

Institut für Neurophysiologie

- **Direktor: Prof. Dr. Christoph Fahlke** (bis 31.08.2012)
- **Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Bernhard Brenner** (ab 01.09.2012)

Tel.: 0511/532-6396 • E-Mail: Brenner.Bernhard@MH-Hannover.de • www.mh-hannover.de/neurophysiologie.html

Forschungsprofil

Der Forschungsschwerpunkt des Instituts für Neurophysiologie liegt in der Untersuchung physiologischer Prozesse an erregbaren Zellen, den Nerven- und Muskelzellen. Wir erforschen auf zellulärer und molekularer Ebene die Mechanismen der Transport- und Signalvorgängen an biologischen Membranen und konzentrieren uns dabei auf ausgewählte Proteinfamilien der Membrantransportergruppe (Anionenkanäle und Transporter der CLC und SLC Familien sowie EAAT Glutamattransporter), aber auch auf Serotoninrezeptorproteine der 5HT Familie. Die Forschung umfasst sowohl die Beschreibung der molekularen Pathomechanismen hereditärer Erkrankungen, die durch genetisch bedingte Veränderungen in diesen Membranproteinen verursacht werden, als auch die in vitro Charakterisierung von potenziell pharmakologisch wirksamen Substanzen, die gezielt die Funktion dieser Transporter und Rezeptoren beeinflussen. Die Kernkompetenzen des Instituts umfassen eine Vielzahl zellbiologischer, molekularbiologischer, proteinbiochemischer und elektrophysiologischer Methoden, aber auch die Anwendung bildgebender Verfahren, kombiniert mit einer quantitativen digitalen Bildbearbeitung und der Anwendung rechnergestützter Proteinstrukturberechnungen.

Forschungsprojekte

Chloridkanalfehlfunktionen durch krankheitsverursachende Mutationen

Eine der wichtigsten Eigenschaften biologischer Membranen ist die Fähigkeit, selektiv bestimmte Ionen und Moleküle passieren zu lassen, während andere Substanzen zurückgehalten werden. Diese Funktion wird von spezialisierten Membranproteinen, sogenannten Transportern oder Kanälen, übernommen. Proteine der CLC-Familie sind auf den Transport von negativ geladenen Anionen (z.B. Chloridionen) spezialisiert. Die Proteinfamilie beinhaltet eine Reihe von Isoformen, von denen die CLC-1 Kanäle in Muskelzellen exprimiert sind und unter Ruhebedingungen die elektrische Membranspannung stabilisieren. Die physiologische Bedeutung des Ionenkanals wird deutlich, wenn durch Mutationen im kodierenden CLCN1 Gen genetisch veränderte CLC-Proteine bestimmte Muskelerkrankungen (Myotonien) verursachen. Das Hauptsymptom der Myotonie ist eine erhöhte Muskelsteifigkeit, die insbesondere nach einer kraftvollen Kontraktion mit einer verzögerten Relaxation des Muskels einhergeht. Aber auch ein einfaches Beklopfen myotoner Muskeln kann bereits Kontraktionen auslösen, wodurch eine erhöhte Erregbarkeit der Muskelfasern gezeigt ist. Über 100 Mutationen im CLCN1 Gen sind bislang bekannt, die mit dieser Erkrankung einhergehen.

Wir identifizierten in 5 Myotonie-Patienten zwei bisher unbekannte Punktmutationen im CLCN1 Gen und untersuchten die krankheitsverursachenden Mechanismen der Veränderungen. Die Mutationen, C277R und C277Y, ersetzen ein konserviertes und zentral im CLC-Protein liegendes Cystein durch Arginin bzw. Tyrosin (Abb. 1).

