

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Membranen . . . . .	1
1.1.1	Transport über Membranen . . . . .	2
1.2	CLC Chloridkanäle und -transporter . . . . .	3
1.2.1	Die Struktur der CLC-Proteine . . . . .	6
1.2.2	Bindungspartner von CLC-Proteinen . . . . .	7
1.2.3	Die CLC-Proteine des endozytotischen Weges . . . . .	8
1.2.4	Ansäuerung von Endosomen und Lysosomen . . . . .	11
1.2.5	CIC-7 – Osteopetrose und Neurodegeneration . . . . .	12
1.3	Osteopetrose . . . . .	14
1.3.1	Osteoklasten . . . . .	14
1.3.2	Genetische Ursachen der Osteopetrose . . . . .	15
1.4	Die <i>grey-lethal</i> Maus . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1	Charakterisierung des Proteins Ostm1 . . . . .	21
3.1.1	Gewebsverteilung von Ostm1 . . . . .	21
3.1.2	Nachweis von Ostm1 in Proteinlysaten . . . . .	22
3.1.3	Aufklärung der Topologie von Ostm1 . . . . .	24
3.1.4	Subzelluläre Lokalisierung von Ostm1 . . . . .	27
3.1.5	CIC-7 ist essentiell für die lysosomale Lokalisation von Ostm1 . . . . .	30
3.1.6	Analyse der Reifung und Prozessierung von Ostm1 . . . . .	30
3.2	Untersuchung der Interaktion von CIC-7 und Ostm1 . . . . .	36
3.2.1	Ostm1 ist essentiell für die Stabilität des CIC-7 Proteins . . . . .	38
3.2.2	Untersuchung des lysosomalen pH . . . . .	41
3.3	Vergleichende Analyse des Phänotyps der CIC-7-Knockout und <i>grey-lethal</i> Maus . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Ostm1 – ein lysosomales Typ-I-Transmembranprotein . . . . .	47
4.1.1	Transmembrantopologie . . . . .	48
4.1.2	Lokalisierung . . . . .	49
4.1.3	Prozessierung . . . . .	50
4.2	Ostm1 als $\beta$ -Untereinheit von CIC-7 . . . . .	52

4.2.1	Bindung an CIC-7 ist Voraussetzung für die lysosomale Zielsteuerung von Ostm1 . . . . .	52
4.2.2	Ostm1 ist essentiell für die Stabilität des CIC-7 Proteins . . . . .	54
4.2.3	Einfluss von Mutationen in CIC-7 und Ostm1 auf den Komplex . . . . .	55
4.2.4	Vergleich mit Untereinheiten anderer Kanäle . . . . .	55
4.2.5	Vergleich mit CIC-K/Barttin . . . . .	57
4.3	Funktionen des CIC-7/Ostm1-Komplexes . . . . .	59
4.3.1	Einfluss von CIC-7/Ostm1 auf den lysosomalen pH . . . . .	59
4.3.2	Einfluss von CIC-7/Ostm1 auf die Fellfarbe . . . . .	60
4.3.3	Neuronale Defekte . . . . .	64
4.3.4	<i>grey-lethal</i> , nur eine Kopie der CIC-7 Knockout Maus? . . . . .	66
4.4	Ausblick . . . . .	66
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>69</b>
5.1	Material . . . . .	69
5.1.1	Chemikalien und Enzyme . . . . .	69
5.1.2	Lösungen und Medien . . . . .	69
5.1.3	Antikörper . . . . .	70
5.1.4	Zelllinien . . . . .	72
5.1.5	Bakterienstämme . . . . .	72
5.1.6	Grey-lethal Mäuse . . . . .	72
5.1.7	Filmmaterialien und bildgebende Verfahren . . . . .	72
5.1.8	Elektronische Datenverarbeitung und Datenanalyse . . . . .	73
5.2	Molekularbiologische Techniken . . . . .	73
5.2.1	Transformation von <i>E.coli</i> . . . . .	73
5.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	74
5.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA . . . . .	74
5.2.4	Restriktionsverdau . . . . .	74
5.2.5	Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden . . . . .	74
5.2.6	Dephosphorylierung von DNA . . . . .	75
5.2.7	Auffüllen und Entfernen überhängender DNA-Enden . . . . .	75
5.2.8	DNA-Gelelektrophorese . . . . .	75
5.2.9	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	75
5.2.10	Ligation . . . . .	76
5.2.11	Amplifizierung von PCR-Fragmenten zur Klonierung aus cDNA oder Subklonierung . . . . .	76
5.2.12	Rekombinante PCR . . . . .	77
5.2.13	DNA-Sequenzierung . . . . .	78
5.2.14	RNA Präparation aus Gewebe . . . . .	78
5.2.15	Northern Blot . . . . .	79
5.2.16	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien . . . . .	79
5.2.17	Genotypisierung der <i>Edar<sup>dl-J</sup></i> Punktmutation mittels Sequenzierung . . . . .	80
5.2.18	Genotypisierung von CIC-7 Mäusen mittels PCR . . . . .	80

5.2.19	Genotypisierung von <i>grey-lethal</i> Mäusen mittels PCR . . . . .	81
5.3	Biochemische Methoden . . . . .	81
5.3.1	Herstellung von S1-Proteinlysaten aus Gewebe . . . . .	82
5.3.2	Herstellung von Proteinlysaten aus transfizierten HEK293-Zellen . . . . .	82
5.3.3	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) . . . . .	82
5.3.4	Bestimmung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität . . . . .	82
5.3.5	Kopplung von Antikörpern and Protein-A-Sepahrose . . . . .	83
5.3.6	Immunpräzipitation mit ungekoppelten Antikörpern . . . . .	83
5.3.7	Immunpräzipitation mit gekoppelten Antikörpern . . . . .	83
5.3.8	Deglykosylierung mit N-Glycosidase F . . . . .	84
5.3.9	Deglykosylierung mit Endo-H . . . . .	84
5.3.10	SDS-Gelelektrophorese . . . . .	84
5.3.11	Nicht-reduzierende Gelelektrophorese . . . . .	85
5.3.12	Western Blot . . . . .	85
5.3.13	Immundetektion . . . . .	85
5.3.14	Herstellung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren . . . . .	86
5.3.14.1	Immunisierung . . . . .	86
5.3.14.2	Peptidkopplung . . . . .	86
5.3.14.3	Aufreinigung . . . . .	87
5.4	Zellkulturarbeiten . . . . .	87
5.4.1	Kultur von HEK293- und HeLa-Zellen . . . . .	87
5.4.2	Einfrieren von Zellen . . . . .	88
5.4.3	Auftauen von Zellen . . . . .	88
5.4.4	Kultivierung von murinen adulten Fibroblasten . . . . .	88
5.4.5	Immortalisierung von Fibroblasten . . . . .	88
5.4.6	Kultivierung von murinen embryonalen Neuronen . . . . .	89
5.4.7	Transiente Transfektion . . . . .	89
5.4.7.1	Transfektion von HeLa-Zellen und Mausfibroblasten mit FuGene6 . . . . .	89
5.4.7.2	Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293-Zellen . . . . .	90
5.4.8	Proteaseinhibition . . . . .	90
5.4.9	Messung des lysosomalen pH-Wertes . . . . .	90
5.5	Histologische Methoden . . . . .	91
5.5.1	Perfusion von Mäusen . . . . .	91
5.5.2	Gewebeschnitte . . . . .	92
5.5.2.1	Gefrierschnitte . . . . .	92
5.5.2.2	Paraffinschnitte . . . . .	92
5.5.3	Elektronenmikroskopie . . . . .	92
5.5.4	Immunhistochemie . . . . .	93
5.5.4.1	Immunhistochemie an Schnitten . . . . .	93
5.5.4.2	Immunzytochemie von Zellkulturen . . . . .	93

**6 Publikationen und Patente 113**

<b>7 Danksagung</b>	<b>115</b>
<b>A Anhang</b>	<b>117</b>
A.1 Plasmidvektoren und DNA-Konstrukte . . . . .	117
A.2 Oligonukleotide . . . . .	118

