

Aus dem Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
und dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)
Abteilung Physiologie und Pathologie des Ionentransports
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas J. Jentsch

Habilitationsschrift

Anionentransport in lysosomaler Physiologie und zellulärer Volumenregulation

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach **Zelluläre Biochemie**

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Tobias Stauber
geboren in Menden

Eingereicht: November 2015
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Veit Flockerzi, Homburg
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Biel, München

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
1. Einleitung	5
1.1 Die Bedeutung des Anionentransports für der Zellbiologie	5
1.2 Chloridtransport in der lysosomalen Physiologie	6
1.2.1 Chloridtransport als Spannungsausgleich für die organelläre Ansäuerung	6
1.2.2 Die intrazellulären Mitglieder der CLC-Familie	7
1.2.3 ClC-7/Ostm1 – ein Chloridtransporter für Lysosomen und Knochenabbau	8
1.3 Anionentransport in der zellulären Volumenregulation	9
1.3.1 Der volumenregulierte Anionenkanal VRAC	9
1.3.2 Physiologische Funktionen von VRAC	11
1.3.3 Die unbekannte molekulare Identität von VRAC	13
1.4 Fragestellung	13
2. Eigene Arbeiten	15
2.1 Subzelluläre Lokalisation intrazellulärer Chloridtransporter	15
2.2 Biophysikalische Charakterisierung des lysosomalen Cl ⁻ /H ⁺ -Austauschers ClC-7/Ostm1	28
2.3 Physiologische Bedeutung von ClC-7 und seiner besonderen biophysikalischen Eigenschaften	42
2.3.1 Zellautonome Rolle von ClC-7 für den lysosomalen Proteinabbau	42
2.3.2 Die Kopplung lysosomalen Cl ⁻ -Transports mit H ⁺ -Gegentransport ist wichtig für die Physiologie von Lysosomen und Knochenabbau	57
2.3.3 Die langsame Steuerungskinetik von ClC-7/Ostm1	61
2.4 Identifikation und erste Charakterisierung von LRRC8-Heteromeren als essenzielle Komponente des volumenregulierten Anionenkanals	72
3. Diskussion	78
3.1 Chloridtransporter im endosomal-lysosomalen System	78
3.1.1 Chlorid-Transportproteine endosomal-lysosomaler Kompartimente	78
3.1.2 Pathophysiologie dysfunktionalen lysosomalen Anionentransports	79
3.2 Mechanistische Funktion von lysosomalem Chloridtransport	80
3.2.1 Keine Notwendigkeit von Chloridtransport für die lysosomale Ansäuerung	80
3.2.2 Die Relevanz des lysosomalen Cl ⁻ /H ⁺ -Austausches	82
3.3 Die langsame Steuerungskinetik von ClC-7/Ostm1: Biophysik und physiologische Rolle	84
3.4 LRRC8-Heteromere: eine neue Klasse von Anionentransportern	86
3.5 Ausblick	88
4. Zusammenfassung	89
5. Literaturangaben	90
5.1 Eigene Veröffentlichungen	90
5.2 Zitierte Literatur	91
Danksagung	100
Erklärung	101

Abkürzungen

AP	Adapter-Proteinkomplex
ATP	Adenosintriphosphat
AVD	<i>apoptotic volume decrease</i> (apoptotische Volumenabnahme)
BBC	<i>Belgian blue cattle</i> (Weißblauer Belgier)
CALHM	<i>calcium homeostasis modulator</i>
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
CLC	eine Gen- bzw. Protein-Familie von Cl ⁻ -Kanälen und -Transportern
EEA	<i>excitatory amino acid</i> (exzitatorische Aminosäure)
ER	endoplasmatisches Retikulum
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> (γ -Aminobuttersäure)
GGA	<i>Golgi-localized, γ-ear containing, Arf-binding</i>
GluR	Glutamat-Rezeptor
I _{Cl,swell}	schwellungsinduzierter Chloridstrom
LAMP1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LRO	<i>lysosome-related organelle</i>
LRRC	<i>leucin-rich repeat-containing</i>
MDR1	<i>multidrug resistance 1</i>
NCL	<i>neuronal ceroid lipofuscinosis</i> (neuronaler Zeroidlipofuszinose)
Ostm1	<i>osteopetrosis-associated transmembrane protein 1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RVD	<i>regulatory volume decrease</i> (regulative Volumenabnahme)
S1P	Sphingosin-1-Phosphatase
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TEVC	<i>two-electrode voltage clamp</i> (Zwei-Elektroden-Spannungsklemme)
TMEM16	<i>transmembrane protein of unknown function 16</i>
V-ATPase	vakuoläre ATPase
VRAC	<i>volume-regulated anion channel</i> (volumenregulierter Anionenkanal)
VSOAC	<i>volume-sensitive organic osmolyte/anion channel</i>
VSOR	<i>volume-sensitive outwardly rectifying channel</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung des Anionentransports für der Zellbiologie

Der Transport von Anionen über zelluläre Membranen ist von elementarer Bedeutung für eine Vielzahl fundamentaler zellbiologischer Aufgaben. Da Chlorid das am häufigsten vorkommende Anion im Organismus ist, handelt es sich hierbei meist um Chloridtransport, auch wenn die entsprechenden Anionenkanäle und -transporter nicht unbedingt selektiv für Chlorid gegenüber anderen Anionen sind [1, 2]. Seit den ersten molekularen Identifizierungen von Chlorid-Transportproteinen und der Entdeckung der Verbindung von diesen mit humanen Krankheiten vor ca. 25 Jahren [3-7] hat der zelluläre Anionentransport große Aufmerksamkeit in der Zellbiologie erhalten. Zur wachsenden Liste von Chloridkanälen und -transportern gehören der *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR), die Mitglieder der CLC-Familie, einige Neurotransmitter-Rezeptoren, Bestrophine und Mitglieder der TMEM16/Anoctamin-Familie [1, 2]. Andere zelluläre Chlorid-Leitfähigkeiten sind elektrophysiologisch beschrieben, aber das zugrunde liegende Protein ist noch nicht identifiziert worden.

Chloridtransport über die Plasmamembran ist entscheidend in die Regulation der zellulären Ionenhomöostase, des pH und des Volumens involviert. An der pH-Regulation sind neben Natrium-Protonen-Austauschern Anionenaustauscher und weitere Chloridleitfähigkeiten beteiligt, bei der Volumenregulation der volumenregulierte Anionenkanal (*volume-regulated anion channel*, VRAC), der mit ein Fokus der vorliegenden Arbeit ist. Die polarisierte Lokalisation von Chloridkanälen und -transportern, darunter Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter und die Chloridkanäle ClC-K1 und -2 und CFTR, spielt eine wichtige Rolle für den transepithelilalen Transport von Salzen und Flüssigkeit. Darüber hinaus regulieren Chloridkanäle die Erregbarkeit von Zellen, wie der spannungsgesteuerte ClC-1 in Muskelzellen oder ligandengesteuerte GABA-Rezeptoren in Neuronen. Neben diesen wichtigen Anionentransportprozessen an der Zelloberfläche müssen Anionen auch über die Membranen intrazellulärer Organellen transportiert werden. Zum einen müssen Metabolite wie Sulfate und Phosphate in die oder aus den entsprechenden Kompartimenten transportiert werden. Zum anderen – und dies ist ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit – ist auch der Transport von Chlorid für die physiologische Funktion von und den intrazellulären Transport von und zwischen Organellen von wesentlicher Bedeutung, wobei die Rolle des Chloridtransports zum Beispiel der elektrischen Neutralisierung der Ansäuerung oder der organellären Volumenregulation dienen kann [8].

Die physiologische Bedeutung des Chloridtransports wird auch durch die zahlreichen Krankheiten deutlich, denen Dysfunktion verschiedener Chloridtransporter zugrunde liegen [9]. Die wohl bekannteste Chloridkanalkrankheit ist Mukoviszidose, die durch Mutationen des Chloridkanals CFTR verursacht wird. Weitere Beispiele umfassen Myotonie, Leukodystrophie und Bartter-Syndrom mit Diabetes insipidus und Taubheit aufgrund von Mutationen in den Plasmamembran-Chloridkanälen ClC-1, ClC-2 oder ClC-K1/ClC-K2 und deren β -Untereinheit Barttin [10]. Die Dent'sche Krankheit, die mit Proteinurie und oft mit der Bildung von Nierensteinen einhergeht, und Osteopetrose können durch Mutationen der intrazellulären

Chloridtransporter CIC-5 beziehungsweise CIC-7 oder seiner β -Untereinheit Ostm1 (*osteopetrosis-associated transmembrane protein 1*) verursacht werden [10].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Anionentransportprozessen, zum einen dem durch CIC-7 vermittelten Chloridtransport, der eine wichtige Rolle für die Funktion von Lysosomen spielt, und zum anderen dem Anionentransport durch den volumenregulierten Anionenkanal (VRAC), der an der regulativen Volumenabnahme der Zelle beteiligt ist.

1.2 Chloridtransport in der lysosomalen Physiologie

1.2.1 Chloridtransport als Spannungsausgleich für die organelläre Ansäuerung

In eukaryotischen Zellen existieren unterschiedliche Organellen, subzelluläre Kompartimente, in denen bestimmte biochemische Prozesse stattfinden. Eine Vielzahl von Iontentransportproteinen stellt sicher, dass sich die luminalen Konzentrationen der verschiedenen Ionen der unterschiedlichen Organellen so einstellen, dass sie den jeweiligen biochemischen und biophysikalischen Bedürfnissen genügen. Die größte Aufmerksamkeit in der Forschung erhielt hierbei das Proton (H^+). Die Kompartimente des endosomal-lysosomalen Weges, in dem durch Endozytose aufgenommene Bestandteile der Zellumgebung oder durch Autophagie eingeschleuste intrazelluläre Substanzen sortiert und schließlich im Lysosom abgebaut und zur Wiederverwertung ins Zytosol freigegeben werden, werden kontinuierlich angesäuert, so dass sie schließlich einen pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0 in den Lysosomen erreichen [11]. Dieser saure pH-Wert ist wichtig für luminal Enzymaktivitäten, für die Regulierung von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen und für Protein-Sortierung [11, 12]. Er regelt auch den Membran-Verkehr zwischen Endosomen und Lysosomen [13, 14] durch seine Auswirkungen auf die intraluminal Vesikelabschnürung [15] und auf die Rekrutierung von Komponenten der Transport-Maschinerie [16-19]. Außerdem treibt der pH-Gradient sekundären Transport von Metaboliten und anderen Ionen (wie z.B. Calcium) gegen deren elektrochemischen Gradienten. Die Ansäuerung der Organellen wird durch das Wirken der vakuolären ATPase (V-ATPase), eines multimeren Enzymkomplexes, der die aus ATP-Hydrolyse gewonnene Energie nutzt um Protonen ins Innere der Organellen zu pumpen, erreicht [12]. Da die Lumina der Endosomen und Lysosomen eine erhebliche Pufferkapazität für Protonen aufweisen, müssen 30–60 mM (abhängig von der Organelle und dem vorliegenden pH-Wert) H^+ in das Lumen gepumpt werden, um den pH-Wert um eine Einheit zu verringern [20]. Die Elektrogenität des Transports positiv geladener Protonen erfordert einen parallelen elektrischen Ausgleichstrom (Ausstrom von positiver Ladung und/oder Einstrom negativer Ladung), um den schnellen Aufbau eines innen-positiven Potentials, das das weitere Pumpen durch die V-ATPase zum Erliegen bringen würde, zu verhindern [8, 21, 22].

Viele Studien deuteten darauf hin, dass der parallele Gegenstrom zur Ansäuerung im endosomal-lysosomalen Weg vorwiegend durch Einstrom von Chlorid getragen wird [8]. Dazu passen die Beobachtungen der Änderung der luminalen Chlorid-Konzentration ($[Cl^-]$) entlang

des Endozytosewegs [23]. Unmittelbar nach der Endozytose fällt die luminaire Chlorid-Konzentration von den extrazellulären ca. 140 mM auf ca. 20 mM ab – möglicherweise aufgrund einer Anhäufung von negativen Ladungen in den sich formenden Vesikeln. Anschließend steigt die luminaire Chlorid-Konzentration wieder, um in späten Endosomen ca. 60 mM zu erreichen [23]. Genaue Messungen der lysosomalen Chlorid-Konzentration gibt es aufgrund des Fehlens geeigneter Chloridsensoren für die hohe Chlorid-Konzentration bei niedrigem pH nicht. Neben der Kompensation für den Ladungstransport der Protonen pumpenden V-ATPase durch Chlorid-Einstrom wurden der luminalen Chlorid-Konzentration an sich nur wenige direkte Rollen zugeordnet [8, 24]. Diese umfassen (potenziell wichtig in Bezug auf die allgemeine Ionenhomöostase) die Regulierung eines endosomalen Calcium-Kanals [25]. Es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von luminalem Chlorid auch für die durch die V-ATPase vermittelte Ansäuerung erforderlich ist [16], aber die erforderliche Konzentration scheint unterhalb der physiologischen Werte zu liegen.

1.2.2 Die intrazellulären Mitglieder der CLC-Familie

Einige Proteine wurden in Betracht gezogen, die die Chlorid-Leitfähigkeit im endosomal-lysosomalen Weg bereitstellen könnten [8, 26]. Der *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR) ist eines davon. Auswirkungen der pharmakologischen Hemmung des CFTR oder krankheitserzeugender Mutationen auf die Ansäuerung oder den stationären pH von Lysosomen und anderen Organellen sind für unterschiedliche Zelltypen beschrieben worden [27-29]. Allerdings stehen die Ergebnisse einiger Studien (beispielsweise [30-33]) mit technisch verbesserten Methoden für pH-Messungen (diskutiert in [34]) im Widerspruch zu einer Rolle des CFTR für die Bereitstellung des elektrischen Gegenstroms für die organelläre Ansäuerung. Stattdessen ist nun allgemein akzeptiert, dass die intrazellulären Mitglieder der CLC-Familie von Chlorid-Kanälen und -Transportern [10] den Chlorid-Transport in Endosomen und Lysosomen vermitteln. ClC-3 bis -7 lokalisieren auf verschiedenen Kompartimenten entlang des gesamten endosomalen/lysosomalen Weges [10, 35]. ClC-5 wird am stärksten in der Niere exprimiert, wo es auf apikalen frühen Endosomen der Zellen des proximalen Tubulus (PT) lokalisiert [36, 37]. ClC-6 lokalisiert auf späten Endosomen von Neuronen [38], und die ubiquitär exprimierten ClC-3 und ClC-7 lokalisieren überwiegend auf späten Endosomen bzw. Lysosomen [39, 40]. Ihre Dysfunktion durch Mutation bei menschlichen Patienten oder durch Knock-out in gentechnologisch veränderten Mäusen führt zu Mängeln in der endosomalen/lysosomalen Funktion. So führt das Fehlen von ClC-5 zu einer drastischen Abnahme der apikalen Endozytose in renalen proximalen Tubuli [41], und dadurch zu den Symptomen der Dent'schen Krankheit bei Mäusen und menschlichen Patienten [42, 43]. Der Verlust von ClC-7 oder seiner β -Untereinheit, Ostm1, führen zu Osteopetrose und zur Ansammlung lysosomalen Speichermaterials mit Neurodegeneration [40, 44, 45]. Im Einklang mit der Idee, dass diese Effekte einer Beeinträchtigung der luminalen Ansäuerung aufgrund mangelnder Ladungskompensation geschuldet sind, wurde für ClC-3 und -5 in der Tat gezeigt, dass sie für eine effiziente endosomale Ansäuerung *in vitro* (isolierte Endosomen) und in kultivierten Zellen erforderlich sind [42, 46, 47]. Allerdings scheint ClC-7/Ostm1, das die

wichtigste lysosomale Chlorid-Leitfähigkeit darstellt [40, 48], für die Erzeugung des sauren lysosomalen pH nicht nötig zu sein: für verschiedene Zellarten, wie Fibroblasten und hippocampale Neuronen, die von ClC-7- bzw. Ostm1-defizienten Mäusen gewonnen wurden, wurde ein normal saurer lysosomaler pH nachgewiesen [30, 44, 45]. Die Entbehrlichkeit von Chloridtransport als Ladungsausgleich für die Ansäuerung von Lysosomen, die im Vergleich zu Endosomen eine größere Leitfähigkeit für Kationen aufweisen [20], kann dadurch erklärt werden, dass die Ansäuerung dieser Organellen auch durch den Efflux einwertiger Kationen unterstützt werden kann [30].