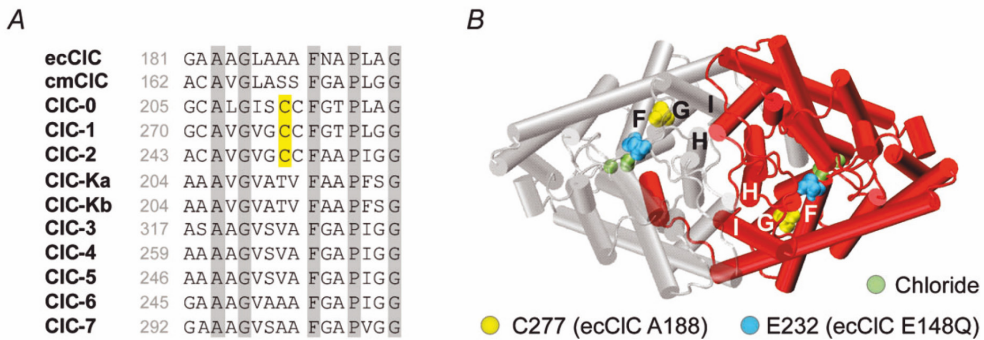


Abb. 1: Position der Aminosäure C277. A, Vergleich der Aminosäuresequenzen unterschiedlicher CIC Isoformen. Cystein 277 ist konserviert in den klassischen CIC Kanälen CIC-0, CIC-1 und CIC-2 aber nicht in den anderen CIC Isoformen. B, 3D Darstellung des bakteriellen CIC Transporters ecCIC (verändert nach Dutzler et al. 2002) von oben. Die zwei Untereinheiten des Dimers sind in rot und grau dargestellt. Die Position des Cysteins C277 (homolog zu Alanin A188 in ecCIC) ist gelb markiert. Die Chloridionen, gebunden an den drei Bindungsstellen im Protein, sind grün dargestellt. Das extrazelluläre Gate E232 ist in blau hervorgehoben.

Die funktionelle Bedeutung der Aminosäuresubstitution wurde mit Hilfe des Patch-Clamp-Verfahrens nach heterologer Expression von Wildtyp-Kanälen (WT) oder mutierten CIC-Kanälen in kultivierten HEK293T Zellen untersucht. Zellen mit mutierten CIC-1 Kanälen generieren nur bei starker Überexpression Stromamplituden, die denen von WT CIC-1 exprimierenden Zellen vergleichbar sind. Während WT-Kanäle bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen zunächst einen großen Strom zeigen, dem eine schnelle Deaktivierung folgt, reagieren Zellen mit mutierten C277R und C277Y-Kanälen auf den gleichen Spannungssprung mit einem inversen Schaltverhalten (Abb. 2).

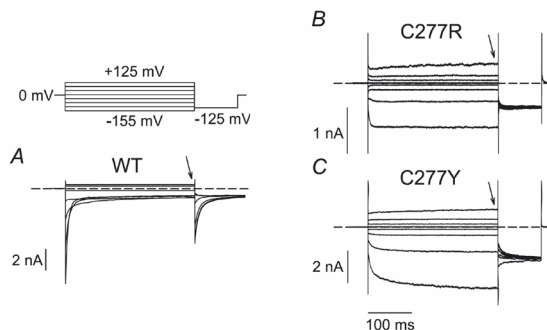


Abb.2:

Um die Ursache für die verringerte Stromamplitude der mutierten CIC-1 Kanäle zu bestimmen, haben wir eine Rauschanalyse durchgeführt. In einer solchen Analyse werden auf der Basis von Stromvarianzen, das so genannte Rauschen, die Einzelkanalamplitude und die Offenwahrscheinlichkeit bestimmt. Mit Hilfe der Rauschanalyse konnten wir zusätzlich zeigen, dass die maximale Offenwahrscheinlichkeit des mutierten C277Y Kanals sehr stark, um etwa 97% im Vergleich zum Wildtyp, reduziert ist (Abb. 3).

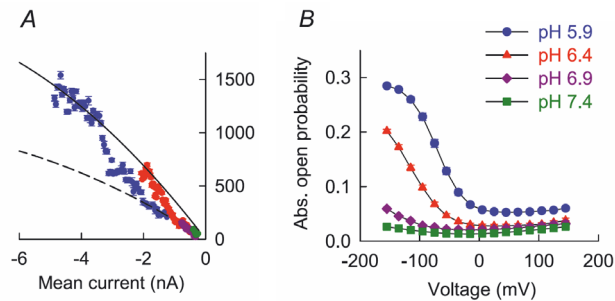


Abb. 3: Geringe maximale Offenwahrscheinlichkeit des mutierten C277Y hClC-1 Kanals. A, Stromvarianz für C277Y, aufgetragen gegen die gemittelte Stromamplitude. Die Steigung der angepassten Kurven am Achsenursprung ist proportional zur Einzelkanalamplitude. B, Spannungsabhängigkeit der absoluten Offenwahrscheinlichkeit von C277Y hClC-1, bestimmt in Lösungen mit unterschiedlichen pH Werten.