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Die CLC-Chloridkanalfamilie der Säuger . . . . .	5
1.2	Topologie und Struktur eukaryontischer CLC-Kanäle und -Transporter . .	6
1.3	CLC-Proteine im endozytotischen Weg . . . . .	9
1.4	Schematische Darstellung der Vesikelansäuerung . . . . .	11
1.5	Osteopetrotischer Phänotyp von <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Mäusen . . . . .	13
1.6	Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines aktiven Osteoklasten . . . . .	15
1.7	Phänotyp der <i>grey-lethal</i> Maus . . . . .	17
3.1	Ostm1 ist ubiquitär exprimiert . . . . .	21
3.2	Sequenz und Strukturelemente von Ostm1 . . . . .	22
3.3	Western Blot von Ostm1 . . . . .	23
3.4	Ostm1 ist glycosyliert . . . . .	25
3.5	Der N-Terminus von Ostm1 ist luminal orientiert . . . . .	26
3.6	Ostm1 ist lysosomal lokalisiert . . . . .	28
3.7	Ostm1 ist in der <i>ruffled border</i> von Osteoklasten exprimiert . . . . .	29
3.8	Koexpression von CIC-7 führt zu lysosomaler Lokalisation von exprimiertem Ostm1 in Fibroblasten . . . . .	31
3.9	Koexpression von CIC-7 führt zu lysosomaler Lokalisation von exprimiertem Ostm1-GFP in Hela-Zellen . . . . .	32
3.10	Die kleine Ostm1-Form fehlt im CIC-7 Knockout . . . . .	33
3.11	Subzelluläre Fraktionierung zeigt Unterschiede in der Lokalisation beider Formen von Ostm1 . . . . .	34
3.12	Die kleine Ostm1 Form ist teilweise EndoH resistent . . . . .	35
3.13	Lysosomale Spaltung von Ostm1 . . . . .	36
3.14	CIC-7 und Ostm1 interagieren <i>in vivo</i> . . . . .	37
3.15	CIC-7 interagiert mit der großen Ostm1-Form . . . . .	38
3.16	Reduzierte CIC-7-Proteinmenge in <i>grey-lethal</i> Zellen . . . . .	39
3.17	Der lysosomale pH von <i>gl-</i> sowie <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Zellen erscheint unverändert . .	41
3.18	WT, CIC-7-Knockout und <i>gl</i> -Mäuse im Vergleich . . . . .	42
3.19	Neurodegeneration im Hippocampus von <i>grey-lethal</i> Mäusen . . . . .	43
3.20	Speichermaterial in <i>gl-</i> und <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> - Zellen . . . . .	44
3.21	Retinadegeneration in <i>grey-lethal</i> und CIC-7-Knockout Mäusen . . . . .	45
4.1	Mögliche Membrantopologien von Ostm1 . . . . .	48
4.2	Prozessierung von Ostm1 . . . . .	50

4.3	Inhibierung der Pheomelaninsynthese . . . . .	62
4.4	Modell zur Regulation der Melaninproduktion durch <i>C1C-7/Ostm1</i> . . . .	63
5.1	pH-abhängiges Spektrum von <i>Oregon-Green</i> . . . . .	90

# Tabellenverzeichnis

3.1	CIC-7 und Ostm1 mRNA Level sind in <i>gl</i> - und <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Mäusen unverändert	40
5.1	Lösungen . . . . .	69
5.2	Primärantikörper . . . . .	70
5.3	Sekundärantikörper . . . . .	71
A.1	Plasmide . . . . .	117
A.2	Oligonukleotide . . . . .	118

# Abkürzungen

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EndoH	Endoglycosidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
gl	grey-letahl
HA	Hämagglutinin
HRP	Horseradish Peroxidase
kD	Kilodalton
ko	Knockout
Lamp-1	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein-1
Lamp-2	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein-2
NCL	neuronale Ceroid-Lipofuscinose
OD	Optische Dichte
Ostm1	Osteopetrose-assoziiertes Transmembranprotein 1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PNGaseF	Peptid-N4-(acetyl- $\beta$ -glucosaminy)-asparagin amidase
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
H <sup>+</sup> -ATPase	Vakuoläre Protonenpumpe
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtprozent