunit in A6 renal cells. J Am Soc Nephrol 8:1813-1822.

Melton JE und Nattie EE (1983) Brain and CSF water and ions during dilutional and isosmotic hyponatremia in the rat. *Am J Physiol* 244:R724-R732.

Minton AP, Colclasure GC und Parker JC (1992) Model for the role of macromolecular crowding in regulation of cellular volume. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10504-10506.

Moorman JR, Ackerman SJ, Kowdley GC, Griffin MP, Mounsey JP, Chen Z, Cala SE, O'Brian JJ, Szabo G und Jones LR (1995) Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature* 377:737-740.

Moran J, Sabanero M, Meza I und Pasantes-Morales H (1996) Changes of actin cytoskeleton during swelling and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *Am J Physiol* 271:C1901-C1907.

Moriyama T, Garcia-Perez A und Burg MB (1990) Factors affecting the ratio of different organic osmolytes in renal medullary cells. *Am J Physiol* 259:F847-F858.

Motais R, Guizouarn H und Garcia-Romeu F (1991) Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim Biophys Acta* 1075:169-180.

Motais R, Fievet B, Borgese F und Garcia-Romeu F (1997) Association of the band 3 protein with a volume-activated, anion and amino acid channel: a molecular approach. *J Exp Biol* 200:361-367.

Mountian I, Declercq PE und Van Driessche W (1996) Volume regulation in rat brain glial cells: lack of a substantial contribution of free amino acids. *Am J Physiol* 270:C1319-C1325.

Musch MW und Goldstein L (1996) High affinity binding of ankyrin induced by volume expansion in skate erythrocytes. *J Biol Chem* 271:21221-21225.

Musch MW, Luer CA, Davis-Amaral EM und Goldstein L (1997) Hypotonic stress induces translocation of the osmolyte channel protein pICln in embryonic skate (*Raja eglanteria*) heart. *J Exp Zool* 277:460-463.

Nakanishi T und Burg MB (1989a) Osmoregulation of glycerophosphorylcholine content of mammalian renal cells. *Am J Physiol* 257:C795-C801.

Nakanishi T und Burg MB (1989b) Osmoregulatory fluxes of *myo*-inositol and betaine in renal cells. *Am J Physiol* 257:C964-C970.

Nakanishi T, Balaban RS und Burg MB (1988) Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am J Physiol* 255:C181-C191.

Newman EA (1986) Regional specialization of the membrane of retinal glial cells and its importance to K<sup>+</sup> spatial buffering. *Ann N Y Acad Sci* 481:273-286.

Newman EA, Frambach DA und Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K<sup>+</sup> siphoning. *Science* 225:1174-1175.

Nicholson C (1980) Dynamics of the brain cell microenvironment. *Neurosci Res Program Bull* 18:175-322.

Nilius B, Prenen J und Droogmans G (1998) Modulation of volume-regulated anion channels by extra- and intracellular pH. *Pflügers Arch* 436:742-748.

O'Connor E und Kimelberg HK (1993) Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci* 13:2638-2650.

Olson JE und Goldfinger MD (1990) Amino acid content of rat cerebral astrocytes adapted to hyperosmotic medium in vitro. *J Neurosci Res* 27:241-246.

Orkand RK, Nicholls JG und Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.

Paredes A, McManus M, Kwon HM und Strange K (1992) Osmoregulation of Na<sup>+</sup>-inositol cotransporter activity and mRNA levels in brain glial cells. *Am J Physiol* 263:C1282-C1288.

Park JH und Saier MH, Jr. (1996) Phylogenetic, structural and functional characteristics of the Na-K-Cl cotransporter family. *J Membr Biol* 149:161-168.

Pasantes-Morales H und Schousboe A (1989) Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *Glia* 2:45-50.

Pasantes-Morales H, Moran J und Schousboe A (1990) Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3:427-432.

Pasantes-Morales H, Murray RA, Sanchez-Olea R und Moran J (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. *Am J Physiol* 266:C172-C178.

Paulmichl M, Li Y, Wickman K, Ackerman M, Peralta E und Clapham D (1992) New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356:238-241.

Paulson OB und Newman EA (1987) Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237:896-898.

Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D und Forbush B (1995) Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. *J Biol Chem* 270:17977-17985.