Interessanterweise umfasst die Familie der CLCs nicht nur Chlorid-Kanäle, sondern auch Chlorid-Protonen-Austauscher (Cl⁻/H⁺-Austauscher). Dies wurde zuerst für den prokaryotischen EcClC-1 nachgewiesen [49], und kurze Zeit später für die endosomalen ClC-4 und ClC-5 [50, 51], wobei das Austauschverhältnis bei ca. einem Proton gegen zwei Chlorid-Ionen liegt. Das Vorhandensein eines konservierten Glutamats, des sogenannten *proton glutamate* in den nachgewiesenen Austauschern, nicht aber in den Kanälen innerhalb der CLC-Familie, deutet darauf hin, dass es sich bei allen intrazellulären CLCs um Cl⁻/H⁺-Austauscher handelt. In biophysikalischen Untersuchungen von isolierten Lysosomen wurde gezeigt, dass auch diese Organellen eine Cl⁻/H⁺-Austausch-Aktivität besitzen, der wahrscheinlich ClC-7 zugrunde liegt [48]. Der Austausch von Chlorid gegen Protonen erscheint kontraintuitiv, allerdings ist der hoch elektrogene 2Cl⁻/1H⁺-Austausch immer noch voll geeignet, den Ladungsausgleich für die Protonen-Translokation durch die V-ATPase zu liefern. Aber es ist zusätzliche Energie erforderlich, um mehr Protonen (1 von 3 Ionen verlassen die Organelle wieder) zu transportieren. Dies deutet auf eine Rolle des Austauschprozesses hin, die über die schlichte elektrische Kompensation der Ladung hinausgeht [8]. Eine Idee ist, dass unmittelbar nachdem sich endozytotische Vesikel aus der Plasmamembran lösen, die hohe extrazelluläre Chlorid-Konzentration gegen Protonen ausgetauscht werden könnte [51]. Vor kurzem wurde berichtet, dass dieser von der H⁺-ATPase unabhängige Ansäuerungsmechanismus zur Ansäuerung von frühen Endosomen beiträgt [52]. Allerdings passt dies nicht zu der Beobachtung, dass [Cl⁻] in neu gebildeten Endosomen aufgrund des Donnan-Potenzials gering ist [23]. Darüber hinaus würde dieser Mechanismus eine Ladungskompensation erfordern, aber die Notwendigkeit des Chlorid-Transports für die durch die H⁺-ATPase vermittelte Ansäuerung früher Endosomen [42, 53] spricht gegen das Vorhandensein einer anderen elektrischen Ausgleichsmöglichkeit.

1.2.3 ClC-7/Ostm1 – ein Chloridtransporter für Lysosomen und Knochenabbau

ClC-7 stellt die primäre, wenn nicht einzige Chlorid-Leitfähigkeit von Lysosomen [8, 38, 44, 48]. Dieses Mitglied der CLC-Familie lokalisiert zusammen mit seiner β -Untereinheit ubiquitär auf späten Endosomen und Lysosomen und zusätzlich im Bürstensaum von Osteoklasten [40, 44, 45]. Dieser spezialisierte Abschnitt der Plasmamembran, der an die Resorptionslakuna, einen abgedichteten Raum zwischen dem Osteoklasten und dem Knochen, angrenzt, wird durch verstärkte lysosomale Exozytose aufgebaut. Dadurch wird die Resorptionslakune mit lysosomalen Enzymen zum Abbau des organischen Knochenmaterials und der Bürstensaum

mit der V-ATPase zur Ansäuerung der Resorptionslakuna angereichert [54]. Die aktive Ansäuerung der Resorptionslakune durch die V-ATPase, die sowohl für den Abbau des anorganischen Knochenmaterials als auch für die Aktivität der sezernierten katabolischen Enzyme vonnöten ist, erfordert einen elektrischen Spannungsausgleich, der durch Chloridtransport durch CIC-7 bereitgestellt werden könnte. Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Ansäuerung der Resorptionslakune bei Osteoklasten von CIC-7-defizienten (*Clcn7^{-/-}*) Mäusen gestört ist [40]. Darüber hinaus ist der Bürstensaum in diesen Osteoklasten unterentwickelt, was möglicherweise auf einen Defekt der lysosomalen Exozytose zurückgeführt werden kann. Dementsprechend ist der Abbau von Knochenmaterial durch CIC-7-defiziente Osteoklasten beeinträchtigt, und *Clcn7^{-/-}*-Mäuse entwickeln eine starke Osteopetrose [40]. Inzwischen sind über 50 Mutationen im CIC-7 kodierenden Gen *CLCN7* identifiziert worden, die beim Menschen eine schwere, rezessiv vererbte oder eine mildere, dominant vererbte Osteopetrose verursachen [40, 55-58]. Neben ihrer schweren Osteopetrose entwickeln CIC-7-defiziente Mäuse eine Form der neuronalen Zeroidlipofuszinose (*neuronal ceroid lipofuscinosis*, NCL), einer lysosomalen Speicherkrankheit, die mit dem Verlust von Neuronen und einer von der Osteopetrose unabhängigen Retinadegeneration einhergeht [44]. Da, wie oben beschrieben, diese lysosomale Pathologie wohl nicht durch einen Defekt in der Ansäuerung dieses Kompartiments bedingt wird, ist der zugrunde liegende Pathomechanismus unklar. Weiterhin weisen *Clcn7^{-/-}*-Mäuse eine Pigmentierungs-Störung auf. Im genetischen *agouti*-Hintergrund, in dem Mäuse braunes Fell besitzen, ist die Fellfarbe der CIC-7-defizienten Mäuse grau. Die phänotypische Ähnlichkeit zwischen der *Clcn7^{-/-}*-Maus und der *grey-lethal*-Maus, einer spontanen Mausmutante mit schwerer rezessiver Osteopetrose und grauem Fell [59], führte zur Entdeckung von *Ostm1*, dessen kodierendes Gen in der *grey-lethal* Maus mutiert ist [60], als β -Untereinheit von CIC-7 [45]. CIC-7 und *Ostm1* kolokalisieren subzellulär und lassen sich co-immunpräzipitieren. *Ostm1* benötigt CIC-7 für den Export aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Im Gewebe der *Clcn7^{-/-}*-Maus lässt sich die proteolytisch prozessierte, lysosomale Form von *Ostm1* nicht nachweisen und die Proteinmenge von *Ostm1* ist stark reduziert. Ebenso ist die Menge von CIC-7 in der *Ostm1*-defizienten *grey-lethal*-Maus stark reduziert, vermutlich weil CIC-7 ohne Schutz durch das stark glykosylierte *Ostm1* im Lysosom instabil ist.

1.3 Anionentransport in der zellulären Volumenregulation

1.3.1 Der volumenregulierte Anionenkanal VRAC

Die meisten zellulären Membranen sind selektiv für Wasser durchlässig. Daher wird ein Osmolaritätsgradient über die semipermeable Plasmamembran Wassertransport in die oder aus der Zelle bedingen, was zu osmotischem Schwellen bzw. Schrumpfen der Zelle führt. Die intrazelluläre Tonizität kann sich während physiologischer Prozesse, wie transepitheliale Transport oder der Akkumulation von Metaboliten ändern. Da die Osmolarität der

extrazellulären Flüssigkeit im Körper üblicherweise konstant gehalten wird, begegnen unter normalen physiologischen Bedingungen nur die Zellen einiger Epithelien und Blutzellen in Kapillaren bestimmter Organe extrazellulärer Hypo- oder Hyperosmolarität. Allerdings können verschiedene pathophysiologische Zustände, wie z.B. bei Ischämie nach einem Schlaganfall und bei systemischen Störungen des Ionen- und pH-Haushalts, zum Anschwellen oder Schrumpfen von Zellen führen. Die Fähigkeit von Zellen, ihr Volumen zu regulieren, ist nicht nur wichtig, Volumenstörungen unter solchen osmotischen Beeinflussungen entgegenzuwirken, sondern sie spielt auch eine entscheidende Rolle für unterschiedliche physiologische Prozesse wie Zellwachstum, -proliferation und -migration und programmiertem Zelltod [61-63].

Als Antwort auf ein osmotisches Anschwellen durchlaufen Zellen durch den Ausstrom von Kalium- und Chlorid-Ionen und organischen Osmolyten, gefolgt von Wasser, eine regulatorische Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*, RVD). Mehrere volumensensitive Kaliumkanäle sind für verschiedene Zelltypen beschrieben worden [64]. Da fast alle Zelltypen eine deutlich größere basale Leitfähigkeit für Kalium- als für Chlorid-Ionen aufweisen, muss der durch Schwellung verursachten Volumenabnahme durch RVD eine Zunahme der Chlorid-Leitfähigkeit zugrunde liegen [61, 65]. Eine solche Erhöhung der Anionen-Permeabilität wurde erstmals vor mehr als 30 Jahren beschrieben [66, 67] und einige Jahre später elektrophysiologisch nachgewiesen [68, 69]. Der Kanal, der diesen charakteristischen schwellungsinduzierten Chloridstrom ($I_{Cl,swell}$) vermittelt, wird meist als volumenregulierter Anionenkanal (*volume-regulated anion channel*, VRAC) bezeichnet. Er scheint in Vertebraten ubiquitär exprimiert zu werden, ohne große Variationen in der Stromdichte zwischen unterschiedlichen Zelltypen aufzuweisen [63, 65, 70-72]. Wie weiter unten beschrieben wird, blieben viele Versuche erfolglos, die Gene bzw. Proteine zu identifizieren, die VRAC zugrunde liegen.

VRAC besitzt im Grundzustand nahezu keine basale Aktivität und wird nach osmotischer Schwellung durch einen unbekanntem Aktivierungsmechanismus, der nicht direkt durch mechanische Belastung ausgelöst wird, geöffnet [65, 73-75]. Zusätzlich kann VRAC auch unter isotonischen Bedingungen, z.B. während der Apoptose, durch purinerge Signalübertragung oder durch Sphingosin-1-Phosphat, aktiviert werden [74, 76]. Der durch VRAC vermittelte $I_{Cl,swell}$ weist einige charakteristische Merkmale auf [65, 72-74]. Dazu gehört eine milde Auswärts-Gleichrichtung, wegen der der Kanal auch als *volume-sensitive outwardly rectifying channel* (VSOR) bezeichnet wird. $I_{Cl,swell}$ weist bei zellinnerem positiven Membranpotenzial eine Inaktivierung mit je nach Zelltyp variabler Kinetik auf. Die Permeabilitäts-Sequenz des VRAC beinhaltet $I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > F^-$. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass VRAC als *volume-sensitive organic osmolyte/anion channel* (VSOAC) organische Osmolyte, wie die Aminosulfonsäure Taurin, leiten kann [77, 78]. Allerdings ist die Frage, ob Osmolyte (wie Taurin und Myoinositol), exzitatorische Aminosäuren (wie Glutamat und Aspartat) und purinerge Signalstoffe (wie Adenosintriphosphat, ATP) durch VRAC oder über andere Wege freigesetzt werden, umstritten [63, 79, 80]. Dies konnte nicht geklärt werden, weil die molekulare Identität des VRAC unbekannt war.

1.3.2 Physiologische Funktionen von VRAC

Die offensichtlichste Funktion des VRAC ist, einer osmotischen Zellschwellung entgegenzuwirken. Es wird vermutet, dass VRAC im zentralen Nervensystem (ZNS) eine zentrale Rolle bei der zellulären Volumenregulation der verschiedenen Zelltypen, die osmotischen Herausforderungen bei neuronaler Aktivität oder während pathologischer Zustände begegnen, einnimmt [74]. Epithelzellen können Änderungen sowohl der extra- als auch der intrazellulären Osmolarität unter physiologischen Bedingungen erfahren. Die Sekretion und Absorption gelöster Stoffe beeinflussen die relative Verteilung von Osmolyten. Insbesondere im absorptiven Epithelium wird die VRAC-Aktivität mit der zellulären Volumenhomöostase und somit dem Erhalt der epithelialen Integrität in Verbindung gebracht [81]. Außerdem wurde diskutiert, dass VRAC transepithelialen Transport unterstützt, z.B. durch die Bereitstellung der elektrischen Triebkraft für den zellulären Aufnahmeprozess [82]. Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass VRAC-Aktivität durch Depolarisation von pankreatischen β -Zellen an der Insulinsekretion nach Glukose-Stimulus beteiligt ist [83], und kürzlich wurde eine zusätzliche Rolle des VRAC in der β -adrenergen induzierten Speichelsekretion vorgeschlagen [84].

Zellproliferation und -migration sind weitere grundlegende zellphysiologische Prozesse, die die Regulierung des Zellvolumens erfordern. Proliferation wird allgemein durch eine Zunahme des Zellvolumens begleitet, die durch die Enthemmung von Natrium-Protonen-Austausch und Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransport hervorgerufen wird, bevor das Zellvolumen wieder durch die transiente Aktivierung von Chlorid-Kanälen, für die VRAC ein guter Kandidat ist, vermindert wird [85]. Unterschiede der maximalen VRAC Ströme wurden in Abhängigkeit von den verschiedenen Phasen des Zellzyklus gemessen [86-88]. Dass VRAC-Inhibitoren (von geringer Affinität) die Proliferationsrate verschiedener Zellen beeinträchtigt [86, 89-92], deutet darauf hin, dass VRAC in der Zellzyklusprogression beteiligt ist. Lokale Änderungen des Zellvolumens, die durch die differentielle Aktivität von Ionenkanälen und -transportern zustande kommen, könnten zur Zellmigration beitragen [93].

Mit dem programmierten Zelltod geht häufig eine Verringerung des Zellvolumens, die apoptotische Volumenabnahme (*apoptotic volume decrease*, AVD), einher [94]. Genau wie RVD wird AVD durch die Freisetzung von einwertigen Kationen, Chlorid und organischen Osmolyten erreicht und es wird angenommen, dass VRAC an diesem Prozess beteiligt ist [94]. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass VRAC auch unabhängig von einem Anschwellen der Zellen durch Induktoren von Apoptose geöffnet werden kann, sowohl von solchen wie Staurosporin, die durch Mitochondrien vermittelte, als auch durch solche wie Fas-Ligand, die über den sogenannten Todesrezeptor vermittelte Apoptose auslösen [95, 96]. Die pharmakologische Hemmung des VRAC vermindert durch Staurosporin, durch das Antikrebsmittel Cisplatin oder durch Butyrat induzierte Apoptose [97-100]. In verschiedenen Cisplatin-resistenten Krebszelllinien korreliert die Verminderung der apoptotischen Aktivität nach Cisplatin-Behandlung mit einem reduzierten Maximalstrom des VRAC [98, 101, 102], mit einer reduzierten Freisetzung von Taurin nach Cisplatin-Behandlung und mit einer

Beeinträchtigung der Volumenregulation nach osmotischer Schwellung [103]. Diese Ergebnisse wurden größtenteils auf die Rolle von VRAC in AVD zurückgeführt.

Neben physiologischen Prozessen können pathologische Zustände eine zelluläre Volumenregulation erfordern. So können beispielsweise ischämische Ereignisse in Herz und Gehirn zu einer Erhöhung des Zellvolumens führen [73]. Eine Zellschwellung kann dabei durch eine begleitende Laktazidose initiiert werden. In Neuronen kann Zellschwellung zusätzlich durch die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren (GluR) und GABA_A-Rezeptoren verursacht werden, wahrscheinlich aufgrund der durch Hypoxie induzierten Verminderung der Aktivität der Natrium/Kalium-ATPase. Die folgende sogenannte exzitotoxische Kaskade, die neurotoxische übermäßige Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren (*excitatory amino acids*, EAAs) wie Glutamat, ist noch unklar und verschiedene Mechanismen können beteiligt sein. Einerseits könnte die durch GluR vermittelte Depolarisation einen Chlorid-Einstrom durch schwellaktivierten VRAC antreiben, was die Zellschwellung weiter vorantreiben und schließlich zur Nekrose führen würde. Nach dem Auswaschen von Glutamat repolarisieren die Zellen, und VRAC trägt zum RVD bei [73]. Andererseits könnten geschwollene Gliazellen Glutamat über aktivierten VRAC ausschütten. Dies würde den RVD dieser Zellen unterstützen, aber es würde zu einer exzitotoxischen Schädigung benachbarter Zellen beitragen [104]. Es gibt Hinweise, dass Astrozyten und Mikroglia nach hypotoner Stimulation EAAs durch VRAC freisetzen [105-108]. Dies kann auch durch vermehrte reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygene species*, ROS) nach Behandlung mit Bradykinin, das nach einer Hirnverletzung im extrazellulären Raum gefunden wird, oder Zymosan [108, 109], oder durch purinerge ATP-Signale [110] potenziert oder hervorgerufen werden. Außerdem ist gezeigt worden, dass die Aktivierung weiterer Plasmamembran-Rezeptoren, wie von spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die VRAC-Aktivität und den Efflux von Osmolyten reguliert [111]. Die durch Agonisten stimulierte Freisetzung von Glutamat kann auch physiologisch an interzellulärer Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen beteiligt sein [112]. Unabhängig von dem Mechanismus (durch den übermäßigen Abfluss von EAAs oder durch einen Beitrag zur nekrotischen Volumenzunahme), mit dem VRAC zur Exzitotoxizität beiträgt, scheint seine Aktivität nach einem ischämischen Vorfall schädlichen zu sein. Passend wurde gezeigt, dass unterschiedliche (zugegebenermaßen eher unspezifische) VRAC-Inhibitoren ischämische Hirnschäden in murinen Modellen verringern [113-116].