Die Mutationen beeinflussen aber nicht nur das Schaltverhalten des Ionenkanals sondern auch seine Leitfähigkeit. Dies konnte durch eine direkte Messung der Stromamplitude von einzelnen Ionenkanälen gezeigt werden (Abb. 4). Die Einzelkanalamplitude des mutierten C277Y ClC-1 Kanals ist im Vergleich zum WT Kanal um etwa 30% reduziert. Eine Änderung der Poreneigenschaften zeigt sich außerdem in einer geänderten Ionenselektivität der mutierten Kanäle. Während WT ClC-1 Kanäle bevorzugt Chloridionen leiten, permeieren durch die mutierten C277Y ClC-1 Kanäle Iodid- und Nitrationen besonders gut.

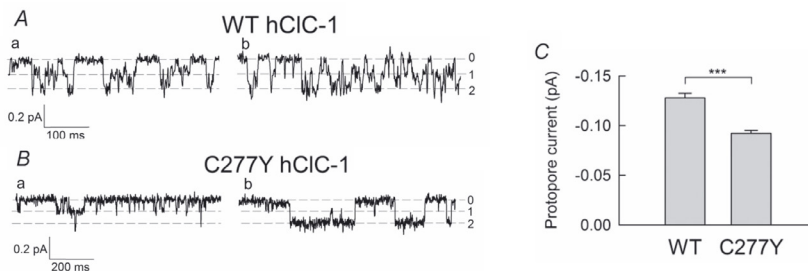


Abb. 4: Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit. A, B, Repräsentative Einzelkanalströme des Wildtyps und der mutierten ClC-1 Proteine. C, Vergleich der Einzelkanalamplituden des Wildtyps und der mutierten ClC-1 Proteine (***) t-Test mit $p < 0.0001$.

Unsere Untersuchungen zeigen ein gravierend verändertes Schaltverhalten und deutlich modifizierte Poreneigenschaften der mutierten Ionenkanäle, die die Chloridleitfähigkeit in erkrankten Muskelzellen dramatisch reduzieren und die Pathophysiologie der Erkrankung vollständig erklären. Zusätzlich tragen diese Untersuchungen wesentlich zum besseren Verständnis der Funktionsweise des skelettmuskulären ClC-1 Kanals bei.

■ Projektleitung: Fahlke, Christoph (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Hopital Pitie-Salpetriere, Assistance Publique Hopitaux de Paris, Paris, France; Division of Neurophysiology, Universität Ulm, Ulm, Germany; Förderung: MHH, Muscular Dystrophy Association (ausgelaufen), DFG

Weitere Forschungsprojekte

Funktion neuronaler Glutamat-Transporter

■ Projektleitung: Fahlke, Christoph (Prof. Dr.); Förderung: DFG

Molekulare Mechanismen von ClC Anionenkanälen und -Transportern

■ Projektleitung: Fahlke, Christoph (Prof. Dr.); Förderung: DFG

Funktion von multifunktionellen SLC26 Anionentransportern

■ Projektleitung: Fahlke, Christoph (Prof. Dr.)

Molekulare Mechanismen der Regulation von spannungsabhängigen Kalziumkanälen durch zytoplasmatische akzessorische Untereinheiten

■ Projektleitung: Hidalgo, Patricia (PD Dr. Universidad de Chile); Kooperationspartner: CNV Valparaiso, Chile; Förderung: DFG

Role of serotonergic signaling in regulation of neuroimmune interactions within the gastrointestinal tract under physiological and pathological conditions

■ Projektleitung: Ponimaskin, Evgeni (Prof. Dr.); Förderung: DFG

Advanced methodical approaches to analyse pre- and post-synaptic mechanisms regulating synapse formation and plasticity

■ Projektleitung: Ponimaskin, Evgeni (Prof. Dr.); Förderung: DFG

Palmitoylierung viraler Fusionsproteine als Target für neue antivirale Strategien

■ Projektleitung: Ponimaskin, Evgeni (Prof. Dr.); Förderung: DFG

Homo- und Heterooligomerisierung von Serotoninrezeptoren: strukturelle Voraussetzungen und funktionelle Bedeutung

■ Projektleitung: Ponimaskin, Evgeni (Prof. Dr.); Förderung: DFG

Dynamic regulation of small Rho GTPases via serotonin receptors in neurons: Effects on the cytoskeleton, neuronal morphology and functions

■ Projektleitung: Ponimaskin, Evgeni (Prof. Dr.); Förderung: DFG

Molekulare Funktion und zelluläre Aufgaben von ClC Anionenaustauschern

■ Projektleitung: Alekov, Alexi (Jun. Prof. Dr.)

Fehlfunktionen des Chlorid/Protonen-Transporters ClC-5 durch krankheitsverursachende Mutationen

■ Projektleitung: Alekov, Alexi (Jun. Prof. Dr.)

Originalpublikationen

Gorinski N, Kowalsman N, Renner U, Wirth A, Reinartz MT, Seifert R, Zeug A, Ponimaskin E, Niv MY. Computational and experimental analysis of the transmembrane domain 4/5 dimerization interface of the serotonin 5-HT(1A) receptor. *Mol Pharmacol*; 2012;82(3):448-463

Grieschat M, Alekov AK. Glutamate 268 regulates transport probability of the anion/proton exchanger ClC-5. *J Biol Chem*; 2012;287(11):8101-8109

Hotzy J, Machtens JP, Fahlke C. Neutralizing aspartate 83 modifies substrate translocation of excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) glutamate transporters. *J Biol Chem*; 2012;287(24):20016-20026

Kobe F, Guseva D, Jensen TP, Wirth A, Renner U, Hess D, Müller M, Medrihan L, Zhang W, Zhang M, Braun K, Westerholz S, Herzog A, Radyushkin K, El-Kordi A, Ehrenreich H, Richter DW, Rusakov DA, Ponimaskin E. 5-HT7R/G12 signaling regulates neuronal mor-

phology and function in an age-dependent manner. *J Neurosci*; 2012;32(9):2915-2930

Miranda-Laferte E, Schmidt S, Jara AC, Neely A, Hidalgo P. A short polybasic segment between the two conserved domains of the beta2a-subunit modulates the rate of inactivation of R-type calcium channel. *J Biol Chem*; 2012;287(39):32588-32597

Renner U, Zeug A, Woehler A, Niebert M, Dityatev A, Dityateva G, Gorinski N, Guseva D, Abdel-Galil D, Frohlich M, Doring F, Wischmeyer E, Richter DW, Neher E, Ponimaskin EG. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT7 differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci*; 2012;125(Pt 10):2486-2499

Ursu SF, Alekov A, Mao NH, Jurkat-Rott K. CIC1 chloride channel in myotonic dystrophy type 2 and CIC1 splicing in vitro. *Acta Myol*; 2012;31(2):144-153

Vossfeldt H, Butzlaff M, Prussing K, Ni Charthaigh RA, Karsten P, Lankes A, Hamm S, Simons M, Adryan B, Schulz JB, Voigt A. Large-scale screen for modifiers of ataxin-3-derived polyglutamine-induced toxicity in *Drosophila*. *PLoS One*; 2012;7(11):e47452

Weinberger S, Wojciechowski D, Sternberg D, Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K, Becher T, Begemann B, Fahlke C, Fischer M. Disease-causing mutations C277R and C277Y modify gating of human CIC-1 chloride channels in myotonia congenita. *J Physiol*; 2012;590(Pt 15):3449-3464

Winter N, Kovermann P, Fahlke C. A point mutation associated with episodic ataxia 6 increases glutamate transporter anion currents. *Brain*; 2012;135(Pt 11):3416-3425

Zeug A, Woehler A, Neher E, Ponimaskin EG. Quantitative Intensity-Based FRET Approaches-A Comparative Snapshot. *Biophys J*; 2012;103(9):1821-1827

Abstracts

2012 wurden 9 Abstracts publiziert.

Promotionen

Hotzy, Linda Sabrina Jasmin (Dr. rer. nat.): Fluorometric approaches to analyze the structure-function relationship of excitatory amino acid transporters (EAATs).

Orhan, Gökce (Dr. med.): Anionen- und Protonen- abhängiges Schaltverhalten des spannungsabhängigen CIC-4 Cl⁻-Antiporters.

Schänzler, Michael (Dr. rer. nat.): Anionentransport durch das Motorprotein Prestin.

Bachelor

Yu, Lan (B.Sc.): Elektrophysiologische Untersuchungen an dem humanen CIC-5 transporter zur Aufklärung der Mechanismen der Nierenerkrankung Morbus Dent.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Fahlke, Christoph: Associate Editor *Frontiers in Membrane Physiology and Biophysics*.

Alekov Alexei: Editorial Board Member *Frontiers in Membrane Physiology and Biophysics*.