Payne JA, Stevenson TJ und Donaldson LF (1996) Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem* 271:16245-16252.

Peters H (1998) Untersuchungen zu Transport und Synthese organischer Osmolyte in kultivierten Astrogliazellen. Dissertation, Universität Tübingen.

Pfeuffer J, Bröer S, Bröer A, Lechte M, Flögel U und Leibfritz D (1998) Expression of aquaporins in *Xenopus laevis* oocytes and glial cells as detected by diffusion-weighted  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and photometric swelling assay. *Biochim Biophys Acta* 1448:27-36.

Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC und Delpire E (1997) Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 33:781-795.

Pusch M und Jentsch TJ (1994) Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol Rev* 74:813-827.

Rahman B (1999) Kinetische und molekulare Charakterisierung des astroglialen Monocarboxylattransporters. Dissertation, Universität Tübingen.

Rasola A, Galiotta LJ, Barone V, Romeo G und Bagnasco S (1995) Molecular cloning and functional characterization of a GABA/betaine transporter from human kidney. *FEBS Lett* 373:229-233.

Risso S, DeFelice LJ und Blakely RD (1996) Sodium-dependent GABA-induced currents in GAT1-transfected HeLa cells [comment]. *J Physiol (Lond)* 490:691-702.

Robertson MA und Foskett JK (1994)  $\text{Na}^+$  transport pathways in secretory acinar cells: membrane cross talk mediated by  $[\text{Cl}]_i$ . *Am J Physiol* 267:C146-C156.

Roy G (1995) Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells. *J Membr Biol* 147:35-44.



Ruhfus B und Kinne RK (1996) Hypotonicity-activated efflux of taurine and *myo*-inositol in rat inner medullary collecting duct cells: evidence for a major common pathway. *Kidney Blood Press Res* 19:317-324.

Ruhfus B, Tinel H und Kinne RK (1996) Role of G-proteins in the regulation of organic osmolyte efflux from isolated rat renal inner medullary collecting duct cells. *Pflügers Arch* 433:35-41.

Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY.

Sanchez-Olea R, Moran J, Schousboe A und Pasantes-Morales H (1991) Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett* 130:233-236.

Sanchez-Olea R, Moran J und Pasantes-Morales H (1992) Changes in taurine transport evoked by hyperosmolarity in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 32:86-92.

Sanchez-Olea R, Pena C, Moran J und Pasantes-Morales H (1993) Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl<sup>-</sup> transport in cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 156:141-144.

Sanchez-Olea R, Morales-Mulia M, Moran J und Pasantes-Morales H (1995) Inhibition by dihydropyridines of regulatory volume decrease and osmolyte fluxes in cultured astrocytes is unrelated to extracellular calcium. *Neurosci Lett* 193:165-168.

Saxena S, Quick MW, Tousson A, Oh Y und Warnock DG (1999) Interaction of syntaxins with the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 274:20812-20817.

Schousboe A, Sanchez Olea R, Moran J und Pasantes-Morales H (1991) Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J Neurosci Res* 30:661-665.

Schwartz RS, Rybicki AC und Nagel RL (1997) Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein pICln in human young red blood cells: association with actin. *Biochem J* 327:609-616.

Shennan DB, McNeillie SA und Curran DE (1994) The effect of a hyposmotic shock on amino acid efflux from lactating rat mammary tissue: stimulation of taurine and glycine efflux via a pathway distinct from anion exchange and volume-activated anion channels. *Exp Physiol* 79:797-808.

Shimbo K, Brassard DL, Lamb RA und Pinto LH (1995) Viral and cellular small integral membrane proteins can modify ion channels endogenous to *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 69:1819-1829.

Smardo FL, Jr., Burg MB und Garcia-Perez A (1992) Kidney aldose reductase gene transcription is osmotically regulated. *Am J Physiol* 262:C776-C782.

Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA und Weinshank RL (1992) Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 42:563-569.

Sonders MS und Amara SG (1996) Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol* 6:294-302.

Steenbergen C, Hill ML und Jennings RB (1985) Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* 57:864-875.

Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M, Vandewalle A und Jentsch TJ (1995) Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem* 270:31172-31177.

Stossel TP (1989) From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *J Biol Chem* 264:18261-18264.

Strange K (1993) Maintenance of cell volume in the central nervous system. *Pediatr Nephrol* 7:689-697.