Es wurde weiterhin vorgeschlagen, dass VRAC auch die nicht-vesikuläre Freisetzung von ATP vermittelt. Für Endothelzellen aus der Aorta wurde berichtet, dass ATP nach osmotischer Schwellung mit einem Zeitverlauf ähnlich der I_{Cl,swell}-Aktivierung freigesetzt wird [117]. Anschließend wurde gezeigt, dass diese ATP-Freisetzung durch VRAC-Inhibitoren blockiert werden konnte [118]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit pharmakologischen Versuchen gibt Hinweise darauf, dass zusätzlich zur hypotonen Behandlung Sphingosin-1-Phosphatase (S1P) die ATP-Sekretion durch VRAC in Makrophagen auslöst [76]. Die purinerge Signaltransduktion ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, einschließlich Entzündung, Apoptose und Signalisierung in ZNS und Gefäßen, beteiligt [119-122]. Zwar sind Pannexin-Kanäle und Connexone die Hauptkandidaten für die meisten nicht-vesikulären und

nicht-zelllytischen ATP-Sekretionswege [123]. Allerdings überlappen die pharmakologischen Profile dieser Kanäle mit dem von VRAC, und interessanterweise können sowohl Pannexine als auch VRAC durch extrazelluläres ATP blockiert werden [124-126], somit kann eine Beteiligung von VRAC ohne die Kenntnis seiner molekularen Identität an einigen dieser Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

1.3.3 Die unbekannt molekulare Identität von VRAC

Die Erforschung der physiologischen Funktionen und die Untersuchung der Zellbiologie, inklusive des Aktivierungsmechanismus, von VRAC wurde natürlich dadurch erschwert, dass die molekulare Identität von VRAC trotz großer Bemühungen verschiedener Forschungsgruppen und einer ganzen Reihe von Kandidatenproteinen Jahrzehnte unbekannt blieb [63, 65, 127]. Der Hauptgrund dafür ist, dass die klassische Ansätze für die molekulare Identifizierung eines Ionenkanals sich nicht für VRAC eigneten [2, 65]. Das Fehlen spezifischer hochaffiner Liganden und Inhibitoren schloss seine biochemische Identifizierung aus. Die ubiquitäre Expression und wahrscheinlich der enigmatische Aktivierungsmechanismus und die mögliche heteromere Form verhinderten Ansätze mit Expressions-Klonierung. Weiterhin gibt es keine Signatursequenz bekannter Chlorid-Kanäle, anhand derer man VRAC bioinformatisch identifizieren könnte [1, 2]. Viele Proteine standen zur Diskussion als mögliche molekulare Korrelate des VRAC. Zu diesen inzwischen verworfenen Kandidaten gehören der Anionenaustauscher AE1 [128] und das *multidrug resistance P-glycoprotein* (P-gp, *MDR1*) [129]. Weitere Kandidaten waren $p_{Cl_{in}}$ [130], für das später gezeigt wurde, dass es eine Komponente des Spliceosoms ist [131], und der endosomale Anionentransporter [39] CIC-3 [132]. Der Chlorid-Kanal CIC-2 wird zwar durch Zellschwellung aktiviert, aber die einwärts gerichtete Rektifikation und seine Ionenselektivitätssequenz einschließlich $Cl^- > I^-$ unterscheiden sich deutlich von den Eigenschaften des VRAC-Stroms [133, 134]. Vor kürzerer Zeit wurden Bestrophine und Mitglieder der TMEM16/anoctamin-Familie als Kandidaten für VRAC gehandelt. Zu den Bestrophinen ist dabei anzumerken, dass dBEST1 aus *Drosophila* tatsächlich schwellaktivierte Chlorid-Ströme in Insektenzellen vermittelt [135, 136]. Allerdings wurden alle diese Kandidaten später experimentell widerlegt [63, 65, 127].

1.4 Fragestellung

Wie oben beschrieben, ist hinlänglich bekannt, dass dem Anionentransport in der Physiologie der Lysosomen, und damit verbunden des Knochenabbaus, und in der Regulierung des zellulären Volumens eine entscheidende Bedeutung zukommt. Dennoch ist über die Natur dieser beiden zellulären Anionentransport-Prozesse vieles unbekannt, weil die entsprechenden Ionen transportierenden Proteinkomplexe nicht elektrophysiologisch charakterisiert und im Falle des volumenregulierten Anionenkanals nicht einmal identifiziert sind. Es ist daher die Fragestellung dieser Habilitationsschrift, den lysosomalen Anionentransporter biophysikalisch zu charakterisieren, die physiologischen Funktionen

seiner Eigenschaften zu untersuchen und die molekulare Identität des volumenregulierten Anionenkanals aufzudecken und eine grundlegende biophysikalische und zellbiologische Charakterisierung durchzuführen.

Die Bedeutung des primären lysosomalen Anionen-Transporters CIC-7 wird durch den drastischen Phänotyp der Knockout-Maus und durch humane Osteopetrose verursachende Mutationen deutlich. Der Pathomechanismus ist dabei allerdings unbekannt, was wohl auch daran liegt, dass die biophysikalischen Eigenschaften von CIC-7 unbekannt sind. Im Gegensatz zu den endosomalen CIC-4 und CIC-5 lokalisiert CIC-7 auch bei starker Überexpression ausschließlich intrazellulär, so dass sich seine Transportaktivität nicht einfach untersuchen ließ. In der vorliegenden Arbeit soll die Mechanismen der subzellulären Sortierung der intrazellulären CLCs betrachtet werden, mit dem Ziel, CIC-7 an die Plasmamembran umleiten und dort elektrophysiologisch erforschen zu können. Besondere biophysikalische Eigenschaften sollen dann zellbiologisch und mithilfe von Tiermodellen auf ihre physiologische Bedeutung untersucht werden. Weiterhin soll mittels eines genomweiten siRNA-Screens nach der molekularen Identität des für die zelluläre Volumenregulation immens wichtigen volumenregulierten Anionenkanals gesucht werden. Zu dem identifizierten Proteinkomplex soll ferner eine erste zellbiologische, biochemische und biophysikalische Charakterisierung durchgeführt werden, in der unter anderem beantwortet werden soll, ob dieser Kanal neben Chlorid auch organische Osmolyte leitet.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Subzelluläre Lokalisation intrazellulärer Chloridtransporter

T. Stauber, T.J. Jentsch (2010). Sorting motifs of the endosomal/lysosomal CLC chloride transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 34537-48. [137]

Die CLC-Proteinfamilie besteht in Mammalia aus neun Mitglieder, von denen vier (CLC-1, -2, -Ka und -Kb) in der Plasmamembran residierende Chlorid-Kanäle darstellen, während die übrigen fünf Mitglieder (CLC-3, -4, -5, -6 und -7) vorwiegend intrazellulär lokalisierende Chlorid-Protonen-Austauscher darstellen [10]. Die letztgenannten Proteine sind hauptsächlich im endosomal-lysosomalen System zu finden, wo sie an der luminalen Ansäuerung durch die V-ATPase bzw. der Chlorid-Akkumulation beteiligt sind [8]. Die intrazellulären CLC-Proteine kommen hier auf verschiedenen, aber zum Teil überlappenden Kompartimenten vor. So lokalisiert z.B. CLC-3 auf Endosomen und möglicherweise auch auf synaptischen Vesikeln, CLC-5 auf frühen Endosomen und zu einem kleinen Teil an der Plasmamembran, das neuronale CLC-6 auf späten Endosomen und CLC-7 auf späten Endosomen und Lysosomen [10].

Punktuelle Kenntnisse über das subzelluläre *Targeting* der intrazellulären CLC-Proteine waren vorhanden. In dieser Studie wurde eine systematische Untersuchung der differentiellen Bindung von Adapterproteinen der endosomalen Sortieremaschinerie - von Adapter-Proteinkomplexen (APs), *Golgi-localized, γ -ear containing, Arf-binding* (GGA)-Proteinen und Clathrin - an die zytosolischen Regionen der intrazellulären CLC-Proteine durchgeführt. Die identifizierten Interaktionen passen dabei gut zu den bekannten subzellulären Lokalisationen der CLC-Proteine und der Sortierungsfunktion der entsprechenden Interaktionspartner. Durch Mutationsuntersuchungen wurden weiterhin einzelne Bindungsstellen in den CLC-Sequenzen, die für die Interaktion mit Komponenten der Transport-Maschinerie verantwortlich sind, gefunden. Mittels heterologer Expression von CLC-Proteinen mit eingefügten Mutationen in diesen Motiven wurde deren Funktionalität in der subzellulären Sortierung untersucht. Dabei hat sich beispielsweise herausgestellt, dass das normalerweise spät-endosomal/lysosomal lokalisierende CLC-7 zusammen mit seiner β -Untereinheit Ostm1 durch Mutation aminoterminaler Sortierungsmotive teilweise zur Plasmamembran fehlgeleitet werden kann.

Die systematische Untersuchung der Interaktionen zwischen den intrazellulären CLCs und Proteinen, die die Sortierung von Cargo in unterschiedliche Clathrin-Vesikel bewerkstelligen, zeigt, dass die unterschiedlichen Lokalisationen der CLCs auf den endosomalen/lysosomalen Kompartimenten auf den differentiellen Bindungen beruhen. In vielen Fällen wurden die exakten Bindungsmotive der CLCs identifiziert. Das ansonsten rein intrazellulär lokalisierte CLC-7 kann durch gezielte Mutation der identifizierten Motive partiell an die Plasmamembran fehllokalisiert werden, was es für elektrophysiologische Untersuchungen und Aktivitätstests in Folgestudien zugänglich macht.

Seiten 16–27:

T. Stauber, T.J. Jentsch (2010). Sorting motifs of the endosomal/lysosomal CLC chloride transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 34537-48.

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.162545>

2.2 Biophysikalische Charakterisierung des lysosomalen Cl⁻/H⁺-Austauschers CIC-7/Ostm1

L. Leisle, C.F. Ludwig, F.A. Wagner, T.J. Jentsch, T. Stauber (2011). CIC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl⁻/1H⁺-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO Journal*, 30: 2140-52. [138]

Während andere intrazelluläre CLCs bei starker Überexpression teilweise an der Zelloberfläche lokalisieren, ist dies bei CIC-7 nicht der Fall. So war dieser lysosomale Anionentransporter einer der wenigen CLCs, die noch nicht mittels elektrophysiologischer Methoden untersucht wurde. Die Identifizierung amino-terminaler Sortierungsmotive in der Sequenz von CIC-7 erlaubte eine gezielte Mutagenese, mittels derer CIC-7 zusammen mit seiner β -Untereinheit Ostm1 partiell an die Plasmamembran fehlgeleitet wird.

In dieser Studie wurde eine partiell an der Plasmamembran lokalisierende Mutante von CIC-7 zusammen mit Ostm1 in *Xenopus*-Oozyten und humanen Zelllinien überexprimiert und mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*two-electrode voltage clamp*, TEVC) bzw. durch die Patch-Clamp-Technik untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Ionentransportaktivität von CIC-7 von der Bindung von Ostm1, das über seinen Transmembran-Teil mit CIC-7 interagiert, abhängt. Der Anionentransport von CIC-7/Ostm1 stimmt einerseits in vielen Eigenschaften mit den anderen bereits charakterisierten intrazellulären CLCs überein. So vermittelt es auswärts gleichrichtenden Cl⁻/H⁺-Austausch und Mutationen des *gating glutamate* und des *proton glutamate* entkoppeln den Anionentransport vom Protonen-Gegentransport bzw. inhibieren den gesamten Ionentransport. Andererseits weist CIC-7 im Gegensatz zu den anderen intrazellulären CLCs eine sehr langsame spannungsabhängige Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik auf, die eine Analyse der *tail currents* ermöglicht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Rektifizierung des makroskopischen Stroms auf dem langsamen Steuerungsverhalten beruht, während der Ionentransport durch den aktivierten Ionentransporter nahezu linear spannungsabhängig ist. Durch Untersuchungen des Umkehrpotenzials konnte eine Austausch-Stöchiometrie von ca. 2 Cl⁻ zu 1 H⁺ belegt werden. Des Weiteren wurden humane Osteopetrose verursachende Mutationen auf ihre subzelluläre Lokalisierung und Anionentransport-Aktivität untersucht. Neben Mutationen, die den Export von CIC-7/Ostm1 aus dem ER gestört haben, und solchen, die trotz normaler Lokalisation den Ionentransport inhibiert haben, wurden viele Mutationen beschrieben, die die Aktivierungskinetik von CIC-7 beschleunigen.

Diese Studie stellt die erste elektrophysiologische Charakterisierung des lysosomalen Anionen-Transporters CIC-7 dar. Es wurde eindeutig gezeigt, dass CIC-7 ein Cl⁻/H⁺-Austauscher ist. Die Entdeckung, dass das Steuerungsverhalten der Rektifizierung zugrunde liegt, erweitert die Idee der Spannungs-Steuerung (*voltage gating*) von Kanälen auf Ionentransporter. Die die Kinetik beschleunigenden CIC-7-Mutationen liegen vorwiegend in der möglichen Kontaktzone zwischen dem zytosolischen und dem Transmembran-Bereich, was auf eine Beteiligung dieser intramolekularen Interaktion an der Steuerung hindeutet. Ferner werfen sie für Folgestudien die Frage nach einer physiologischen Rolle der Kinetik auf.

Seiten 29–41:

L. Leisle, C.F. Ludwig, F.A. Wagner, T.J. Jentsch, T. Stauber (2011). ClC-7 is a slowly voltage-gated $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ -exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO Journal*, 30: 2140-52.

<http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.137>

2.3 Physiologische Bedeutung von CIC-7 und seiner besonderen biophysikalischen Eigenschaften

Mutationen in CIC-7 und in seiner β -Untereinheit Ostm1 verursachen Osteopetrose und eine neurodegenerative lysosomale Speicherkrankheit in Mäusen und Menschen [40, 44, 45, 60]. Der schwere Multiorgan-Phänotyp in Mausmodellen, die konstitutiv und ubiquitär defizient für CIC-7 bzw. Ostm1 sind, und das Fehlen von Speichermaterial in kultivierten Zellen erschwerte Untersuchungen zum Mechanismus, der zur lysosomalen Pathologie bei Dysfunktion von CIC-7/Ostm1 führt. Die Beobachtung, dass der pH-Wert von Zellen ohne CIC-7/Ostm1 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen unverändert ist [44, 45], macht die Situation umso rätselhafter. Die biophysikalische Charakterisierung von CIC-7 [138] hat ergeben, dass es sich um einen langsam gesteuerten Cl^-/H^+ -Austauscher handelt. In den drei Arbeiten in diesem Kapitel wird anhand von Tiermodellen auf die Funktion von CIC-7 in der lysosomalen Physiologie, auf die Rolle der Cl^-/H^+ -Austausch-Aktivität und auf die Bedeutung der langsamen Steuerungskinetik von CIC-7 eingegangen.

2.3.1 Zellautonome Rolle von CIC-7 für den lysosomalen Proteinabbau

L. Wartosch, J.C. Fuhrmann, M. Schweizer, T. Stauber, T.J. Jentsch (2009). Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *The FASEB Journal*, 23: 4056-68. [139]

Um den Pathomechanismus der lysosomalen Speicherkrankheit bei Fehlen bzw. Dysfunktion von CIC-7 genauer untersuchen zu können als in den CIC-7-defizienten Mäusen, die nach maximal vier Wochen versterben, wurden unter Nutzung des Lox/Cre-Systems und Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des EMX1- bzw. des ApoE-Promotors exprimieren, für Neuronen des Vorderhirns bzw. renale proximale Tubulus (PT)-Zellen gewebsspezifische CIC-7-Knockout-Mäuse generiert. In diesen Tieren, die eine normale Lebensdauer aufwiesen, wurde gezeigt, dass die Akkumulation von Speichermaterial zellautonom in Neuronen oder renalen PT-Zellen ohne CIC-7 auftritt. Fast alle CIC-7-defizienten Neuronen starben, so dass der Cortex in älteren Mäusen sehr stark degeneriert war. Die Aktivierung von Gliazellen und Astrozyten war dabei auf Gehirnregionen beschränkt, in denen CIC-7 in neuronalen Zellen inaktiviert wurde.

Die Wirkung des Fehlens von CIC-7 auf die lysosomale Funktion wurde in PT-Zellen der Niere, die eine besonders hohe endozytotische Aktivität aufweisen, untersucht. Das mosaikartige Fehlen von CIC-7 innerhalb der proximalen Tubuli erlaubte einen direkten Vergleich zwischen benachbarten Wildtypzellen und Zellen ohne CIC-7. In CIC-7-defizienten Zellen waren die Strukturen, die positiv für Marker der spät endosomalen/lysosomalen Kompartimente sind, deutlich vergrößert. Dass endozytirt Material in diese vergrößerten Strukturen gelangte, zeigte, dass sie tatsächlich in den endozytotischen Weg integriert waren. Dieser morphologische Phänotyp ist jedoch nicht einfach auf die Akkumulation endozytierten Materials zurückzuführen, da die Vergrößerung auch unter stark reduzierter endozytotischer

Aktivität in CIC-5-defizienten PT-Zellen beobachtet wurde. Die Aufnahme und der Abbau von in die Schwanzvene injiziertem Protein *in vivo* wurde in *Pulse-Chase*-Experimenten untersucht. Während die Endozytose des markierten Proteins durch das Fehlen von CIC-7 nicht beeinträchtigt war, war seine Halbwertszeit in CIC-7-defizienten Zellen deutlich erhöht. Passend dazu wurde in Geweben von CIC-7-Knockout-Mäusen eine Akkumulation von autophagischem Material beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die lysosomale Pathologie, die vor allem für Neuronen, aber auch für renale PT-Zellen beschrieben war, eine zellautonome Folge der CIC-7-Störung ist. Die Aktivierung von Mikroglia hingegen wird sekundär durch die Pathologie der CIC-7-defizienten Neuronen hervorgerufen. Die Rolle von CIC-7 für den lysosomalen Proteinabbau deutet auf eine vom lysosomalen pH (der durch das Fehlen von CIC-7 nicht verändert ist) unabhängige Funktion des Chloridtransports in diesem Prozess hin. Dabei deutet die Vergrößerung der lysosomalen Kompartimente auch bei Reduktion des endozytierten Materials auf einen Defekt in den Transportprozessen zwischen den Kompartimenten des endosomal-lysosomalen Weges hin.