Strange K und Jackson PS (1995) Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int* 48:994-1003.

Strange K, Morrison R, Heilig CW, DiPietro S und Gullans SR (1991) Upregulation of inositol transport mediates inositol accumulation in hyperosmolar brain cells. *Am J Physiol* 260:C784-C790.

Strange K, Emma F, Paredes A und Morrison R (1994) Osmoregulatory changes in *myo*-inositol content and Na<sup>+</sup>/*myo*-inositol cotransport in rat cortical astrocytes. *Glia* 12:35-43.

Stutzin A, Torres R, Oporto M, Pacheco P, Eguiguren AL, Cid LP und Sepulveda FV (1999) Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am J Physiol* 277:C392-C402.

Takenaka M, Preston AS, Kwon HM und Handler JS (1994) The tonicity-sensitive element that mediates increased transcription of the betaine transporter gene in response to hypertonic stress. *J Biol Chem* 269:29379-29381.

Tappaz M, Almarghini K, Legay F und Remy A (1992) Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinatase decarboxylase (CSD) from brain: the long and tricky trail to identification. *Neurochem Res* 17:849-859.

Thiemann A, Gründer S, Pusch M und Jentsch TJ (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356:57-60.

Thornhill WB und Laris PC (1984) KCl loss and cell shrinkage in the Ehrlich ascites tumor cell induced by hypotonic media, 2-deoxyglucose and propranolol. *Biochim Biophys Acta* 773:207-218.

Thurston JH, Hauhart RE und Nelson JS (1987) Adaptive decreases in amino acids (taurine in particular), creatine, and electrolytes prevent cerebral edema in chronically hyponatremic mice: rapid correction (experimental model of central pontine myelinolysis) causes dehydration and shrinkage of brain. *Metab Brain Dis* 2:223-241.

Trachtman H (1991) Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances: I. *Pediatr Nephrol* 5:743-750.

Uchida S, Green N, Coon H, Triche T, Mims S und Burg M (1987) High NaCl induces stable changes in phenotype and karyotype of renal cells in culture. *Am J Physiol* 253:C230-C242.

Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, Preston AS, Marumo F und Handler JS (1992) Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8230-8234.

Verbalis JG und Gullans SR (1991) Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res* 567:274-282.

Verrey F (1995) Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. *J Membr Biol* 144:93-110.

Walz W (1992) Role of Na/K/Cl cotransport in astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S260-262.

Weber K und Osborn M (1982) The cytoskeleton. *Natl Cancer Inst Monogr* 60:31-46.

Wiesinger H (1991) *myo*-inositol transport in mouse astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 56:1698-1704.

Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E, Jr. und Forbush B, 3rd (1994) Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2201-2205.

Yamauchi A, Kwon HM, Uchida S, Preston AS und Handler JS (1991) *Myo*-inositol and betaine transporters regulated by tonicity are basolateral in MDCK cells. *Am J Physiol* 261:F197-F202.

Yamauchi A, Uchida S, Kwon HM, Preston AS, Robey RB, Garcia-Perez A, Burg MB und Handler JS (1992) Cloning of a Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J Biol Chem* 267:649-652.

Yancey PH und Burg MB (1989) Distribution of major organic osmolytes in rabbit kidneys in diuresis and antidiuresis. *Am J Physiol* 257:F602-F607.

Yancey PH und Burg MB (1990) Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. *Am J Physiol* 258:R198-R204.

Yancey PH, Haner RG und Freudenberger TH (1990) Effects of an aldose reductase inhibitor on organic osmotic effectors in rat renal medulla. *Am J Physiol* 259:F733-F738.

Zablocki K, Miller SP, Garcia-Perez A und Burg MB (1991) Accumulation of glycerophosphorylcholine (GPC) by renal cells: osmotic regulation of GPC:choline phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7820-7824.

Ziyadeh FN, Feldman GM, Booz GW und Kleinzeller A (1988) Taurine and cell volume maintenance in the shark rectal gland: cellular fluxes and kinetics. *Biochim Biophys Acta* 943:43-52.

## 5 Zusammenfassung

Organische Osmolyte spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Volumenregulation. Die Aufnahmesysteme für die organischen Osmolyte Betain, Inositol und Taurin sind bereits bekannt und teilweise charakterisiert. Dagegen ist die molekulare Identität des Effluxweges organischer Osmolyte noch völlig unklar. Postuliert wurde ein auswärtsgerichteter Anionenkanal, der als „Volume-Sensitive Organic Osmolyte/Anion Channel“ (VSOAC) bezeichnet wird. Drei Kandidaten für den VSOAC - die Chloridkanäle CLC-2, CLC-3 und das  $I_{Cl_{in}}$ -Protein - wurden in vorliegender Arbeit im *Xenopus laevis*-Oocyten-Expressionsystem auf ihre Osmolytpermeabilität hin untersucht.

- Zur Expression in *Xenopus*-Oocyten wurden die entsprechenden cDNAs in geeignete Vektoren umklontiert. Die cDNAs von CLC-2 und  $I_{Cl_{in}}$  lagen bereits vor, während die cDNA des CLC-3 aus der mRNA astrogliareicher Primärkultur der Ratte mittels RT-PCR kloniert wurde.
- Die Untersuchung der Chloridpermeabilität mittels cRNA-exprimierender Oocyten ergab, dass nur die Expression von CLC-2-cRNA zu einer schwellungsaktivierten Erhöhung des  $^{36}Cl$ -Transports und des Chloridstroms führte. In CLC-3- und/oder  $I_{Cl_{in}}$ -cRNA-exprimierenden Oocyten hingegen konnte unter diesen Bedingungen kein erhöhter  $^{36}Cl$ -Transport oder Chloridstrom detektiert werden.
- Zur Überprüfung der Membranlokalisierung des Kanals CLC-3 wurde ein N-terminales Fusionsprotein des CLC-3 mit einem aus 9 Aminosäuren bestehenden sogenannten Flag-Epitop in den Oocyten exprimiert, das mithilfe eines anti-Flag-Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass der Kanal ab dem zweiten Expressionstag in der Plasmamembran lokalisiert war.
- Die Untersuchung des Taurineffluxes aus cRNA-exprimierenden Oocyten ergab, dass in CLC-2-, CLC-3- und/oder  $I_{Cl_{in}}$ -exprimierenden Oocyten eine höhere schwellungsinduzierte Taurinpermeabilität bestand als in Kontroll-oocyten. Als weitere negative Kontrolle wurde ein Membranprotein, das nicht am Osmolyttransport beteiligt ist, der Monocarboxylattransporter 1 (MCT1), in Oocyten exprimiert. Auch in MCT1-exprimierenden Oocyten zeigte sich erhöhte schwellungsinduzierte Taurinpermeabilität. Es konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Leckflux handelte. Wahrscheinlich führt die Expression der vier getesteten Membranproteine zu einer Hochregulation eines endogenen Taurineffluxweges in *Xenopus laevis*-Oocyten.

- Die Unabhängigkeit des Taurineffluxes von einer Chloridpermeabilität spricht für die Existenz eines spezifischen endogenen Taurineffluxkanals in *Xenopus laevis*-Oocyten.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung des VSOACs ist die Expressionsklonierung mittels Expression von mRNA in *Xenopus*-Oocyten. Astroglia-Kulturen zeigen einen raschen schwellungsaktivierten Osmolytefflux, daher erschien dieser Zelltyp zur Isolierung der VSOAC-mRNA gut geeignet.

- Der Vergleich von astrogliareichen Primärkulturen und C6-Rattengliomzellen ergab, dass beide Zelltypen ähnliche Taurinefflux-Charakteristika aufwiesen. Wegen der leichteren Handhabbarkeit der Zelllinie wurde die benötigte Gesamt-mRNA aus C6-Rattengliomzellen isoliert.
- Die mRNA-exprimierenden Oocyten zeigten unter hypotonen Bedingungen zwar erhöhte Taurinpermeabilität, Einzelzellmessungen ergaben aber eine zu hohe Streuung der Messwerte. Diese Streuung beruhte auf einer höheren Instabilität der mRNA-exprimierenden Oocyten unter hypotonen Bedingungen, die höchstwahrscheinlich auf die Expression von Wasserkanälen (Aquaporinen) zurückzuführen ist, deren mRNA in der mRNA-Präparation enthalten war.
- Daher erwies sich das *Xenopus*-Oocyten-Expressionssystem als ungeeignet für eine Expressionklonierung unter hypotonen Bedingungen.

Der Transporter zur Aufnahme des Osmolyten Betain, der Betain/GABA-Transporter BGT-1, war bereits kloniert worden, aber noch nicht gut untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der BGT-1 mithilfe des *Xenopus*-Oocyten-Expressionssystems durch elektrophysiologische Messungen und radioaktive Fluxmessungen charakterisiert.

- Wesentlich für die Substraterkennung durch BGT-1 ist eine Aminogruppe. Auch methylierte Amine werden erkannt, wenn auch mit geringerer Affinität. Eine zusätzliche negative Ladung wird zwar vorgezogen, ist aber nicht essentiell.
- Die als Inhibitoren des BGT-1 bekannten Substanzen Chinidin,  $\beta$ -Alanin und 2,4-Diaminobutyrat sind auch Substrate des Transporters BGT-1.
- Der GABA-Transport durch BGT-1 ist strikt abhängig von  $\text{Na}^+$ , aber nur partiell von  $\text{Cl}^-$ . Der Vergleich elektrophysiologischer Daten mit Fluxdaten von GABA,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  ergab eine Kopplung des Transports von GABA mit dem von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in einer Stöchiometrie von 1 : 3 : 1. Für den gekoppelten Transport von Betain

mit  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  deuteten die Ergebnisse eher auf eine Kopplung mit dem Transport von 3  $\text{Na}^+$  und 2  $\text{Cl}^-$  hin.

- Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Modell für die Bindungsreihenfolge der Substrate vorgeschlagen: Ein Substratmolekül - GABA bzw. Betain - bindet vor  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ . Aufgrund der partiellen Unabhängigkeit des Transports von  $\text{Cl}^-$  kann man annehmen, dass zunächst drei  $\text{Na}^+$ -Ionen binden. Als letztes binden ein bzw. zwei Clorid-Ionen, woraufhin die Translokation erfolgt.



## Lebenslauf

Name: Carola Stegen  
Geburtsdatum: 6. Mai 1970  
Geburtsort: Hamburg

1976 - 1980      Grundschule Am Hagen, Ahrensburg  
1980 - 1989      Gymnasium Stormarn-Schule, Ahrensburg  
5/1989            Abitur

9/1989 - 8/1990    Aupair-Aufenthalt in Plymouth, England

WS1990 - WS1996   Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
3/1993            Vordiplom Biologie  
9/1994 - 6/1995    Austauschstudium als Fulbright-Stipendiatin an der State University of  
New York at Albany, USA  
1/1996            mündliche Diplomprüfungen an der Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg. Hauptfach: Biochemie  
Nebenfächer: Tierphysiologie und Virologie/Immunologie

2/1996-11/1996    Anfertigung der Diplomarbeit „Einfluß von rekombinantem  
Interleukin 10 auf die Expression von matrixabbauenden Proteasen und  
die Invasion von humanen Gliomzellen“ unter Anleitung von Herrn  
Priv. Doz. J.-C. Tonn, Universität Würzburg

3/1996 - 1/1997    Wissenschaftliche Hilfskraft im Tumorbioologischen Labor der  
Neurochirurgischen Klinik, Universität Würzburg

2/1997 - 4/1997    Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Stuttgart

6/1997 -5/2000    Anfertigung der Doktorarbeit „Expression und Charakterisierung  
volumenregulierter Osmolyt-Transportmoleküle des Gehirns“ unter  
Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Stefan Bröer am Physiologisch-  
Chemischen Institut in Kooperation mit dem Physiologischen Institut  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meine Akademischen Lehrer waren:

Priv. Doz. Dr. S. Bröer

Prof. Dr. F.-C. Czygan

Priv. Doz. Dr. R. Dringen

Prof. Dr. H.-J. Gross

Prof. Dr. B. Hamprecht

Prof. Dr. U. Heber

Prof. Dr. B. Hölldobler

Prof. Dr. G. Krohne

Dr. J. Ludwig

Prof. Dr. P. Masters

Prof. Dr. U. Scheer

Prof. Dr. A. Schimpl

Prof. Dr. S. Siddell

Priv. Doz. Dr. J.-C. Tonn

Prof. Dr. H. Wiesinger