Seiten 44–56:

L. Wartosch, J.C. Fuhrmann, M. Schweizer, T. Stauber, T.J. Jentsch (2009). Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *The FASEB Journal*, 23: 4056-68.

<http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-130880>

2.3.2 Die Kopplung lysosomalen Cl⁻-Transports mit H⁺-Gegentransport ist wichtig für die Physiologie von Lysosomen und Knochenabbau

S. Weinert, S. Jabs, C. Supanchart, M. Schweizer, N. Gimber, M. Richter, J. Rademann, T. Stauber, U. Kornak, T.J. Jentsch (2010). Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation. *Science*, 328: 1401-3. [140]

Die Ansäuerung der Lysosomen durch die V-ATPase bedarf eines Ausgleichsstroms, für den angenommen wurde, dass er durch einen Chloridkanal vermittelt wird. Überraschenderweise wurde jedoch ein normal-saurer lysosomaler pH in Zellen von ClC-7-Knockout-Mäusen beobachtet [44, 45]. Biophysikalische Experimente an isolierten Lysosomen [48] und Sequenz-Homologien zu anderen Cl⁻/H⁺-Austauschern der CLC-Familie [10] deuteten darauf hin, dass auch ClC-7 ein Cl⁻/H⁺-Austauscher ist, was inzwischen auch eindeutig gezeigt wurde [138].

Um die physiologische Funktion der Cl⁻/H⁺-Austausch-Aktivität zu überprüfen, wurde ein Mausmodell generiert, in dem ClC-7 durch eine Punktmutation des *gating glutamate* in ein Alanin in eine von Protonen-Antiport entkoppelte, reine Chlorid-Leitfähigkeit umgewandelt wurde (die Auswirkung dieser Mutation auf den Ionentransport von ClC-7 wurde auch in [138] beschrieben). Diese entkoppelte ClC-7-Mutante wies ein normales Expressionslevel und eine normale Lokalisierung (auf Lysosomen und am Bürstensaum von Osteoklasten) auf. Dennoch entwickelten Mäuse, die homozygot für die entkoppelte Mutante waren, eine nahezu gleiche lysosomale Pathologie mit Neurodegeneration wie ClC-7-Knockout-Mäuse. Die Osteopetrose fiel jedoch milder aus und es fehlte der Fellfarbenphänotyp. Also konnten zwar einige, aber nicht alle Funktionen des Cl⁻/H⁺-Austausches durch die Chlorid-Leitfähigkeit übernommen werden.

Durch Ionenmessungen an isolierten Lysosomen und in lebenden Zellen wurde nachgewiesen, dass die Chlorid-Leitfähigkeit dieser Organellen mit der entkoppelten Mutante erhalten blieb, während die Kopplung an Protonen-Transport aufgehoben war. In Abwesenheit von ClC-7 war beides nicht gegeben. Die Ansäuerung isolierter Lysosomen war unabhängig von ClC-7 und sogar von extra-lysosomalem Chlorid. Die Simulation dieser Experimente mit einem vereinfachten mathematischen Modell sagte vorher, dass Wildtyp-Lysosomen während der Ansäuerung mehr luminales Chlorid akkumulieren, was auch experimentell nachgewiesen wurde.

Diese Studie zeigt eine wesentliche Rolle des Cl⁻/H⁺-Austausches in der lysosomalen Physiologie. Diese besteht nicht in der Ermöglichung der lysosomalen Ansäuerung, für die in einer parallelen Studie gezeigt wurde, dass sie auch chlorid-unabhängig durch Kationen-Ausstrom unterstützt werden kann [30]. Stattdessen scheint die pH-getriebene Akkumulation von Chlorid in Lysosomen eine eigene, unbekannte Funktion innezuhaben.

Seiten 58–60:

S. Weinert, S. Jabs, C. Supanchart, M. Schweizer, N. Gimber, M. Richter, J. Rademann, T. Stauber, U. Kornak, T.J. Jentsch (2010). Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation. *Science*, 328: 1401-3.

<http://dx.doi.org/10.1126/science.1188072>

2.3.3 Die langsame Steuerungskinetik von ClC-7/Ostm1

A. Sartelet*, T. Stauber*, W. Coppieters, C.F. Ludwig, C. Fasquelle, T. Druet, Z. Zhang, N. Ahariz, N. Cambisano, T.J. Jentsch, C. Charlier (2014). A missense mutation accelerating the gating of the lysosomal Cl⁻/H⁺ exchanger ClC-7/Ostm1 causes osteopetrosis with gingival hamartomas in cattle. *Disease Models and Mechanisms*, 7: 119-28. (*geteilte Erstautorschaft) [141]

Wie aus der vorherigen Studie [140] hervorgeht, ist der durch ClC-7 vermittelte Chlorid-Protonen-Austausch von zentraler Bedeutung für die Physiologie der Lysosomen und die Knochenresorption. Mutationen in ClC-7 oder seiner β -Untereinheit Ostm1 liegen auch in Menschen Osteopetrose zugrunde. Bei der funktionellen Untersuchung ausgewählter, Osteopetrose verursachender ClC-7-Mutanten [138] wurde für einige gezeigt, dass sie den Transport des Anionenaustauschers aus dem ER, und für andere, dass sie die Ionentransportaktivität stören. Überraschenderweise beschleunigten andere Mutationen von ClC-7 die im Normalfall langsam spannungsabhängige Steuerungskinetik von ClC-7/Ostm1. Unter anderem weil es bislang keine Daten zur Expression solcher Mutanten in Patienten gab, war jedoch unklar, ob in diesen Fällen die beschleunigte Kinetik in der Tat für die Krankheit verantwortlich ist.

In dieser Studie wurde eine neue ClC-7-Mutation untersucht, die in der Rinderrasse Weißblauer Belgier (*Belgian blue cattle*, BBC) eine rezessiv vererbte, schwere Symptomatik einschließlich perinataler Letalität und in den meisten Fällen Zahnfleischhamartome verursacht. Durch Kartierung und genomweite Sequenzierung wurde die Substitution eines konservierten Tyrosins in der zweiten CBS-Domäne von ClC-7 durch Glutamin identifiziert. Die betroffenen Kälber wiesen auch eine schwere Osteopetrose auf. Ebenso gab es Hinweise auf eine Akkumulation lysosomalen Speichermaterials und autophagozytischer Strukturen.

Die Mutation beschleunigte die Aktivierungskinetik von heterolog exprimiertem ClC-7/Ostm1, das korrekt subzellulär lokalisierte, während die maximale Stromstärke und ihre Spannungsabhängigkeit unverändert blieben. Gewebsuntersuchungen von einem betroffenen Kalb ergaben, dass ClC-7 und Ostm1 in normaler Proteinmenge vorlagen und auch *in vivo* lysosomal lokalisierten.

Diese Studie liefert deutliche Hinweise darauf, dass eine Beschleunigung des spannungsabhängigen Steuerns von ClC-7/Ostm1 *per se* schädlich ist, und verdeutlicht somit eine physiologische Bedeutung der für die intrazellulären CLCs besonderen, langsamen Spannungs-Aktivierung von ClC-7/Ostm1 für die lysosomale Funktion und Knochenresorption.

Seiten 62–71:

A. Sartelet, T. Stauber, W. Coppieters, C.F. Ludwig, C. Fasquelle, T. Druet, Z. Zhang, N. Ahariz, N. Cambisano, T.J. Jentsch, C. Charlier (2014). A missense mutation accelerating the gating of the lysosomal Cl^-/H^+ exchanger *CLC-7/Ostm1* causes osteopetrosis with gingival hamartomas in cattle. *Disease Models and Mechanisms*, 7: 119-28.

<http://dx.doi.org/10.1242/dmm.012500>

2.4 Identifikation und erste Charakterisierung von LRRC8-Heteromeren als essenzielle Komponente des volumenregulierten Anionenkanals

F.K. Voss, F. Ullrich, J. Münch, K. Lazarow, D. Lutter, N. Mah, M.A. Andrade-Navarro, J.P. von Kries, T. Stauber*, T.J. Jentsch* (2014). Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*, 344: 634-8. (*geteilte Korrespondenzautorschaft) [142]

Der volumenregulierte Anionenkanal VRAC war seit Jahrzehnten elektrophysiologisch beschrieben. Zu den typischen Eigenschaften dieses in Vertebraten ubiquitär exprimierten Anionenkanals gehört eine moderate Auswärts-Gleichrichtung, eine höhere Permeabilitäts-Selektivität für Iodid als für Chlorid und eine zwischen Zelltypen variable zeitabhängige Deaktivierung bei zytosolisch-positiven Potenzialen. Da trotz zahlreicher Versuche und Kandidaten-Genen die molekulare Identität von VRAC unbekannt war, blieben viele Aspekte der Zellbiologie, Biophysik und Physiologie dieses Kanals ungeklärt.

In dieser Studie wurde ein genomweiter siRNA-Screen zur Suche nach den VRAC zugrundeliegenden Genen durchgeführt. Der Hauptkandidat davon war LRRC8A, eines von fünf Mitgliedern der LRRC8-Familie. Sowohl dessen Knockdown als auch seine Überexpression unterdrückte in *Patch-Clamp*-Versuchen den schwellungsinduzierten Chloridstrom, $I_{Cl,swell}$. Bei gemeinsamer Expression mit den anderen Familienmitgliedern, mit denen LRRC8A auch co-immunpräzipitierte und für deren Transport vom ER zur Plasmamembran LRRC8A benötigt wird, fand diese Suppression nicht statt. Mittels Knockoutzelllinien, in denen die fünf LRRC8-Familienmitglieder einzeln und in Kombinationen fehlen, wurde gezeigt, dass LRRC8-Heteromere, die essenziell LRRC8A und mindestens ein weiteres LRRC8 enthalten müssen, für VRAC-Strom vonnöten sind. Dabei bestimmt die Zusammensetzung der Heteromere die Inaktivierungskinetik unter Depolarisation. Eine Korrelation zwischen zellspezifischer Inaktivierung und der Expression bestimmter LRRC8s wurde festgestellt. Die Abhängigkeit dieser kanal-intrinsischen Eigenschaft von den Untereinheiten deutet stark darauf hin, dass die Untereinheiten tatsächlich an der Bildung der Kanalpore beteiligt sind. Dazu passt ebenfalls die biochemisch nachgewiesene Topologie-Homologie zu Pannexinen, die hexamere Ionenkanäle bilden. Weiterhin wurde herausgefunden, dass LRRC8-Heteromere ebenfalls essenziell für den schwellungsinduzierten Ausstrom von dem Osmolyt Taurin sind. Schließlich wurde ein Defekt in der regulativen Volumenabnahme in LRRC8A-Knockout-Zellen nachgewiesen.

Mit der Entdeckung von LRRC8-Heteromeren als essenzielle VRAC-Komponente wurde in dieser Studie eine neue Klasse von Anionenkanälen gefunden. Die molekulare Identifizierung des lang gesuchten VRAC schafft die Basis für die Erforschung seiner Struktur-Funktions-Beziehung und der Zellbiologie mit dem unbekanntem Aktivierungsmechanismus und für die Überprüfung der vielen vorhergesagten physiologischen Funktionen. Die differentielle Zusammensetzung der LRRC8-Heteromere könnte dabei eine Erklärung für zelltypspezifische Unterschiede und unterschiedliche Beobachtungen in bisherigen Publikationen liefern.

Seiten 73–77:

F.K. Voss, F. Ullrich, J. Münch, K. Lazarow, D. Lutter, N. Mah, M.A. Andrade-Navarro, J.P. von Kries, T. Stauber, T.J. Jentsch (2014). Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*, 344: 634-8.

<http://dx.doi.org/10.1126/science.1252826>

3. Diskussion

3.1 Chloridtransporter im endosomal-lysosomalen System

3.1.1 Chlorid-Transportproteine endosomal-lysosomaler Kompartimente

Verschiedene Chlorid-Transportproteine wurden mit spät-endosomalem/lysosomalem Transport und in der Funktion von Lysosomen und mit dem Lysosom verwandten Organellen (*lysosome-related organelles*, LROs) in Verbindung gebracht [8]. Der Vergleich von kultivierten Hepatozyten aus Wildtyp und CIC-3-defizienten Mäusen ergab, dass CIC-3 an der normalen Ansäuerung und an der Steigerung der luminalen Chlorid-Konzentration in frühen und späten Endosomen beteiligt ist [47]. Dass seine Überexpression in Säugerzellen zu einer drastischen Vergrößerung der für spät endosomale/lysosomale Marker positiven vesikulären Strukturen führt (ähnlich zum in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Phänotyp in CIC-7-defizienten renalen PT-Zellen [139]), deutet auf eine Rolle von CIC-3 im späten endosomal Transport hin [143]. In diesen Kompartimenten sammelt sich endozytotischer Cargo, der für Lysosomen bestimmt ist, an. Für die neuronale und retinale Degeneration bei CIC-3-defizienten Mäusen [39, 144, 145] bleibt jedoch unklar, ob sie durch Störung des endosomal Transport oder wegen einer Rolle von CIC-3 auf synaptischen Vesikeln entsteht. Für eines der drei unabhängigen CIC-3-Knockout-Mausmodelle [145] wurden zwar Merkmale neuronaler Zeroidlipofuszinose (NCL, einer lysosomalen Speicherkrankheit) beschrieben, dies konnte aber in näheren Untersuchungen von anderen CIC-3-defizienten Mäuselinien nicht bestätigt werden [39, 44]. Dagegen wurde eine neuronale Akkumulation von lysosomalem Speicher material in Mäusen beobachtet, in denen CIC-6, ein fast ausschließlich in Neuronen exprimiertes, spät endosomales CLC, fehlt [38], was für eine Rolle von CIC-6 in der Funktion von späten Endosomen bzw. Lysosomen spricht.

Das einzige CLC, das in Wildtypzellen auf Lysosomen beobachtet wurde, ist das ubiquitär exprimierte CIC-7 [35, 40, 44, 48]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 2.1) erneut bestätigt und die durchgeführten Bindungsstudien mit Adapter-Proteinkomplexen der endosomal-lysosomalen Sortierungsmaschinerie bieten eine Erklärung für diese exklusive Lokalisierung [137]. Die zytosolischen Anteile von CIC-7 binden die Adaptorproteine AP-3 und GGAs, welche den Transport zu späten Endosomen, die zu Lysosomen reifen, vermitteln. Auch Ostm1, die β -Untereinheit von CIC-7, bindet AP-3 *in vitro*, jedoch wird bei gemeinsamer Expression mit CIC-7 die gemeinsame subzelluläre Lokalisation durch CIC-7 bestimmt. Auch CIC-6 bindet AP-3 [137]. Allerdings ist dieses CLC in Neuronen, in denen es wie oben erwähnt exklusiv vorkommt, spät-endosomal lokalisiert und wird bei Fehlen des lysosomalen CIC-7 teilweise in Lysosomen verschoben [38]. Im Gegensatz dazu bindet z.B. CIC-5 nicht an AP-3, sondern an die Adapter-Proteinkomplexe AP-1 und AP-2, was zu seiner Lokalisation auf frühen Endosomen und seinem Transport über die Plasmamembran passt [137]. Die Identifizierung von Sortierungsmotiven innerhalb der CIC-7-Sequenz erlaubte nun, die Sortierung von CIC-7 hin zu Lysosomen durch gezielte Mutagenese zu stören, so dass es zumindest partiell an die Plasmamembran geleitet wird. Dies erlaubte die elektrophysiologische Untersuchung von

ClC-7 und einigen Mutanten in dieser Arbeit [138, 141] und weiteren Studien [146, 147], die weiter unten diskutiert werden.

3.1.2 Pathophysiologie dysfunktionalen lysosomalen Anionentransports

Die Bedeutung von ClC-7 für die Physiologie der Lysosomen wird durch die lysosomale Pathologie der Mäuse, die defizient sind für ClC-7 (*Clcn7*^{-/-}-Mäuse [40]) oder seine obligate β -Untereinheit, Ostm1 (spontane *grey-lethal* Maus-Mutante [59]), deutlich. Neuronen und renale PT-Zellen dieser Mäuse akkumulieren lysosomales Speichermaterial [44, 45, 148]. Während diese Ablagerungen in *Clcn6*^{-/-}-Neuronen innerhalb der initialen Axon-Segmente akkumulieren [38], sind sie in über die gesamten Somata von ClC-7 oder Ostm1-defizienten Neuronen verteilt [44, 45]. Die lysosomale Speicherung von ClC-7/Ostm1-defizienten Mäusen zeigt Merkmale von NCL, wie zum Beispiel eine Ansammlung der c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase und eine progressive Neurodegeneration im ZNS, die von Mikroglia-Aktivierung und Astrogliose begleitet wird [44, 45, 148]. Wie in der vorliegenden Arbeit anhand gewebsspezifischer ClC-7-Knockout-Mäuse mit einer Deletion in Neuronen des Vorderhirns gezeigt [139], ist die Anhäufung von lysosomalem Speichermaterial zellautonom und die Neurodegeneration kann sehr schwerwiegend sein. In Nervenzellen und renalen proximalen Tubulus-Zellen von Mäusen, denen ClC-7/Ostm1 fehlt, ist die morphologische Integrität des späten endosomal / lysosomalen Systems gestört. In Gehirnen von *Clcn7*^{-/-}-Mäusen werden ClC-3 und ClC-6 teilweise in lysosomale Fraktionen verschoben [38]. Während die Anfärbung des spät endosomal / lysosomalen Markerproteins *lysosomal-associated membrane protein 1* (Lamp1) in ClC-7/Ostm1-defizienten Neuronen diffuser erscheint [44, 139], sind Lamp1-positive Strukturen in ClC-7/Ostm1-defizienten PT-Zellen drastisch vergrößert [139]. Sowohl die Rezeptor-vermittelte als auch die Flüssigkeitsphasen-Endozytose sind in ClC-7-defizienten PT-Zellen unverändert, und endozytotischer Cargo wird zu den vergrößerten späten Endosomen und Lysosomen transportiert [139]. Quantitative *in vivo*-Pulse-Chase-Experimente mit Mäusen, die ein mosaikartiges Fehlen von ClC-7 in renalen proximalen Tubuli (durch Kreuzung „gefloxter“ ClC-7-Mäuse mit Mäusen, die cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors ApoE exprimieren) aufweisen, zeigten einen verzögerten Abbau endozytierter Proteine bei Fehlen von ClC-7 [139]. Interessanterweise mindert die zusätzliche Deletion des früh endosomal ClC-5, die die endozytotische Aufnahme drastisch reduziert [41], nicht die Vergrößerung der späten Endosomen und Lysosomen in ClC-7-defizienten PT-Zellen [139]. Dieser Befund legt nahe, dass die morphologische Veränderung im endosomal / lysosomalen Weg nicht auf eine Ansammlung von nicht abgebautem, endozytiertem Material zurückzuführen ist, sondern möglicherweise auf eine Störung in Transport- und Fusionsereignissen in diesem Membrantransportweg.

In Gehirn und Nieren von ClC-7-Knockout-Mäusen ist auch die Menge von LC3-II erhöht, was auf eine Ansammlung von autophagischen Strukturen hindeutet [139]. Unklar ist, ob dieser Phänotyp auf einen Defekt in der lysosomalen Clearance von autophagischem Material (im Einklang mit der verlangsamten lysosomalen Degradation) oder zu einer Erhöhung der

Autophagie (möglicherweise als zelluläre Antwort auf die lysosomale Speicherakkumulation) zurückzuführen ist [149]. CIC-7/Ostm1 scheint auch an der Funktion von *lysosome-related organelles* (LROs) beteiligt, wie der von Melanosomen. In einem genetischen Hintergrund mit normalerweise braunem Fell ist die Fellfarbe der *Clcn7^{-/-}* und der Ostm1-defizienten *grey-lethal*-Maus grau. Die genaue Rolle von CIC-7/Ostm1 in der Pigmentierung ist unbekannt, jedoch scheint sie zumindest teilweise unabhängig von der Ionen-Transport-Aktivität zu sein. Eine gentechnisch generierte Maus, die CIC-7 mit einer Punktmutation exprimiert, die den Ionen-Transport verhindert (wie in Abschnitt 2.2 gezeigt [138]) aber die Expression und Lokalisation von CIC-7 nicht verändert, weist nicht den Fellfarben-Phänotyp der CIC-7-Knockout-Maus auf [150]. Der Transporter kann für die Erzeugung oder die Exozytose von Pheomelanin, dem rot-gelben Melaninpigment, erforderlich sein. Eine Verringerung der lysosomalen Exozytose scheint durch die Beobachtung unterstützt, dass der Säure sezernierende Bürstensaum der Osteoklasten, der normalerweise durch eine hohe lysosomale Exozytose aufgebaut wird, in *Clcn7^{-/-}* Mäusen stark unterentwickelt ist (was sicherlich zu der reduzierten Ansäuerung der Resorptionslakuna beiträgt) [40, 140, 150].

Somit deuten die morphologischen Veränderungen spät-endosomaler / lysosomaler Kompartimente bei Dysfunktion des lysosomalen Chlorid-Transporters CIC-7 und die pathologischen Konsequenzen für den Organismus auf eine entscheidende Rolle in dem Transport und der Funktionalität dieser Vesikel hin.

3.2 Mechanistische Funktion von lysosomalem Chloridtransport

3.2.1 Keine Notwendigkeit von Chloridtransport für die lysosomale Ansäuerung

Für eine lange Zeit wurde gedacht, dass Chloridtransport über intrazelluläre Membranen lediglich als elektrischer Ausgleichstrom für den Transport von physiologisch relevanten Kationen dient. So wurde erwartet, dass die Hauptaufgabe von Chlorid-Kanälen in dem sekretorischen und im endosomal-lysosomalen Weg darin besteht, die Ansäuerung der entsprechenden Organellen, die sekundär-aktive Transportprozesse, Vesikeltransport und Enzymaktivitäten reguliert, zu ermöglichen. Allerdings haben neuere Erkenntnisse, wie auch die in Abschnitten 2.2 und 2.3.2 dieser Arbeit aufgeführten, diese Ansicht geändert. Chloridtransport scheint für die Ansäuerung bestimmter Organellen entbehrlich und die jüngsten Daten legen nahe, dass intrazellulärer Chloridtransport eine Rolle spielt, die über die bloße Bereitstellung der Gegenionen für die vesikuläre Ansäuerung hinausgeht.

Die zentrale Bedeutung der Erzeugung und Aufrechterhaltung von pH-Gradienten über die Membran von intrazellulären Vesikeln ist unbestritten. Posttranslationale Modifikation von sekretierten Proteinen, die Regulierung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, die Sortierung von Cargo, die Rekrutierung von Transport-Maschinen-Komponenten, die Beladung mit Neurotransmittern und der Abbau durch lysosomale Enzyme gehören zu den zahlreichen Prozessen in den sekretorischen und endozytotischen Wegen, die von einem sauren luminalen pH-Wert abhängen [11]. Die Ansäuerung wird durch die V-ATPase

bewerkstelligt, die unter ATP-Verbrauch Protonen ins Innere der Kompartimente transportiert. Um die Bildung von einem innen-positiven elektrischen Potenzial über die Membran, das eine weitere Anreicherung von Protonen verhindern würde, abzuwenden, muss der H⁺-Einstrom durch einen parallelen Kationen-Ausstrom und/oder einen Anionen-Einstrom begleitet werden. Frühe Studien an isolierten Vesikeln des Golgi-Apparats und an Endosomen haben gezeigt, dass externes Chlorid für eine effiziente Ansäuerung erforderlich ist [8]. Diese Idee wurde von Studien untermauert, in denen die luminaire Chloridkonzentration im Endozytoseweg gemessen wurde [23, 151]. Nach einem anfänglichen Abfall auf etwa 20 mM in den endozytotischen Vesikeln, die sich von der Plasmamembran abschnüren, erhöht sich die luminaire Chloridkonzentration, während die Kompartimente allmählich angesäuert werden. Aufgrund ihrer endosomalen Lokalisation sind ClC-3, -4 und -5 gute Kandidaten, um die notwendige Cl⁻ Leitfähigkeit bereitzustellen. Im Einklang mit dieser Idee wurde in verschiedenen Studien eine Rolle von ClC-3 und ClC-5 in der Ansäuerung von Endosomen gezeigt (eine Übersicht ist in [8] zu finden).

Im Gegensatz zu der Situation in Endosomen, für deren Ansäuerung die Notwendigkeit von Chloridtransport allgemein akzeptiert ist, steht die Rolle von Chlorid-Transportproteinen für das Erreichen des sauren pH-Werts von Lysosomen in Frage [8, 22]. Für spezielle Zelltypen, insbesondere alveoläre Makrophagen und respiratorische Epithelzellen, ist berichtet worden, dass das Fehlen oder die Hemmung von CFTR den lysosomalen pH erhöht (z.B. [29]). Nachfolgende Studien, größtenteils mit verfeinerten pH-Messmethoden, zeigten jedoch keinen Einfluss von CFTR auf den lysosomalen pH (z.B. [30, 33]) und es gibt keine zuverlässigen, knockout-kontrollierten Daten zu einer lysosomalen Lokalisation von CFTR. Auch das spät-endosomale/lysosomale ClC-7, das die primäre Chlorid-Leitfähigkeit von Lysosomen bereitstellt [48, 140], ist entbehrlich für die lysosomale Azidifizierung. Die Ansäuerung der Resorptionslakuna durch den Bürstensaum, der durch lysosomale Exozytose aufgebaut wird, ist in ClC-7-defizienten Osteoklasten tatsächlich beeinträchtigt [40]. Diese Beeinträchtigung kann zum Teil auf eine Unterentwicklung des Bürstensaums [40] zurückgeführt werden. Da ClC-7- und Ostm1-defiziente Mäuse eine lysosomale Speicherkrankheit entwickeln [44, 45], ist es umso überraschender, dass der lysosomale pH in verschiedenen Zelllinien dieser Mäuse nicht verändert war [30, 44, 45, 140]. Passend dazu ist auch die Azidifizierung von Lysosomen *in vitro* durch das Fehlen von ClC-7 nicht vermindert (Abschnitt 2.3.2, [140]). In einer scheinbar widersprüchlichen Studie wurde eine Reduktion des LysoTracker-Signals in HeLa-Zellen nach einem ClC-7-Knock-down mit einer siRNA als Hinweis auf einen erhöhten lysosomalen pH interpretiert [48]. In einer weiteren Studie wurde berichtet, dass die lysosomale Ansäuerung in Mikroglia durch parallele Hochregulation von ClC-7/Ostm1 während der Mikroglia-Aktivierung verstärkt wird [152]. Ein direkter kausaler Zusammenhang bleibt zu prüfen, aber eine Rolle von ClC-7 in der lysosomalen Ansäuerung in einigen spezialisierten Zelltypen kann nicht ausgeschlossen werden.

Nicht nur die Rolle bestimmter Chloridtransporter für die lysosomale Ansäuerung ist fraglich (hier im Besonderen die von ClC-7), sondern sogar Chlorid überhaupt scheint als Gegenion entbehrlich zu sein. So wurde durch Ersatz der äußeren bzw. zytosolischen Chlorid-

Ionen gezeigt, dass der Chlorid-Einstrom für die ATP-abhängige lysosomale Azidifizierung nach transienter Aufhebung des pH-Gradienten sowohl *in vitro* als auch in kultivierten Makrophagen nicht benötigt wird (Abschnitt 2.3.2 in dieser Arbeit [140], und in einer parallelen Kollaboration [30]). Obwohl auch Chlorid-Einstrom die lysosomale Ansäuerung unterstützen kann [30], scheint der Ausstrom von einwertigen Kationen einen großen Teil des erforderlichen elektrischen Ausgleichs zum Protonen-Transport durch die V-ATPase bereitzustellen [30]. Die höhere Kationenleitfähigkeit von Lysosomen verglichen mit der der Endosomen [20] kann der unterschiedlichen Notwendigkeit von Chlorid in der Ansäuerung von Endosomen und Lysosomen zugrunde liegen. Erst kürzlich wurde berichtet, dass TMEM175 einen endosomal-lysosomalen Kalium-Kanal darstellt, der tatsächlich für einen normalen lysosomalen pH-Wert benötigt wird. Wahrscheinlich wirken in den meisten Fällen sowohl Chlorid-Einstrom als auch Kationen-Ausstrom als elektrischer Ausgleichstrom für die Ansäuerung von Lysosomen. Durch diese Kombination ließe sich auch ein osmotisches Anschwellen oder Schrumpfen dieser Organellen während der Azidifizierung vermindern [8, 153].

3.2.2 Die Relevanz des lysosomalen Cl^-/H^+ -Austausches

Da der Anionentransporter ClC-7/Ostm1 nicht essenziell für die Aufrechterhaltung des sauren lysosomalen pH ist, stellt sich die Frage, wieso sein Fehlen zu verlangsamttem Proteinabbau in Lysosomen (wie in Abschnitt 2.3.1 gezeigt, [139]), und zur neurodegenerativen, lysosomalen Speicherkrankheit und Osteopetrose [40, 44, 45, 148] führt. Für die auf frühen Endosomen lokalisierenden Homologen ClC-4 und -5 , und später für das spät-endosomale ClC-6 , wurde bereits gezeigt, dass sie Cl^-/H^+ -Austauscher sind [50, 51, 154]. Die Anwesenheit eines für ClC -Austauscher typischen konservierten Glutamats, des sogenannten *proton glutamate*, deutete bereits darauf hin, dass auch die anderen intrazellulären ClC s keine Chlorid-Kanäle, sondern Cl^-/H^+ -Austauscher darstellen. Allerdings verhinderte die rein intrazelluläre Lokalisation lange die elektrophysiologische Untersuchung von ClC-7/Ostm1 . Biophysikalische Untersuchungen an isolierten Lysosomen haben gezeigt, dass diese tatsächlich eine Cl^-/H^+ -Austausch-Aktivität besitzen [48]. Wie in Abschnitt 2.3.1 gezeigt, wurde dies in weiteren biophysikalischen Untersuchungen mit ClC-7 -defizienten Lysosomen bestätigt und es wurde gezeigt, dass ClC-7 dieser Austausch-Aktivität zugrunde liegt [140]. Erst durch die Identifizierung von Sortierungssignalen in der Aminosäure-Sequenz von ClC-7 (Abschnitt 2.1, [137]) ermöglichte eine Zelloberflächenexpression und somit die elektrophysiologische Untersuchung von ClC-7/Ostm1 (in Abschnitt 2.2 beschrieben, [138], und [146]). In der ersten elektrophysikalischen Untersuchung von ClC-7/Ostm1 hat sich gezeigt, dass es sich hierbei tatsächlich um einen Cl^-/H^+ -Austauscher handelt. Das langsame Steuerungsverhalten von ClC-7/Ostm1 erlaubte auch die Bestimmung des Umkehrpotenzials, anhand dessen eine Kopplungsstöchiometrie von ungefähr $2\text{Cl}^-:1\text{H}^+$ bestimmt werden konnte [138].

Der stark elektrogene Ionentransport eines $2\text{Cl}^-:1\text{H}^+$ -Austauschers könnte natürlich den benötigten Ladungsausgleich für die vesikuläre Ansäuerung liefern. Allerdings würde dabei eines von drei Protonen, die unter Energieverbrauch ins Lumen gepumpt werden, das

Kompartiment verlassen um den Transport von zwei Chlorid-Ionen zu ermöglichen. Wieso könnte also ein Cl^-/H^+ -Austauscher vorteilhaft gegenüber einem Chlorid-Kanal sein, bzw. könnte eine reine Chlorid-Leitfähigkeit den Cl^-/H^+ -Austauscher ersetzen? Eine Idee zumindest für das früh-endosomale CLC-5 war, dass es durch Austausch der hohen luminalen Chlorid-Konzentration unmittelbar nach der Abschnürung der endozytotischen Vesikel von der Plasmamembran direkt für die Azidifizierung der frühen Endosomen sorgen kann [51]. Allerdings widersprechen theoretische Überlegungen, nach denen aufgrund der Pufferkapazität der anfängliche Chlorid-Gradient nicht für eine effektive Ansäuerung ausreichen würde (Berechnungen dazu in [10]), diesem Mechanismus. Darüber hinaus spricht die Notwendigkeit von Chlorid-Transport für die endosomale Ansäuerung (im Gegensatz zur lysosomalen Ansäuerung, z.B. [20]) gegen eine signifikante Kationen-Leitfähigkeit, die für einen Ladungsausgleich bei stark elektrogener Azidifizierung durch den Cl^-/H^+ -Austausch benötigt würde [8].

In der Studie in Abschnitt 2.3.2 wurde ein mathematisches Modell der V-ATPase-abhängigen Azidifizierung eines minimalistischen Vesikels erstellt, das als Ionen-Leitfähigkeiten lediglich die V-ATPase, ein Protonen-Leck und einen Cl^-/H^+ -Austauscher, eine reine Chlorid-Leitfähigkeit oder keine Chlorid-Leitfähigkeit besitzt [140]. Nach den Berechnungen unterstützt ein Cl^-/H^+ -Austauscher sogar eine stärkere Ansäuerung als dies ein Chlorid-Kanal tun würde. Dabei akkumuliert insgesamt weniger positive Ladung; in dem simplen Modell weist das Innere nach Ansäuerung sogar ein negatives Potenzial gegenüber dem Zytosol auf (was allerdings nicht mit bislang publizierten Werten in Einklang liegt). Wegen der Kopplung des pH-Gradienten an den Chlorid-Gradienten wird durch die Austausch-Aktivität mehr Chlorid im Lysosom akkumuliert. In Analogie wurde für den Nitrat/Protonen-Austauscher AtClCa in Arabidopsis gezeigt, dass er der Speicherung von Nitrat in Vakuolen dient [155].

Um die Relevanz der lysosomalen Cl^-/H^+ -Austausch-Aktivität durch CLC-7/Ostm1 experimentell zu überprüfen, wurde gentechnologisch eine Knock-in-Mauslinie generiert, die CLC-7 mit der Punktmutation eines bestimmten Glutamats zu einem Alanin exprimiert (Abschnitt 2.3.2, [140]). Wie in Abschnitt 2.3.1 [138] für CLC-7/Ostm1 und bereits für die anderen etablierten intrazellulären CLC-Austauscher [51, 154, 156] gezeigt, hebt die Neutralisierung dieses konservierten, sogenannten *gating glutamate* sowohl die Auswärts-Gleichrichtung als auch die Kopplung des Anionentransports an den Protonen-Gegentransport auf. Sie wandelt den Austauscher also in eine reine Chlorid-Leitfähigkeit um [138, 140]. Wie in Abschnitt 2.3.2 gezeigt [140], wurde das mutierte CLC-7 zusammen mit der β -Untereinheit Ostm1 in der Knock-in-Maus in normaler Menge exprimiert, wies die normale lysosomale Lokalisation auf und funktionierte als Chlorid-Leitfähigkeit auf den Lysosomen (während für das Wildtyp-CLC-7 die Cl^-/H^+ -Austausch-Aktivität bestätigt wurde). Wie im CLC-7-Knock-out war die lysosomale Azidifizierung *in vitro* nicht beeinträchtigt und die Lysosomen wiesen in kultivierten Zellen einen normal sauren pH auf, jedoch zeigten beide Genotypen eine reduzierte Chlorid-Konzentration in den Lysosomen (wie durch die mathematische Simulation der Ansäuerung hervorgesagt). In einer parallelen Studie wurde eine Knock-in-Maus generiert,

die die äquivalente, den Anionen- vom Protontransport entkoppelnde Mutation in dem früh-endosomalenen ClC-5 trägt [53]. Bei aus der Niere isolierten frühen Endosomen ermöglichte auch diese ClC-5-Mutante die Ansäuerung, die (im Gegensatz zur lysosomalen Ansäuerung, wie weiter oben diskutiert) Chloridtransport als Ladungsausgleich benötigt. Beide Knock-in-Mausmodelle entwickelten größtenteils die gleichen Pathologien wie die entsprechenden Knock-out-Mäuse: eine neurodegenerative lysosomale Speicherkrankheit und eine (etwas mildere) Osteopetrose im Fall von ClC-7 (Abschnitt 2.3.2 [140]) und Nierendefekte aufgrund gestörter Endozytose bei ClC-5 [53].

Der Phänotyp der Knock-in-Mausmodelle zeigt also eindeutig, dass die Cl^-/H^+ -Austausch-Aktivität von Endosomen und Lysosomen eine Relevanz über die Regulierung des luminalen pH hinaus besitzt. Nach der mathematischen Simulation und für Lysosomen experimentell nachgewiesen, resultiert die Cl^-/H^+ -Austausch-Aktivität in einer höheren Chlorid-Akkumulation, als dies eine reine Chlorid-Leitfähigkeit tun würde (Abschnitt 2.3.2 [140]). Bislang wurden der luminalen Chlorid-Konzentration im endosomal-lysosomalen Weg nur wenige Funktionen (wie einen moderaten Effekt auf die Bindung von Eisen an Transferrin oder eine Regulation des Enzyms Cathepsin C) zugeschrieben, jedoch ist die verbleibende lysosomale Chlorid-Konzentration im ClC-7-Knock-out und -Knock-in wohl noch zu groß, um Einfluss auf diese Funktionen zu haben [8]. Ein anderer Parameter, der zumindest nach mathematischer Simulation (Abschnitt 2.3.2 [140] und in einem späteren, verbesserten Modell [153]) durch den Cl^-/H^+ -Austauscher verändert wird, ist die elektrische Spannung über die vesikuläre Membran, die während der Azidifizierung in Gegenwart eines Austauschers innen weniger positiv wird. Eine Änderung des Membranpotenzials wirkt sich auf die gesamte vesikuläre Ionenhomöostase aus. Somit kann sich der vesikuläre Cl^-/H^+ -Austausch durch seinen Einfluss auf die Konzentrationen von Natrium, Kalium und ganz besonders Calcium auf verschiedene Mechanismen des Transports und der Funktion im endosomal-lysosomalen Weg auswirken [8, 157].

3.3 Die langsame Steuerungskinetik von ClC-7/Ostm1: Biophysik und physiologische Rolle

Die erste elektrophysiologische Charakterisierung von ClC-7/Ostm1 (Abschnitt 2.2) hat gezeigt, dass die spannungsabhängige Aktivierung (in Analogie zu Ionenkanälen als *gating* bezeichnet) im Vergleich zu anderen intrazellulären CLCs sehr langsam ist [138]. Während bei den früh-endosomalenen ClC-4 und ClC-5 und dem spät-endosomalenen ClC-6 bei Aktivierung durch Spannungswechsel ein großer Teil des Maximalstroms bereits unverzögert vorliegt und das Maximum nach einigen Millisekunden erreicht ist [154, 156], ist dies bei ClC-7/Ostm1 innerhalb von Sekunden nicht der Fall [138]. Die ebenfalls langsame Deaktivierung von ClC-7/Ostm1 erlaubte eine genauere biophysikalische Charakterisierung mittels Analyse der *tail currents*. Diese ergab, dass die starke Rektifizierung von ClC-7/Ostm1 hauptsächlich durch die Aktivierung/Deaktivierung bestimmt wird, nicht durch den Transport durch den aktiven Austauscher *per se*. Weiterhin konnte das Umkehrpotenzial der *tail currents* gemessen

werden, aus dessen Änderungen bei Konzentrationsveränderungen der zu transportierenden Ionen (Chlorid und Protonen) sich die Kopplungsstöchiometrie von ca. $2\text{Cl}^-:1\text{H}^+$ bestimmen ließ [138].

Unter den Osteopetrose verursachenden humanen Mutationen, die elektrophysiologisch untersucht wurden (Abschnitt 2.2), waren mehrere, die die Aktivierungskinetik von ClC-7/Ostm1 beschleunigten [138]. Interessanterweise zeigte sich durch einen Vergleich mit der Sequenz und bekannten Struktur eines Algen-CLC [158], dass die betroffenen Aminosäuren an der möglichen Interaktionsfläche zwischen der im Zytosol gelegenen, carboxy-terminalen Domäne und der Transmembran-Region von ClC-7 liegen [138]. Dies lässt darauf schließen, dass diese intramolekulare Interaktion (die zumindest im Algen-CLC sehr stark ist [158]) an der Aktivierung/Deaktivierung beteiligt ist. In einer Folgestudie konnte gezeigt werden, dass der zytosolische Bereich für die Transport-Aktivität von ClC-7/Ostm1 notwendig ist, allerdings muss er nicht kovalent an den Transmembran-Bereich gebunden sein [146]. Co-expression von Mutanten, die sowohl eine beschleunigende als auch eine Ionen-transport inhibierende Mutation tragen, beschleunigte die Aktivierungskinetik von Wildtyp-ClC-7; und Co-expression einer nur transport-defizienten Mutante verlangsamte die Kinetik von Mutanten mit schneller Kinetik. Daraus lässt sich schließen, dass die langsame Aktivierung/Deaktivierung durch ein *common gate* bestimmt wird, das beide Untereinheiten des Dimers reguliert [146].

Es ist erstaunlich, dass Mutationen, die die Aktivierung/Deaktivierung von ClC-7/Ostm1 beschleunigen, eine ähnliche Pathologie verursachen wie Funktionsverlust-Mutationen (bei der Knock-out-Maus [40], bei der kürzlich beschriebenen Knock-in-Maus mit transport-defizientem ClC-7 [150] und bei humanen Mutationen, die Lokalisierungs- oder Ionen-transport-Defekte aufweisen [138, 159]). Dennoch wurde für verschiedene humane Osteopetrose verursachende Mutationen dieser Effekt beobachtet [138, 147]. Bis auf eine dieser ClC-7-Mutanten mit schneller Kinetik, die in Patienten-Fibroblasten auf Protein-Ebene nicht nachweisbar war [40], gibt es keine Informationen zur Expression und Stabilität des mutierten ClC-7. Wie in Abschnitt 2.3.3 gezeigt, konnte jedoch anhand von Gewebeuntersuchungen festgestellt werden, dass in osteopetrotischen Rindern, deren rezessiv vererbter Pathologie eine beschleunigende Mutation zugrunde lag, sowohl ClC-7 als auch Ostm1 in nahezu unveränderter Menge vorkamen und auch lysosomal lokalisierten [141]. Der maximale Strom und das Strom/Spannungs-Verhältnis waren bei dieser Mutante gegenüber Wildtyp-ClC-7 ebenfalls unverändert. Eine veränderte spannungsabhängige Aktivierungs- bzw. Deaktivierungs-Kinetik sollte nur bei schnellen Spannungssprüngen relevant sein. Solche abrupten Spannungsänderungen sind bei plötzlichem durch Signaltransduktion ausgelöstem Calcium-Ausstrom aus dem Lysosom (bei dem das Innere negativ und ClC-7 somit als Auswärts-Rektifizierer besonders transport-aktiv wird) möglich. Es ist also vorstellbar, dass eine zu schnelle Aktivierung von ClC-7 bei diesem Prozess pathogen wirkt. Interessanterweise sind in der Knock-in-Maus mit der Anionen-Transport von Protonen-Antiport entkoppelnden Mutation (Abschnitt 2.3.2, [140]) einige pathologische Phänotypen stärker ausgeprägt als in der Knock-in-Maus mit transport-defizientem ClC-7 [150]. Dies lässt darauf schließen, dass die

Chlorid-Ströme durch die entkoppelte Mutante schädlich sind. Bemerkenswerter Weise besitzen diese Ströme auch eine veränderte Spannungsabhängigkeit (nahezu linear) und weisen keine langsame Aktivierung-/Deaktivierungskinetik auf (Abschnitt 2.2, [138]). Wie auch bei den beschleunigenden Mutationen bei Mensch und Rind [138, 141, 147] könnte zu viel oder zu früher Chlorid-Transport pathogen sein.

3.4 LRRC8-Heteromere: eine neue Klasse von Anionentransportern

Die Identifikation von LRRC8-Heteromeren (mit LRRC8A als unabdingliche Untereinheit) in der in Abschnitt 2.4 beschriebene Studie [142] – und von LRRC8A in einer parallel erschienenen Studie [160] – als essenzielle Komponente des volumenaktivierten Anionenkanals, VRAC, bedeutet gleichzeitig die Entdeckung einer neuen Klasse von Anionen-Transportern. LRRC8s weisen keine speziellen Aminosäuresequenzen auf, die eine bioinformatische Identifikation als Chlorid-Kanäle ermöglicht hätte. LRRC8s besitzen eine schwache Sequenzhomologie mit Pannexinen [161]. Beide Proteinfamilien teilen die gleiche Topologie (vier Transmembran-Helices und Amino- und Carboxy-Terminus im Zytosol), wie auch die evolutionär nicht verwandten Connexine und *calcium homeostasis modulators* (CALHMs), die allesamt als Kanäle (wenn auch nicht unbedingt als Anionen-Kanäle) funktionieren [63]. Die Zusammensetzung der LRRC8-Heteromere – bis auf die Tatsache, dass sie die LRRC8A- und mindestens eine andere LRRC8-Untereinheit enthalten müssen – ist noch nicht bekannt, aber die schwache Sequenzhomologie und die ähnliche Topologie zu Pannexinen lässt vermuten, dass es sich auch um Hexamere handelt [142, 161].

Die Notwendigkeit von LRRC8s für schwellungsinduzierten Taurin-Ausstrom (Abschnitt 2.4, [142], und [160]), legt nahe, dass der von LRRC8-Heteromeren gebildete VRAC identisch mit dem *volume-sensitive organic osmolyte/anion channel* (VSOAC) ist. In Einklang mit dieser Deutung wurde berichtet, dass LRRC8D essenziell für die Aufnahme von Blasticidin-S ist [162], dass LRRC8A essentiell für die schwellungsinduzierte Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren aus Astrozyten ist [163] und dass LRRC8-Heteromere für einen wesentlichen Anteil der zellulären Aufnahme des Zytostatikums Cisplatin verantwortlich sind [164].

Sowohl die in Abschnitt 2.4 beschriebene Studie [142], als auch eine parallel erschienene Studie, die LRRC8A als essenziell für VRAC-Ströme identifiziert [160] liefern Hinweise, dass die LRRC8-Proteine tatsächlich den Hauptbestandteil des Kanals bilden. In letzterer Studie wird berichtet, dass die Mutationen eines Threonins in der ersten Transmembran-Helix zu Änderungen der Ionenselektivität führen, so wie im Fall von ClC-7 (und anderen CLCs) eine Serin-zu-Prolin-Mutation die Permeabilität von Nitrat gegenüber Chlorid erhöht (Abschnitt 2.2, [138]). Allerdings sind die beobachteten Veränderungen bei der Mutagenese zu unterschiedlich geladenen Aminosäuren überraschend gering, wenn dieses Threonin am Selektivitätsfilter beteiligt ist [63]. Die VRAC-Studie in dieser Arbeit (Abschnitt 2.4, [142]) zeigt, dass die spezielle Zusammensetzung aus LRRC8A und den Untereinheiten LRRC8B-LRRC8E die Kinetik der depolarisations-abhängigen Inaktivierung bestimmen. Weiterhin zeigt eine neuere Studie, dass die Kombinationen von LRRC8A mit unterschiedlichen weiteren Mitgliedern der

LRRC8-Familie unterschiedliche Verhältnisse zwischen Chlorid- und Taurin-Leitfähigkeit aufweisen, wobei die LRRC8D-Untereinheit besonders zur Taurin-Leitfähigkeit beiträgt [164]. Der starke Einfluss der Untereinheiten-Zusammensetzung auf diese kanal-intrinsischen Eigenschaften, Inaktivierungskinetik und Substratspezifität, deutet stark auf eine Beteiligung an der Porenbildung des Kanals hin.

Während die besondere spannungsabhängige Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik bei ClC-7/Ostm1 von physiologischer Bedeutung erscheint (Abschnitte 2.2, 2.3.3 und 3.3), ist dies bei der depolarisations-abhängigen Inaktivierung von LRRC8-Heteromeren wohl kaum der Fall. Da derart zytosolisch positive Potenziale, die zur zeitabhängigen Inaktivierung von VRAC führen, unter physiologischen Bedingungen nicht auftreten, sind die beobachteten Unterschiede in der Inaktivierungskinetik [65, 142] nur experimentell von Relevanz. Dabei ist die Beobachtung, dass die unterschiedliche Expression von LRRC8B-LRRC8E zelltypspezifische Unterschiede in der Inaktivierungskinetik erklären kann (Abschnitt 2.4, [142]), von großem Interesse. Sie zeigt bereits, dass durch die differentielle Zusammensetzung der Heteromere unterschiedliche VRACs gebildet werden können, die durchaus noch unbekannte, physiologisch relevante Besonderheiten haben können [63, 142]. Tatsächlich leiten LRRC8-Heteromere mit der LRRC8D-Untereinheit besonders das Osmolyt Taurin, die Zytostatika Cisplatin und Carboplatin [164] und wahrscheinlich Blastocidin-S [162]. Es bleibt zu sehen, ob auch für die anderen Mitglieder der LRRC8-Familie spezifische Substrate existieren. Eine weitere Möglichkeit für die Ausübung spezifischer physiologischer Aufgaben könnte durch unterschiedliche Aktivierungsmechanismen von Heteromeren unterschiedlicher Zusammenstellungen gegeben sein.

Wie eingangs beschrieben, weisen die meisten Anionen-Transporter keine besonders große Selektivität in der Anionen-Permeabilität auf. Für die unterschiedlichen VRACs mit verschiedenen LRRC8-Kombinationen ist aber doch erstaunlich, dass sie alle sehr ähnliche Selektivität zwischen z.B. Chlorid und Iodid besitzen [142], aber dennoch auch (möglicherweise zu unterschiedlichen Maßen, abhängig von der Zusammensetzung der Untereinheiten) viel größere Osmolyte leiten. Die differentiellen Substrat-Selektivitäten von VRACs mit bekannten LRRC8-Zusammensetzungen [164] bieten eine mögliche Erklärung, indem postuliert werden kann, dass unterschiedliche LRRC8-Untereinheiten unterschiedliche Poren bilden bzw. differentielle Auswirkungen auf den Selektivitätsfilter haben. Auch bei der Expression von nur einer weiteren Untereinheit mit LRRC8A ist unklar, ob nur eine Spezies von LRRC8-Heteromeren gebildet wird oder ob sich auch dann Komplexe mit unterschiedlichem Stöchiometrien formen. Letztendlich werden Studien zur Struktur dieser neuen Klasse von Anionen-Transportern benötigt, um die Selektivität auf molekularer Ebene zu verstehen. Die Identifizierung von LRRC8-Heteromeren als VRAC ermöglicht diese Arbeiten, sowie die Erforschung der Zellbiologie und Physiologie von VRAC auch mittels molekularbiologischer und zellbiochemischer Methoden.

3.5 Ausblick

Die plasmamembran-lokalisierte Mutante des lysosomalen Cl^-/H^+ -Austauschers CLC-7/Ostm1 erlaubt weitergehende elektrophysiologische Untersuchungen, u.a. zur strukturellen Grundlage der für die intrazellulären CLCs besonderen, langsamen Steuerungskinetik. Noch stellt sich allerdings die Frage, ob die beobachteten Eigenschaften in der nativen Umgebung, auf Lysosomen, tatsächlich genauso gegeben sind wie in der Plasmamembran. Ein entscheidender Fragenkomplex zur Physiologie und zum Pathomechanismus der lysosomalen Speicherkrankheit und Osteopetrose ist, welchen Einfluss der Cl^-/H^+ -Austausch und die langsame Kinetik von CLC-7/Ostm1 auf die gesamte lysosomale Ionenhomöostase hat und mit welchem Mechanismus sich dies auf welche Prozesse im endozytotischen Weg auswirkt.

Die molekulare Identifizierung des VRAC bietet die Grundlage zur Erforschung vieler Fragen zum Anionen- und Osmolyt-Transport, speziell in der zellulären Volumenregulation. Bei LRRC8-Heteromeren handelt es sich um eine neue Klasse von Anionen-Transportern, bei denen sich viele Fragen zur Struktur-Funktion stellen, z.B. zur Untereinheiten-Stöchiometrie, Porenbildung und Selektivität. Eine Hauptfrage aus zellbiochemischer Sicht ist die nach dem unbekanntem Aktivierungsmechanismus des VRAC und der zugrunde liegenden Signaltransduktion. Schließlich können nun die postulierten physiologischen Rollen des VRAC bzw. der verschiedenen Kombinationen der LRRC8-Heteromere überprüft und möglicherweise bislang unbekannt Funktionen entdeckt werden.

4. Zusammenfassung

Chloridtransport über biologische Membranen spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl zellphysiologischer Prozesse. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufklärung entscheidender zellulärer und subzellulärer Anionentransport-Prozesse, die wichtige Rollen in der Physiologie intrazellulärer Organellen, im Besonderen des Lysosoms, bzw. in der zellulären Volumenregulation spielen, beigetragen.

Die immense physiologische Bedeutung endosomaler bzw. lysosomaler Chlorid-Transporter wird durch die Pathologien in Tiermodellen und humanen Patienten bei Störung entsprechender Transportprozesse deutlich. Die intrazellulären Mitglieder der CLC-Familie von Anionentransportern lokalisieren auf den Kompartimenten des endozytotischen Weges und ihre Dysfunktion führt zu Nierenkrankheiten (beim früh-endosomalen CLC-5), Neurodegeneration (beim spät-endosomalen CLC-3) bzw. Osteopetrose und lysosomaler Speicherkrankheit (beim lysosomalen CLC-7). Um den Mechanismus der subzellulären Lokalisierung dieser intrazellulären Chlorid-Transporter zu verstehen, wurden mit systematischen, biochemischen Interaktionstests und Mutagenese-Ansätzen erfolgreich nach Sortierungsmotiven der CLCs gesucht. Die Identifizierung solcher Motive in CLC-7 ermöglichte dann die elektrophysiologische Untersuchung dieses lysosomalen Anionentransporters. Dabei wurde festgestellt, dass CLC-7 zusammen mit seiner β -Untereinheit Ostm1 eine Chlorid/Proton-Austausch-Aktivität besitzt, die eine unter den intrazellulären CLCs einzigartige, auffällig langsame spannungsabhängige Aktivierung/Deaktivierung aufweist.

Die Rolle von CLC-7 und seiner biophysikalischen Eigenschaften wurde anhand von Tiermodellen untersucht. Mit gewebsspezifischen Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass CLC-7 eine Rolle im lysosomalen Proteinabbau spielt und dass die lysosomale Pathologie bei Fehlen des Transporters zellautonom ist und wahrscheinlich durch einen *trafficking*-Defekt zustande kommt. Die lysosomale Pathologie und Osteopetrose einer Knock-in-Maus, in der CLC-7 durch eine Punktmutation in eine reine Chloridleitfähigkeit umgewandelt war, verdeutlichte beeindruckend die Wichtigkeit der lysosomalen Chlorid/Proton-Austauschaktivität. Diese wird nicht für der Ansäuerung der Lysosomen benötigt, die – wie in einer parallelen Studie gezeigt – durch einen Kationen-Ausstrom unterstützt werden kann. Stattdessen führt sie zur Anreicherung luminalen Chlorids und senkt wahrscheinlich das Transmembranpotential der Lysosomen. Die Analyse von osteopetrotischen Rindern mit einer die Aktivierungskinetik von CLC-7 beschleunigenden Mutation (ein Effekt, der auch bei humanen Osteopetrose verursachenden Mutationen festgestellt wurde) verdeutlichte die physiologische Relevanz der Langsamkeit der Aktivierung/Deaktivierung von CLC-7.

Schließlich wurde in einer bahnbrechenden Studie LRRC8A mittels eines genomweiten siRNA-Screens als essenzielle Komponente des seit Jahrzehnten beschriebenen, aber molekular unbekanntes volumenregulierten Anionenkanals VRAC identifiziert. LRRC8A bildet Heteromere mit den anderen LRRC8-Mitgliedern (LRRC8B-E), deren Zusammensetzung biophysikalische Eigenschaften des VRAC bestimmt und zellspezifische Unterschiede erklären kann. Es wurde gezeigt, dass LRRC8/VRAC, das eine neue Klasse von Anionenkanälen darstellt, auch organische Osmolyte leiten kann und tatsächlich an der Volumenregulation beteiligt ist.

5. Literaturangaben

5.1 Eigene Veröffentlichungen

Im Folgenden sind in chronologischer Reihenfolge die eigenen Veröffentlichungen mit Relevanz für diese Habilitationsschrift aufgelistet. Die in Kapitel 2 (Eigene Arbeiten) aufgeführten Arbeiten sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Originalarbeiten:

Wartosch L, Fuhrmann JC, Schweizer M, Stauber T, Jentsch TJ (2009). Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *FASEB J*, 23: 4056-68. [139]

Steinberg BE, Huynh KK, Brodovitch A, Jabs S, Stauber T, Jentsch TJ, Grinstein S (2010). A cation counterflux supports lysosomal acidification. *J Cell Biol*, 189: 1171-86. [30]

Weinert S, Jabs S, Supanchart C, Schweizer M, Gimber N, Richter M, Rademann J, Stauber T, Kornak U, Jentsch TJ (2010). Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation. *Science*, 328: 1401-03. [140]

Neagoe I, Stauber T, Fidzinski P, Bergsdorf EY, Jentsch TJ (2010). The late endosomal CIC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J Biol Chem*, 285: 21689-97. [154]

Schulz P, Werner J, Stauber T, Henriksen K, Fendler K (2010). The G215R mutation in the Cl⁻/H⁺-antiporter CIC-7 found in ADO II osteopetrosis does not abolish function but causes a severe trafficking defect. *PLoS One*, 5: e12585. [159]

Stauber T, Jentsch TJ (2010). Sorting motifs of the endosomal/lysosomal CLC chloride transporters. *J Biol Chem*, 285:34537-48. [137]

Pressey SN, O'Donnell KJ, Stauber T, Fuhrmann JC, Tynnela J, Jentsch TJ, Cooper JD (2010). Distinct neuropathologic phenotypes after disrupting the chloride transport proteins CIC-6 or CIC-7/Ostm1. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69: 1228-46. [148]

Leisle L, Ludwig CF, Wagner FA, Jentsch TJ, Stauber T (2011). CIC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl⁻/1H⁺-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO J*, 30: 2140-52. [138]

Ludwig CF, Ullrich F, Leisle L, Stauber T, Jentsch TJ (2013). Common gating of both CLC transporter subunits underlies voltage-dependent activation of the 2Cl⁻/1H⁺ exchanger CIC-7/Ostm1. *J Biol Chem*, 288: 28611-19. [146]

Sartelet A*, Stauber T*, Coppieters W, Ludwig CF, Fasquelle C, Druet T, Zhang Z, Ahariz N, Cambisano N, Jentsch TJ, Charlier C (2014). A missense mutation accelerating the gating of the lysosomal Cl⁻/H⁺-exchanger CIC-7/Ostm1 causes osteopetrosis with gingival hamartomas in cattle. *Dis Model Mech*, 7: 119-28. [141]

Barvencik F, Kurth I, Koehne T, Stauber T, Zustin J, Tsiakas K, Ludwig CF, Beil FT, Pestka JM, Hahn M, Santer R, Supanchart C, Kornak U, Del Fattore A, Jentsch TJ, Teti A, Schulz A, Schinke T, Amling M (2014). CLCN7 and TCIRG1 mutations differentially affect bone matrix mineralization in osteopetrotic individuals. *J Bone Miner Res*, 29: 982-91. [147]

Voss FK, Ullrich F, Münch J, Lazarow K, Lutter D, Mah N, Andrade-Navarro MA, von Kries JP, Stauber T*, Jentsch TJ* (2014). Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*, 344: 634-38. [142]

Planells-Cases R, Lutter D, Guyader C, Gerhards NM, Ullrich F, Elger DA, Kucukosmanoglu A, Xu G, Voss FK, Reincke SM, Stauber T, Blomen VA, Vis DJ, Wessels LF, Brummelkamp TR, Borst P, Rottenberg S, Jentsch TJ (2015). Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs. *EMBO J*, electr. prepub [164]

Übersichtsarbeiten und Editorials:

Wartosch L, Stauber T (2010). A role for chloride transport in lysosomal protein degradation. *Autophagy*, 6: 158-59. [149]

Stauber T, Weinert S, Jentsch TJ (2012). Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. *Compr Physiol*, 2: 1701-44. [10]

Stauber T, Jentsch TJ (2013). Chloride in vesicular trafficking and function. *Annu Rev Physiol*, 75: 453-77. [8]

Stauber T, Horn D, Kornak U (2013). Monogene Ionenkanalerkrankungen des Knochens. *Med Genetik*, 25: 493-500. [57]

Stauber T (2015). The volume-regulated anion channel is formed by LRRC8 heteromers - molecular identification and roles in membrane transport and physiology. *Biol Chem*, 396: 975-90. [63]

5.2 Zitierte Literatur

1. Duran C, Thompson CH, Xiao Q, and Hartzell HC (2010). Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable. *Annu Rev Physiol*, 72: 95-121.
2. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, and Zdebik AA (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*, 82: 503-68.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al* (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245: 1066-73.
4. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, *et al* (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*, 253: 202-5.
5. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, *et al* (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature*, 362: 160-4.
6. Jentsch TJ, Steinmeyer K, and Schwarz G (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 348: 510-14.
7. Steinmeyer K, Ortland C, and Jentsch TJ (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature*, 354: 301-04.
8. Stauber T, and Jentsch TJ (2013). Chloride in vesicular trafficking and function. *Annu Rev Physiol*, 75: 453-77.

9. Planells-Cases R, and Jentsch TJ (2009). Chloride channelopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1792: 173-89.
10. Stauber T, Weinert S, and Jentsch TJ (2012). Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. *Compr Physiol*, 2: 1701-44.
11. Mellman I, Fuchs R, and Helenius A (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem*, 55: 663-700.
12. Marshansky V, and Futai M (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol*, 20: 415-26.
13. Clague MJ, Urbe S, Aniento F, and Gruenberg J (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem*, 269: 21-24.
14. van Weert AW, Dunn KW, Gueze HJ, *et al* (1995). Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol*, 130: 821-34.
15. Falguieres T, Luyet PP, Bissig C, *et al* (2008). In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol Biol Cell*, 19: 4942-55.
16. Zeuzem S, Feick P, Zimmermann P, *et al* (1992). Intravesicular acidification correlates with binding of ADP-ribosylation factor to microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 6619-23.
17. Maranda B, Brown D, Bourgoin S, *et al* (2001). Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem*, 276: 18540-50.
18. Aniento F, Gu F, Parton RG, and Gruenberg J (1996). An endosomal β COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol*, 133: 29-41.
19. Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, *et al* (2006). V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol*, 8: 124-36.
20. Van Dyke RW (1993). Acidification of rat liver lysosomes: quantitation and comparison with endosomes. *Am J Physiol*, 265: C901-C17.
21. Grabe M, and Oster G (2001). Regulation of organelle acidity. *J Gen Physiol*, 117: 329-44.
22. Mindell JA (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 74: 69-86.
23. Sonawane ND, Thiagarajah JR, and Verkman AS (2002). Chloride concentration in endosomes measured using a ratioable fluorescent Cl⁻ indicator: evidence for chloride accumulation during acidification. *J Biol Chem*, 277: 5506-13.
24. Faundez V, and Hartzell HC (2004). Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway. *Sci STKE*, 2004: re8.
25. Saito M, Hanson PI, and Schlesinger P (2007). Luminal chloride-dependent activation of endosome calcium channels: patch clamp study of enlarged endosomes. *J Biol Chem*, 282: 27327-33.
26. Edwards JC, and Kahl CR (2010). Chloride channels of intracellular membranes. *FEBS Lett*, 584: 2102-11.
27. Barasch J, Kiss B, Prince A, *et al* (1991). Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, 352: 70-3.
28. Di A, Brown ME, Deriy LV, *et al* (2006). CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol*, 8: 933-44.

29. Teichgräber V, Ulrich M, Endlich N, *et al* (2008). Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med*, 14: 382-91.
30. Steinberg BE, Huynh KK, Brodovitch A, *et al* (2010). A cation counterflux supports lysosomal acidification. *J Cell Biol*, 189: 1171-86.
31. Haggie PM, and Verkman AS (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent phagosomal acidification in macrophages. *J Biol Chem*, 282: 31422-8.
32. Haggie PM, and Verkman AS (2009). Unimpaired lysosomal acidification in respiratory epithelial cells in cystic fibrosis. *J Biol Chem*, 284: 7681-6.
33. Barriere H, Bagdany M, Bossard F, *et al* (2009). Revisiting the Role of CFTR and Counterion Permeability in the pH Regulation of Endocytic Organelles. *Mol Biol Cell*: 3125-41.
34. DiCiccio JE, and Steinberg BE (2011). Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *J Gen Physiol*, 137: 385-90.
35. Suzuki T, Rai T, Hayama A, *et al* (2006). Intracellular localization of ClC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J Cell Physiol*, 206: 792-98.
36. Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M, *et al* (1995). Cloning and functional expression of rat ClC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem*, 270: 31172-77.
37. Günther W, Lüchow A, Cluzeaud F, *et al* (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 8075-80.
38. Poët M, Kornak U, Schweizer M, *et al* (2006). Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein ClC-6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 13854-9.
39. Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, *et al* (2001). Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron*, 29: 185-96.
40. Kornak U, Kasper D, Bösl MR, *et al* (2001). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104: 205-15.
41. Piwon N, Günther W, Schwake M, *et al* (2000). ClC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, 408: 369-73.
42. Günther W, Piwon N, and Jentsch TJ (2003). The ClC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflügers Arch*, 445: 456-62.
43. Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, *et al* (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, 379: 445-49.
44. Kasper D, Planells-Cases R, Fuhrmann JC, *et al* (2005). Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *EMBO J*, 24: 1079-91.
45. Lange PF, Wartosch L, Jentsch TJ, and Fuhrmann JC (2006). ClC-7 requires Ostm1 as a β -subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature*, 440: 220-23.
46. Hara-Chikuma M, Wang Y, Guggino SE, *et al* (2005). Impaired acidification in early endosomes of ClC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun*, 329: 941-46.
47. Hara-Chikuma M, Yang B, Sonawane ND, *et al* (2005). ClC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J Biol Chem*, 280: 1241-47.
48. Graves AR, Curran PK, Smith CL, and Mindell JA (2008). The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature*, 453: 788-92.

49. Accardi A, and Miller C (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature*, 427: 803-07.
50. Picollo A, and Pusch M (2005). Chloride / proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature*, 436: 420-23.
51. Scheel O, Zdebik A, Lourdel S, and Jentsch TJ (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature*, 436: 424-27.
52. Smith AJ, and Lippiat JD (2010). Direct endosomal acidification by the outwardly rectifying ClC-5 Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Physiol*, 588: 2033-45.
53. Novarino G, Weinert S, Rickheit G, and Jentsch TJ (2010). Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science*, 328: 1398-401.
54. Teitelbaum SL (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289: 1504-8.
55. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, *et al* (2013). Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol*, 9: 522-36.
56. Frattini A, Pangrazio A, Susani L, *et al* (2003). Chloride channel *ClCN7* mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J Bone Miner Res*, 18: 1740-47.
57. Stauber T, Horn D, and Kornak U (2013). Monogene Ionenkanalerkrankungen des Knochens. *Med Genetik*, 25: 493-500.
58. Cleiren E, Benichou O, Van Hul E, *et al* (2001). Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the *ClCN7* chloride channel gene. *Hum Mol Genet*, 10: 2861-67.
59. Grüneberg H (1935). A New Sub-Lethal Colour Mutation in the House Mouse. *Proc R Soc Lond B*, 118: 321-42.
60. Chalhoub N, Benachenhou N, Rajapurohitam V, *et al* (2003). Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat Med*, 9: 399-406.
61. Hoffmann EK, Lambert IH, and Pedersen SF (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*, 89: 193-277.
62. Lang F (2007). Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr*, 26: 613S-23S.
63. Stauber T (2015). The volume-regulated anion channel is formed by LRRC8 heteromers - molecular identification and roles in membrane transport and physiology. *Biol Chem*, 396: 975-90.
64. Wehner F (2006). Cell volume-regulated cation channels. *Contrib Nephrol*, 152: 25-53.
65. Nilius B, Eggermont J, Voets T, *et al* (1997). Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 68: 69-119.
66. Grinstein S, Clarke CA, Dupre A, and Rothstein A (1982). Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol*, 80: 801-23.
67. Hoffmann EK (1978). Regulation of cell volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. *Alfred Benzon Symp*, XI: 397-417.
68. Cahalan MD, and Lewis RS (1988). Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. *Soc Gen Physiol Ser*, 43: 281-301.
69. Hazama A, and Okada Y (1988). Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol*, 402: 687-702.
70. Nilius B, Sehrer J, Viana F, *et al* (1994). Volume-activated Cl⁻ currents in different mammalian non-excitabile cell types. *Pflügers Arch*, 428: 364-71.

71. Okada Y (1997). Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol*, 273: C755-89.
72. Strange K, Emma F, and Jackson PS (1996). Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol*, 270: C711-30.
73. Okada Y, Sato K, and Numata T (2009). Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *J Physiol*, 587: 2141-49.
74. Akita T, and Okada Y (2014). Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. *Neuroscience*, 275C: 211-31.
75. Mongin AA, and Orlov SN (2001). Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. *Pathophysiology*, 8: 77-88.
76. Burow P, Klapperstück M, and Markwardt F (2015). Activation of ATP secretion via volume-regulated anion channels by sphingosine-1-phosphate in RAW macrophages. *Pflügers Arch*, 467: 1215-26.
77. Kirk K, Ellory JC, and Young JD (1992). Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J Biol Chem*, 267: 23475-8.
78. Jackson PS, and Strange K (1993). Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol*, 265: C1489-500.
79. Shennan DB (2008). Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion-exchangers and other swelling-activated transport pathways. *Cell Physiol Biochem*, 21: 15-28.
80. Hoffmann EK, Holm NB, and Lambert IH (2014). Functions of volume-sensitive and calcium-activated chloride channels. *IUBMB Life*, 66: 257-67.
81. Pedersen SF, Hoffmann EK, and Novak I (2013). Cell volume regulation in epithelial physiology and cancer. *Front Physiol*, 4: 233.
82. Hoffmann EK, Schettino T, and Marshall WS (2007). The role of volume-sensitive ion transport systems in regulation of epithelial transport. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 148: 29-43.
83. Best L, Brown PD, Sener A, and Malaisse WJ (2010). Electrical activity in pancreatic islet cells: The VRAC hypothesis. *Islets*, 2: 59-64.
84. Catalán MA, Kondo Y, Peña-Münzenmayer G, et al (2015). A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific Tmem16A gene ablation in the adult mouse salivary gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: 2263-8.
85. Lang F, Shumilina E, Ritter M, et al (2006). Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib Nephrol*, 152: 142-60.
86. Klausen TK, Bergdahl A, Hougaard C, et al (2007). Cell cycle-dependent activity of the volume- and Ca²⁺-activated anion currents in Ehrlich letre ascites cells. *J Cell Physiol*, 210: 831-42.
87. Shen MR, Droogmans G, Eggermont J, et al (2000). Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J Physiol*, 529 Pt 2: 385-94.
88. Doroshenko P, Sabanov V, and Doroshenko N (2001). Cell cycle-related changes in regulatory volume decrease and volume-sensitive chloride conductance in mouse fibroblasts. *J Cell Physiol*, 187: 65-72.
89. Schlichter LC, Sakellaropoulos G, Ballyk B, et al (1996). Properties of K⁺ and Cl⁻ channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells. *Glia*, 17: 225-36.

90. Schumacher PA, Sakellaropoulos G, Phipps DJ, and Schlichter LC (1995). Small-conductance chloride channels in human peripheral T lymphocytes. *J Membr Biol*, 145: 217-32.
91. Voets T, Szucs G, Droogmans G, and Nilius B (1995). Blockers of volume-activated Cl⁻ currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflügers Arch*, 431: 132-4.
92. Nilius B, Prenen J, Kamouchi M, *et al* (1997). Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca²⁺- and volume-activated Cl⁻ channels in macrovascular endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 121: 547-55.
93. Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, and Stock C (2012). Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev*, 92: 1865-913.
94. Lang F, and Hoffmann EK (2012). Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr Physiol*, 2: 2037-61.
95. Shimizu T, Numata T, and Okada Y (2004). A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl⁻ channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 6770-3.
96. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, *et al* (2006). Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol*, 209: 21-9.
97. Hasegawa Y, Shimizu T, Takahashi N, and Okada Y (2012). The Apoptotic Volume Decrease Is an Upstream Event of MAP Kinase Activation during Staurosporine-Induced Apoptosis in HeLa Cells. *Int J Mol Sci*, 13: 9363-79.
98. Poulsen KA, Andersen EC, Hansen CF, *et al* (2010). Deregulation of apoptotic volume decrease and ionic movements in multidrug-resistant tumor cells: role of chloride channels. *Am J Physiol*, 298: C14-25.
99. Cai S, Zhang T, Zhang D, *et al* (2015). Volume-sensitive chloride channels are involved in cisplatin treatment of osteosarcoma. *Mol Med Rep*, 11: 2465-70.
100. Shimizu T, Ohtake H, Fujii T, *et al* (2015). Volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channels contribute to butyrate-triggered apoptosis of murine colonic epithelial MCE301 cells. *J Physiol Sci*, 65: 151-7.
101. Lee EL, Shimizu T, Ise T, *et al* (2007). Impaired activity of volume-sensitive Cl⁻ channel is involved in cisplatin resistance of cancer cells. *J Cell Physiol*, 211: 513-21.
102. Min XJ, Li H, Hou SC, *et al* (2011). Dysfunction of volume-sensitive chloride channels contributes to cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells. *Exp Biol Med*, 236: 483-91.
103. Sørensen BH, Thorsteinsdottir UA, and Lambert IH (2014). Acquired cisplatin resistance in human ovarian A2780 cancer cells correlates with shift in taurine homeostasis and ability to volume regulate. *Am J Physiol*, 307: C1071-80.
104. Kimelberg HK (2005). Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia*, 50: 389-97.
105. Roy G (1995). Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells. *J Membr Biol*, 147: 35-44.
106. Liu HT, Tashmukhamedov BA, Inoue H, *et al* (2006). Roles of two types of anion channels in glutamate release from mouse astrocytes under ischemic or osmotic stress. *Glia*, 54: 343-57.
107. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, *et al* (1990). Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*, 10: 1583-91.
108. Harrigan TJ, Abdullaev IF, Jourd'heuil D, and Mongin AA (2008). Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. *J Neurochem*, 106: 2449-62.

109. Liu HT, Akita T, Shimizu T, *et al* (2009). Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J Physiol*, 587: 2197-209.
110. Akita T, Fedorovich SV, and Okada Y (2011). Ca²⁺ nanodomain-mediated component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying anion current triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 28: 1181-90.
111. Franco R, Panayiotidis MI, and de la Paz LD (2008). Autocrine signaling involved in cell volume regulation: the role of released transmitters and plasma membrane receptors. *J Cell Physiol*, 216: 14-28.
112. Haydon PG, and Carmignoto G (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*, 86: 1009-31.
113. Feustel PJ, Jin Y, and Kimelberg HK (2004). Volume-regulated anion channels are the predominant contributors to release of excitatory amino acids in the ischemic cortical penumbra. *Stroke*, 35: 1164-8.
114. Benfenati V, Caprini M, Nicchia GP, *et al* (2009). Carbenoxolone inhibits volume-regulated anion conductance in cultured rat cortical astroglia. *Channels*, 3: 323-36.
115. Zhang Y, Zhang H, Feustel PJ, and Kimelberg HK (2008). DCPIB, a specific inhibitor of volume regulated anion channels (VRACs), reduces infarct size in MCAo and the release of glutamate in the ischemic cortical penumbra. *Exp Neurol*, 210: 514-20.
116. Inoue H, Ohtaki H, Nakamachi T, *et al* (2007). Anion channel blockers attenuate delayed neuronal cell death induced by transient forebrain ischemia. *J Neurosci Res*, 85: 1427-35.
117. Koyama T, Oike M, and Ito Y (2001). Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol*, 532: 759-69.
118. Hisadome K, Koyama T, Kimura C, *et al* (2002). Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol*, 119: 511-20.
119. Burnstock G (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 575-90.
120. Idzko M, Ferrari D, and Eltzschig HK (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509: 310-7.
121. Lohman AW, Billaud M, and Isakson BE (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc Res*, 95: 269-80.
122. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, *et al* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461: 282-6.
123. Lohman AW, and Isakson BE (2014). Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett*, 588: 1379-88.
124. Qiu F, Wang J, and Dahl G (2012). Alanine substitution scanning of pannexin1 reveals amino acid residues mediating ATP sensitivity. *Purinergic Signal*, 8: 81-90.
125. Tsumura T, Oiki S, Ueda S, *et al* (1996). Sensitivity of volume-sensitive Cl⁻ conductance in human epithelial cells to extracellular nucleotides. *Am J Physiol*, 271: C1872-8.
126. Jackson PS, and Strange K (1995). Characterization of the voltage-dependent properties of a volume-sensitive anion conductance. *J Gen Physiol*, 105: 661-76.
127. Pedersen SF, Klausen TK, and Nilius B (2015). The identification of a volume-regulated anion channel: an amazing Odyssey. *Acta Physiol (Oxf)*, 213: 868-81.

128. Goldstein L, and Brill SR (1991). Volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band 3 involvement. *Am J Physiol*, 260: R1014-20.
129. Valverde MA, Diaz M, Sepúlveda FV, *et al* (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug- resistance P-glycoprotein. *Nature*, 355: 830-3.
130. Paulmichl M, Li Y, Wickman K, *et al* (1992). New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature*, 356: 238-41.
131. Pu WT, Krapivinsky GB, Krapivinsky L, and Clapham DE (1999). pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins. *Mol Cell Biol*, 19: 4113-20.
132. Duan D, Winter C, Cowley S, *et al* (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature*, 390: 417-21.
133. Gründer S, Thiemann A, Pusch M, and Jentsch TJ (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature*, 360: 759-62.
134. Thiemann A, Gründer S, Pusch M, and Jentsch TJ (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature*, 356: 57-60.
135. Chien LT, and Hartzell HC (2007). *Drosophila* bestrophin-1 chloride current is dually regulated by calcium and cell volume. *J Gen Physiol*, 130: 513-24.
136. Stotz SC, and Clapham DE (2012). Anion-sensitive fluorophore identifies the *Drosophila* swell-activated chloride channel in a genome-wide RNA interference screen. *PLoS One*, 7: e46865.
137. Stauber T, and Jentsch TJ (2010). Sorting motifs of the endosomal/lysosomal CLC chloride transporters. *J Biol Chem*, 285: 34537-48.
138. Leisle L, Ludwig CF, Wagner FA, *et al* (2011). CIC-7 is a slowly voltage-gated $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ -exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *EMBO J*, 30: 2140-52.
139. Wartosch L, Fuhrmann JC, Schweizer M, *et al* (2009). Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *FASEB J*, 23: 4056-68.
140. Weinert S, Jabs S, Supancharit C, *et al* (2010). Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H^+ -driven lysosomal Cl^- accumulation. *Science*, 328: 1401-3.
141. Sartelet A, Stauber T, Coppieters W, *et al* (2014). A missense mutation accelerating the gating of the lysosomal Cl^-/H^+ -exchanger CIC-7/Ostm1 causes osteopetrosis with gingival hamartomas in cattle. *Dis Model Mech*, 7: 119-28.
142. Voss FK, Ullrich F, Münch J, *et al* (2014). Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*, 344: 634-8.
143. Li X, Wang T, Zhao Z, and Weinman SA (2002). The CIC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells. *Am J Physiol*, 282: C1483-C91.
144. Dickerson LW, Bonthius DJ, Schutte BC, *et al* (2002). Altered GABAergic function accompanies hippocampal degeneration in mice lacking CIC-3 voltage-gated chloride channels. *Brain Res*, 958: 227-50.
145. Yoshikawa M, Uchida S, Ezaki J, *et al* (2002). CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Cells*, 7: 597-605.
146. Ludwig CF, Ullrich F, Leisle L, *et al* (2013). Common gating of both CLC transporter subunits underlies voltage-dependent activation of the $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ exchanger CIC-7/Ostm1. *J Biol Chem*, 288: 28611-9.
147. Barvencik F, Kurth I, Koehne T, *et al* (2014). CLCN7 and TCIRG1 mutations differentially affect bone matrix mineralization in osteopetrotic individuals. *J Bone Miner Res*, 29: 982-91.

148. Pressey SN, O'Donnell KJ, Stauber T, *et al* (2010). Distinct neuropathologic phenotypes after disrupting the chloride transport proteins CIC-6 or CIC-7/Ostm1. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69: 1228-46.
149. Wartosch L, and Stauber T (2010). A role for chloride transport in lysosomal protein degradation. *Autophagy*, 6: 158-9.
150. Weinert S, Jabs S, Hohensee S, *et al* (2014). Transport activity and presence of CIC-7/Ostm1 complex account for different cellular functions. *EMBO Rep*, 15: 784-91.
151. Sonawane ND, and Verkman AS (2003). Determinants of [Cl⁻] in recycling and late endosomes and Golgi complex measured using fluorescent ligands. *J Cell Biol*, 160: 1129-38.
152. Majumdar A, Capetillo-Zarate E, Cruz D, *et al* (2011). Degradation of Alzheimer's amyloid fibrils by microglia requires delivery of CIC-7 to lysosomes. *Mol Biol Cell*, 22.
153. Ishida Y, Nayak S, Mindell JA, and Grabe M (2013). A model of lysosomal pH regulation. *J Gen Physiol*, 141: 705-20.
154. Neagoe I, Stauber T, Fidzinski P, *et al* (2010). The late endosomal CIC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J Biol Chem*, 285: 21689-97.
155. De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, *et al* (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 442: 939-42.
156. Friedrich T, Breiderhoff T, and Jentsch TJ (1999). Mutational analysis demonstrates that CIC-4 and CIC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem*, 274: 896-902.
157. Scott CC, and Gruenberg J (2011). Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *Bioessays*, 33: 103-10.
158. Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, and MacKinnon R (2010). Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science*, 330: 635-41.
159. Schulz P, Werner J, Stauber T, *et al* (2010). The G215R mutation in the Cl⁻/H⁺-antiporter CIC-7 found in ADO II osteopetrosis does not abolish function but causes a severe trafficking defect. *PLoS One*, 5: e12585.
160. Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, *et al* (2014). SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell*, 157: 447-58.
161. Abascal F, and Zardoya R (2012). LRRC8 proteins share a common ancestor with pannexins, and may form hexameric channels involved in cell-cell communication. *Bioessays*, 34: 551-60.
162. Lee CC, Freinkman E, Sabatini DM, and Ploegh HL (2014). The protein synthesis inhibitor blasticidin s enters mammalian cells via leucine-rich repeat-containing protein 8D. *J Biol Chem*, 289: 17124-31.
163. Hyzinski-García MC, Rudkouskaya A, and Mongin AA (2014). LRRC8A protein is indispensable for swelling-activated and ATP-induced release of excitatory amino acids in rat astrocytes. *J Physiol*, 592: 4855-62.
164. Planells-Cases R, Lutter D, Guyader C, *et al* (2015). Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs. *EMBO J*, electr. prepub.

Danksagung

An vorderster Stelle gilt mein Dank Prof. Thomas Jentsch, in dessen Abteilung für Physiologie und Pathologie des Ionentransports die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde. Ohne seine Unterstützung, seine wissenschaftliche Einsicht und die Infrastruktur, die die Abteilung bietet, wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den Mitgliedern der AG Jentsch, die mit mir über die Jahre an den verschiedenen Projekten zusammen gearbeitet haben. Dazu zählen Lilia Leisle und Carmen Ludwig mit ihrer elektrophysiologischen Charakterisierung von CIC-7/Ostm1, Lena Wartosch und Jens Fuhrmann mit der Untersuchung des CIC-7-Phänotyps und der vergrößerten Lysosomen, Stefanie Weinert mit der Knock-in-Maus und Sabrina Jabs mit den Messungen lysosomaler Ionenkonzentrationen. Großer Dank gilt meinen Mitstreitern bei der Identifizierung des VRAC, allen voran Felizia Voss, aber auch den Elektrophysiologen Florian Ullrich und Jonas Münch. Tatkräftige Unterstützung erhielt ich von Stephanie Wernick, Nicole Krönke und Janet Liebold. Diesen und den vielen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich außerdem für die ungewöhnlich nette Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte ebenfalls den externen Kollaborationspartnern und ihren Mitarbeitern für die erfolgreichen und bereichernden Zusammenarbeiten an verschiedenen Projekten danken: Dr. Jens von Kries am FMP (siRNA-Screen), Prof. Sergio Grinstein von der University of Toronto (lysosomale pH-Regulation), Prof. Klaus Fendler am Frankfurter MPI für Biophysik (SSM-Elektrophysiologie), Prof. Jon Cooper am King's College in London (ZNS-Histologie), Prof. Uwe Kornak an der Charité (Knochen-Analyse), Dr. Carole Charlier an der Université de Liège (osteopetrotische Rinder) und Prof. Christian Hübner am Universitätsklinikum Jena (V-ATPase und lysosomale Funktion).

An der Charité danke ich Prof. Hanspeter Herzel für die Aufnahme als Gastwissenschaftler am Institut für Theoretische Biologie, so dass ich mich auch in die Lehre an der Charité einbringen und an der didaktischen Fortbildung teilnehmen konnte. Den Studenten bin ich dankbar, dass sie durch ihr Interesse und ihre Teilnahme dafür gesorgt haben, dass meine Lehrerfahrten durchweg positiv sind. Bei Prof. Michael Hummel bedanke ich mich für seine Hilfe als Habilitationsbeauftragter.

Dem BMBF danke ich für den e:Bio-Grant zur Finanzierung meiner Arbeitsgruppe in der Biochemie der Freien Universität. Hier bedanke ich mich bei dem Kollegium für die freundliche Aufnahme und natürlich bei meinen Arbeitsgruppenmitgliedern, Lisa von Kleist, Antje Buttgerit und Benjamin König, für den Einsatz und Teamgeist beim Aufbau der Forschungsgruppe.

Schließlich ein ganz großes Dankeschön! an meine Familie, Angela, Anna und Philipp, für die großartige Unterstützung und das immerwährende Verständnis.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift