
1	EINLEITUNG.....	6
1.1	Einführung in den Knochen- und Mineralstoffwechsel.....	6
1.2	Knochenentwicklung - Knochenbildung und Knochenwachstum.....	6
1.3	Endokrine Regulation von Kalzium und Phosphat.....	8
1.4	Knochenerkrankungen mit verminderter Knochenmineralisation.....	9
1.5	Knochenerkrankung mit erhöhter Knochendichte	10
1.5.1	Morbus Paget.....	10
1.5.2	Pyknodysostose	11
1.5.3	Osteopetrose.....	11
1.6	Osteoklastenbiologie	14
1.7	Vakuoläre H ⁺ -ATPase	15
1.7.1	Struktur und Regulation der V-ATPase.....	16
1.8	oc-Mausmutante	18
2	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	19
3	MATERIAL UND METHODE.....	20
3.1	Antikörper.....	20
3.2	Puffer und Lösungen	20
3.3	Molekularbiologische Methode.....	21
3.3.1	Isolierung von DNA aus Gewebe für die PCR-Genotypisierung.....	21
3.3.2	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Genotypisierung	21
3.3.3	Gelelektrophorese von DNA	22
3.3.4	Filmmaterial.....	22
3.4	Proteinbiochemische Methoden	23
3.4.1	Membranpräparation aus Organen.....	23
3.4.2	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page).....	23
3.4.3	Western-Blot.....	23
3.4.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	24
3.5	Histologische Techniken	24

3.5.1	Paraffinschnitte.....	24
3.5.2	Gefrierschnitte	24
3.5.3	Eindeckeln von Gewebeschnitten	25
3.5.4	Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	25
3.5.5	Färbung mit Toluidinblau.....	25
3.5.6	Färbung mit Methylengrün	25
3.5.7	Nissl-Färbung	26
3.5.8	TRAP-Färbung	26
3.5.9	Immunhistochemie mit ABC-Methode.....	26
3.5.10	Immunfluoreszenz.....	27
3.5.11	Färbung der Zellkerne mit TOTO-3 Iodid.....	28
3.6	Mikroskopie.....	28
3.7	Tierversuche	29
3.7.1	Narkotisierung von Versuchstieren	29
3.7.2	Perfusionsfixierung.....	29
4	ERGEBNISSE.....	30
4.1	Detektion der $\alpha 3$-Untereinheit im Multi-Tissue-Westernblot.....	30
4.2	Phänotypische Charakterisierung der oc/oc-Maus	30
4.2.1	Makroskopische Veränderungen	30
4.2.2	Histologische Analyse des Knochens	31
4.2.3	Histologische Analyse der Retina	32
4.2.4	CT-Befunde von der Schädelbasis	33
4.2.5	Histologische Analyse des Gehirns.....	33
4.2.6	Expression des Natrium-Phosphat-Kotransporters in der Niere	34
4.3	Untersuchung der Osteoklasten in oc/oc-Mäusen.....	35
4.3.1	Morphologie der Osteoklasten	35
4.3.2	Lokalisation der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase in Osteoklasten	37
5	DISKUSSION.....	39
5.1	Einfluss der $\alpha 3$-Untereinheit der H^+-ATPase auf den Knochenphänotyp im Vergleich zu CIC-7	39
5.2	Retinaler Phänotyp der Clcn7^{-/-}-Maus verglichen zur oc/oc-Maus	40
5.3	Cerebraler Phänotyp der Clcn7^{-/-}- Maus verglichen zur oc/oc-Maus.....	43

5.4	Ausblick.....	46
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	47
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	49
8	DANKSAGUNG.....	59
9	LEBENS LAUF.....	60
10	ERKLÄRUNG.....	61

ABKÜRZUNGEN

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ADO I	autosomal dominante Osteopetrose Typ I
ADO II	autosomal dominante Osteopetrose Typ II
AMD	altersabhängige Makulardegeneration
ARO	infantile maligne autosomal rezessive Osteopetrose
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum
°C	Grad Celsius
CAII	Carboanhydrase Typ II
CBS-Domänen	C-terminal gelegene CBS-Domänen (CBS1 und CBS2) der CLC Proteine, benannt nach ihrer Homologie zur Cystathionin- β -Synthase
CIC-x	Chloridkanal der CIC-Familie
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAB	Diaminbenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dRTA	distale renale tubuläre Azidose
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Gramm oder Normal-Fallbeschleunigung (9,81m/s)
h	Stunden
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LRP 5	Low density Lipoprotein Receptor Protein 5
m	milli oder Meter
M	Molar
min	Minuten
μ	mikro
n	nano
Napi-2	Natrium-Phosphat-Kotransporter 2
NCL	neuronale Zeroidlipofuszinose
NGS	Ziegenserum
oc	osteosklerotisch
oc/oc	oc-Knockout
OPG	Osteoprotegrin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Polylysin-Perjodat
PTH	Parathormon
P19	19. postnataler Lebenstag (andere Tage entsprechend)
RANKL	Receptor Activator of NF κ B Ligand: Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF)
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinale Pigmentepithel
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TRAP	Tartat-resistente saure Phosphatase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	enzymatische Aktivität
UV	ultraviolett
V	Volt
V-ATPase	vakuoläre H ⁺ -ATPase
+/+	Wildtyp-Tier/ Gewebe
-/-	Knockout-Tier/ Gewebe

1 Einleitung

1.1 Einführung in den Knochen- und Mineralstoffwechsel

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das während des gesamten Lebens durch Knochenanbau und Knochenresorption umgeformt und adaptiert wird. Der Knochenumbau erfolgt durch zwei verschiedene Zelltypen: Durch Knochenmatrix produzierende Osteoblasten und durch Osteoklasten, die den Knochen resorbieren (Zaidi et al. 2007). Der extrazelluläre Anteil des Knochens besteht aus einer Mineralisationsphase und einer organischen Matrix. Hauptbestandteil der Mineralisationsphase ist das Hydroxyapatit, eine komplexe anorganische Verbindung aus Kalziumphosphatmolekülen. Die organische Matrix setzt sich größtenteils aus Kollagen-Typ-I zusammen. Die Anordnung von Mineral zwischen den Kollagenfibrillen verleiht dem Knochen die geeignete Steifigkeit. Der Knochen leistet Schutz für Gehirn, Rückenmark, Sinnesorgane und Knochenmark und dient als Speicher für homöostatisch wirksame Ionen, wie Kalzium, Phosphat, Natrium und Magnesium (Meghji 1992; Blair, Zaidi et al. 2002). Im Inneren des Knochens übernimmt das Knochenmark während der Fetalentwicklung den überwiegenden Teil der Blutbildung. Im Laufe des Lebens wird das blutbildende rote Knochenmark allmählich durch gelbes Fettmark verdrängt. Nur in wenigen Knochen, wie in Rippen, Sternum, Wirbelkörper, flachen Schädelknochen, Darmbeinkamm, Hand-, und Fußwurzelknochen, bleibt die blutbildende Funktion erhalten (Kreft, Reimann et al. 2000).

1.2 Knochenentwicklung - Knochenbildung und Knochenwachstum

Der größte Teil des menschlichen Skeletts wird embryonal als Knorpel angelegt und im weiteren Verlauf der Entwicklung bis auf wenige Abschnitte, wie Gelenkknorpel und Rippenknorpel, durch Knochen ersetzt. Die Knochenbildung umfasst die Ablagerung von Osteoid durch Osteoblasten, gefolgt von dessen Mineralisation aus Kalzium und Phosphat. Es lassen sich zwei Knochenbildungsvorgänge unterscheiden: die desmale und die chondrale Ossifikation, wobei die letztere wiederum in die peri- und enchondrale Ossifikation unterschieden werden kann. Während die desmale

und perichondrale Ossifikation für das Dickenwachstum des Knochens zuständig sind, indem sich Mesenchymzellen zu Osteoblasten differenzieren, ist die enchondrale, vom Inneren des knorpeligen Knochenvorläufers ausgehende Ossifikation verantwortlich für das Längenwachstum des Knochens (White and Wallis 2001). Hierbei wird bestehendes Knorpelgewebe durch die Einlagerung von Kalk von der Nährstoffzufuhr abgeschnitten, so dass der typische Blasenknorpel entsteht. Dieser wird in der Eröffnungszone durch die Tätigkeit der Chondroklasten und/oder Osteoklasten aufgelöst. Die zurückbleibenden Knorpelstreben dienen den Osteoblasten als Leitstruktur, an deren Oberfläche Osteoid abgelagert wird, so dass die Knorpelstreben in einen primitiven Knochen umgewandelt werden (Hill 1998). Die für das Längenwachstum verantwortlichen Vorgänge lassen sich gut im histologischen Schnitt durch die Epiphysenfuge, der Struktur zwischen Schaft und Enden der Röhrenknochen, beobachten (siehe Abbildung 1.1). Der primitive Knochen, auch Primärpongiosa genannt, wird weiter durch den höher differenzierten Lamellenknochen, bei dem die Faserbündel in parallelen oder konzentrischen Lagen organisiert sind, ersetzt. Nicht nur während der Entwicklung, sondern – im kleineren Ausmaß – während des ganzen Lebens findet ein Umbau des Knochens durch Osteoblasten und Osteoklasten statt (Vaananen 1993). Das Knochengewebe ist dadurch in der Lage, seine Struktur den funktionellen Anforderungen anzupassen.

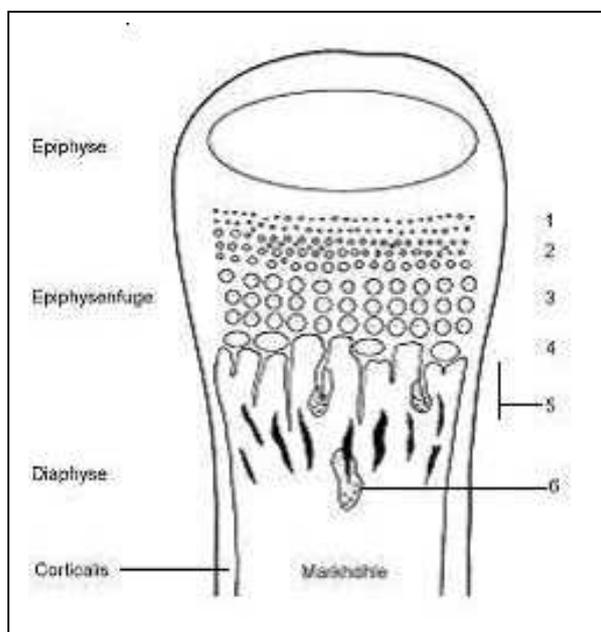


Abbildung 1.1:

Schematische Darstellung des Längenwachstums von Röhrenknochen.

1 = Epiphysenknorpel

2 = Säulenknorpel

3 = Blasenknorpel

4 = Eröffnungszone

5 = Verkalkte Primärpongiosa

6 = Osteoklast

1.3 Endokrine Regulation von Kalzium und Phosphat

Knochen ist der Hauptspeicher von Kalzium und Phosphat. Durchschnittlich enthält der menschliche Körper 1g Kalzium und 600g Phosphat. 99% vom Kalzium und 85% vom Phosphat werden im Knochen als Hydroxyapatitkristalle gespeichert. Vom Kalzium-Anteil befinden sich nur etwa 1% in Serum und extrazellulärer Flüssigkeit. Die verbleibenden 15% des Phosphats finden sich überwiegend intrazellulär und nur ein geringer Anteil von etwa 0,1% liegt in der extrazellulären Flüssigkeit vor. Biologisch wirksam ist lediglich der ionisierte Anteil.

Die Aufnahme von Kalzium und Phosphat über den Darm und deren Ausscheidung, vorrangig über die Niere, wird durch ein komplexes endokrines System gesteuert. Dieses umfasst die beiden Polypeptidhormone Parathormon (PTH) und Kalzitinin sowie das Steroidhormon 1,25-Dihydroxycholekalziferol ($1,25\text{-(OH)}_2\text{-VitaminD}_3$ =Kalzitriol) (Johnson and Kumar 1994). Die Sekretion von PTH, Kalzitinin und Kalzitriol wird durch einen Feedbackmechanismus, hauptsächlich über den Serumspiegel des ionisierten Kalziums, beeinflusst (Purroy and Spurr 2002). Zum Beispiel führt ein niedriger Kalzium-Plasmaspiegel zur Ausschüttung von PTH. Gleichzeitig wird die Kalzitinin-Sezernierung gehemmt und die Synthese von $1,25\text{(OH)}_2$ Vitamin D_3 gesteigert. Als Folge ist die Exkretion von Kalzium über die Niere vermindert, die Kalzium-Mobilisierung aus Knochen gesteigert und die intestinale Kalzium-Aufnahme erhöht. Der Phosphat-Spiegel wird durch PTH, Kalzitinin und Kalzitriol größtenteils reziprok zum Kalzium-Spiegel reguliert. Diese Wechselseitigkeit ist wichtig, da sonst das schlecht lösliche Kalziumphosphat ausfallen könnte. PTH hemmt an der Niere die Phosphat-Reabsorption, indem der Natrium-Phosphat-Kotransporter-2 endozytiert und in Lysosomen abgebaut wird (Hernando, Forgo et al. 2000) (siehe Kapitel 4.2.5). Gleichzeitig hat PTH eine stimulierende Wirkung auf die Phosphat-Mobilisation aus Knochen. PTH wirkt allerdings nicht direkt stimulierend auf die Osteoklasten, da diese keine PTH-Rezeptoren besitzen. Stattdessen wird über die Erstwirkung von PTH auf die Osteoblasten, eine Freisetzung von Botenstoffen, v. a. RANKL, bewirkt, welche die Osteoklasten zur vermehrten Resorption und damit zur Phosphat-, und Kalziumfreisetzung anregen (Burgess, Qian et al. 1999; Gori, Hofbauer et al. 2000; Lacey, Tan et al. 2000). Die Mobilisation von Phosphat aus Knochen wird durch Kalzitriol unterstützt. Kalzitriol fördert die Differenzierung und Entwicklung der Osteoklasten aus Vorläuferzellen. Außerdem erhöht Kalzitriol bei erniedrigtem Serum-Phosphat-Spiegel die Phosphat-Resorption im

Dünndarm, mit der höchsten Effizienz im Jejunum und im Ileum, und wirkt einer renalen Phosphat-Ausscheidung entgegen (Blair and Athanasou 2004). Ein Gegenspieler von PTH und Kalzitriol ist das Kalzitonin. Kalzitonin hemmt die Mobilisierung von Phosphat und Kalzium aus Knochen und fördert deren Ausscheidung über die Niere.

1.4 Knochenerkrankungen mit verminderter Knochenmineralisation

Ist die Kalzium-Phosphat-Homöostase gestört, kann dies u. a. zu Knochenmineralisierungsstörungen führen. Als Beispiel für eine Mineralisierungsstörung des wachsenden Skeletts ist die *Rachitis* zu nennen. Der Mineralisationsdefekt betrifft sowohl die Knochen als auch die Wachstumsfuge. Dagegen beschreibt die *Osteomalazie* eine Mineralisierungsstörung des erwachsenen Skeletts, bei dem die Epiphysenfuge bereits geschlossen ist (Haussler and McCain 1977). Ursachen dieser Erkrankungen sind ein Mangel an Vitamin-D oder eine Vitamin-D-Resistenz (Li, Pirro et al. 1997; Sakai, Kishimoto et al. 2001). Daraus resultiert u. a. eine ungenügende intestinale Kalzium-, und Phosphatresorption. Dies wiederum stimuliert die PTH-Sekretion (sekundärer Hyperparathyreoidismus), welche die Kalzium- und Phosphatfreisetzung aus Knochen steigert. An der Niere bewirkt die PTH-Sekretion zum einem eine Verminderung der Kalziumclearance, zum anderem ist die renale Rückresorption von Phosphat herabgesetzt. Die meisten Patienten haben folglich ein normales oder erniedrigtes Serumkalzium bei einer Hypophosphatämie (Panda, Miao et al. 2001). Ein nicht ausreichendes Angebot an Kalzium und Phosphat führt zu einer ungenügenden Mineralisierung des Osteoids bei anhaltender Osteoidproduktion durch die Osteoblasten. Charakteristisch ist daher eine Zunahme der Osteoidmasse und Abnahme der Mineralisationsfront. Bei Kindern sind histologisch eine Erweiterung und mangelnde Organisation der sonst geordneten Säulenknorpelschicht an der Epiphysenfuge der langen Röhrenknochen zu beobachten (Sabbagh, Carpenter et al. 2005). Die Röhrenknochen sind nicht mehr in der Lage, den mechanischen Belastungen standzuhalten. Bei beiden Krankheitsbildern imponieren diffuse Knochenschmerzen, Frakturanfälligkeit, Muskelschwäche mit Gangstörungen (Watschelgang) und Wachstumsstörungen (Minderwuchs)(Esterberg, Kassim et al. 2003).

1.5 Knochenerkrankung mit erhöhter Knochendichte

Die meisten schwerwiegenden Osteosklerosen beruhen auf Defekte in der Knochenresorption. Ursächlich ist hierbei häufig eine verminderte Anzahl oder ein Funktionsverlust der Osteoklasten. Im folgenden werden diesbezüglich einige Knochenerkrankungen vorgestellt.

1.5.1 Morbus Paget

Der Morbus Paget ist nach der Osteoporose die zweithäufigste Knochenerkrankung. Das charakteristische Merkmal des Morbus Paget (Synonym: Osteitis deformans) ist der erhöhte Knochenumbau. In der Frühphase überwiegt der Knochenabbau, nach dem eine sekundäre, überstürzte Neubildung von unterminalisierten Faserknochen folgt. Im Verlauf der Erkrankung nimmt die Resorptionsrate relativ zur Knochenneubildung progressiv ab (Roodman and Windle 2005). Typische klinische Veränderungen sind lokale Schmerzen an den betroffenen Arealen und ausgeprägte Knochendeformitäten (z. B. „Säbelscheiden“-Tibia, Zunahme des Kopfumfangs). In etwa 1% der Fälle wurden Entartungen zum Osteosarkom, zu Riesenzelltumoren und Chondrosarkomen, nachgewiesen (Hansen, Seton et al. 2006; Sun, Lau et al. 2006). Die Identifizierung verschiedener ursächlicher Mutationen im Bereich der Chromosomen 2q36, 5q31, 5q35, 10q13, 18q21-22 und 18q23 weisen auf eine genetische Heterogenität hin (Cody, Singer et al. 1997; Nellissery, Padalecki et al. 1998; Hocking, Herbert et al. 2001; Laurin, Brown et al. 2001; Good, Busfield et al. 2002). Ein häufig mit dem M. Paget in Verbindung gebrachtes Gen ist das *SQSTM1*. Sowohl bei familiären als auch sporadischen Fällen wurden mehrere Mutationen in diesem Gen gefunden (Laurin et al. 2002, Johnson-Pais et al. 2003, Hocking et al 2002). *SQSTM1* ist wahrscheinlich an der Regulation der Signaltransduktion des RANK-Rezeptors beteiligt. Auch andere erbliche Formen des M. Paget oder angrenzende Erkrankungen werden durch Veränderungen des RANKL/RANK/OPG-Systems verursacht. Das RANKL/RANK/OPG-System spielt eine entscheidende Rolle in der Koordinierung der Osteoblasten-, und Osteoklastenentwicklung (Teitelbaum and Ross 2003; Hofbauer 2006). Störungen im RANKL/RANK/OPG-System führen folglich zu einem Ungleichgewicht im Knochenumbau.

1.5.2 Pyknodysostose

Pyknodysostose ist eine autosomal-rezessive, osteochondrodysplastische Erkrankung, beruhend auf einer eingeschränkten Knochenresorption. Die Patienten weisen eine generalisierte Osteosklerose, häufige Frakturen, Schädeldeformitäten, Hypoplasie der Schlüsselbeine und eine kleine Körperstatur auf. Der französische Maler Toulouse-Lautrec soll unter dieser Erkrankung gelitten haben. Als Ursache wurden Mutationen im Gen für Cathepsin K aufgedeckt (Gelb, Moissoglu et al. 1996; Hou, Bromme et al. 1999; Lazner, Gowen et al. 1999; Haagerup, Hertz et al. 2000; Saftig, Hunziker et al. 2000; Li, Jepsen et al. 2006; Chen, Yang et al. 2007). Cathepsin K wird stark in Osteoklasten exprimiert und besitzt als lysosomale Cystein Proteinase die Fähigkeit bei niedrigem pH-Wert die kollagene Tripelhelixstruktur der organischen Knochenmatrix zu spalten. Nachfolgend sind andere Proteasen in der Lage unter weniger, sauren Milieu-Verhältnissen die Kollagen-Fibrillen weiter abzubauen (Everts, Korper et al. 2006). Ein Cathepsin K-Mangel in Osteoklasten führt folglich zu einem gestörten Kollagenabbau und zu einer Abbaustörung der organischen Matrix.

1.5.3 Osteopetrose

Die Osteopetrose stellt eine klinisch, biochemisch und genetisch heterogene, vererbliche Skeletterkrankung dar. Es liegt ihr zumeist ein Defekt der Knochenresorption zu Grunde, resultierend aus einer unzureichenden Funktion der Osteoklasten. Dies führt zu einer Vermehrung verkalkten Knochengewebes und verhindert den Umbau zu stabilem Lamellenknochen. Das Knochengewebe ist spröde, besitzt keine geordnete Trabekelstruktur und je nach Ausprägung ist der Markraum hochgradig eingengt oder ganz verschlossen. Die Folgen sind hämatologische Störungen mit Anämie und extramedullärer Blutbildung und hieraus resultierender Hepatosplenomegalie. Außerdem hat die Sprödigkeit des Knochens eine verstärkte Frakturhäufigkeit zur Folge.

Bis zum heutigen Zeitpunkt können drei Formen der Osteopetrose unterschieden werden: (1) Infantile maligne autosomal rezessive Form (ARO), (2) a. Adulte benigne autosomal dominante Form Typ I (ADO I), b. Adulte benigne autosomal dominante Form Typ II (ADO II) (Albers-Schönberg-Erkrankung), (3) Autosomal rezessive Form mit Carboanhydrase-II-Mangel und renal-tubulärer Azidose (CA II). Allerdings können weitere Formen nicht ausgeschlossen werden.

Infantile maligne autosomal rezessive Osteopetrose (ARO)

Obwohl schon seit einigen Jahren Gendefekte für mehrere osteopetrotische Maus-Mutanten bekannt sind (Marks, Seifert et al. 1985), wurden erst in letzter Zeit die ursächlichen Gendefekte für die humane infantile maligne Osteopetrose aufgedeckt. Kornak et al. (Kornak, Schulz et al. 2000), Frattini et al. (Frattini, Orchard et al. 2000) und Scimeca (Scimeca, Quincey et al. 2003) fanden Mutationen im *TCIRG1*-Gen, das verantwortlich ist für die Kodierung der $\alpha 3$ -Untereinheit der V-Typ H^+ -ATPase (s. Kapitel 1.7). Die $\alpha 3$ -Untereinheit, welche auch nach ihrem Molekulargewicht *OC116* genannt wird, wird verstärkt in Osteoklasten exprimiert und ist zuständig für den H^+ -Transport in die Resorptionslakune (Manolson, Yu et al. 2003). Das *TCIRG1*-Gen wurde auf Chromosom 11q13 lokalisiert, einer Region, die mehrere potenzielle Kandidatengene enthält (Heaney, Shalev et al. 1998).

Ein weiteres wichtiges Gen, welches im engen funktionellen Kontakt zur H^+ -ATPase steht, kodiert ein ebenfalls stark in der Ruffled Border der Osteoklasten lokalisiertes Protein: den Chloridkanal CIC-7. Mutationen in *CLCN7* waren bei mehreren an Osteopetrose erkrankten Kindern nachweisbar. Einige von ihnen zeigten klinisch eine intermediäre Form der rezessiven Osteopetrose ohne schweren Krankheitsverlauf (Campos-Xavier, Saraiva et al. 2003). Mäuse, denen CIC-7 fehlt, versterben nach wenigen Wochen an den Folgen osteopetrotischer Knochenveränderungen und an einer Neurodegeneration (Kornak, Kasper et al. 2001). ARO Mutationen führen somit zu einem Funktionsverlust des CIC-7 Proteins.

Weiterhin wurden in drei Fällen Mutationen im *OSTM1*-Gen gefunden (Chalhoub, Benachou et al. 2003; Quarello, Forni et al. 2004; Ramirez, Faupel et al. 2004; Pangrazio, Poliani et al. 2006). *OSTM1* verschlüsselt ein Membranprotein, dessen Funktion allerdings noch nicht vollständig geklärt ist. *Ostm1* wurde als β -Untereinheit von CIC-7 identifiziert, die gemeinsam einen molekularen Komplex bilden (Lange, Wartosch et al. 2006). In grey-lethal (gl) Knockout-Mäusen, denen das *OSTM1*-Gen fehlt, zeigten sich neben osteopetrotischen Knochenveränderungen lysosomale Ablagerungen und eine Neurodegeneration, ähnlich wie sie bei *Clcn7*-Knockout-Mäusen zu finden sind (Rajapurohitam, Chalhoub et al. 2001; Pangrazio, Poliani et al. 2006).

Autosomal dominante Osteopetrose Typ II (ADO II)

In Folgestudien konnte gezeigt werden, dass auch die ADO II durch *CLCN7* Mutationen verursacht wird (Benichou, Cleiren et al. 2001). Alle bei der ADO II identifizierten Veränderungen sind Missense-Mutationen (Cleiren, Benichou et al. 2001; Frattini, Pangrazio et al. 2003). Auffällig häufig fanden sich Mutationen in den beiden CBS-Domänen des Proteins, die wahrscheinlich an den Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. Kürzlich publizierte Studien zeigen, dass *CLCN7*-Polymorphismen involviert sind in der Regulation der Knochendichte und somit am phänotypischen Schweregrad der ADO II Patienten (Pettersson, Albagha et al. 2005; Kornak, Ostertag et al. 2006). Da bereits Mutationen im *CLCN7*-Gen bei ARO Patienten gefunden wurden, scheint der Phänotyp der ADO II aus einem dominant negativen Effekt zu resultieren, ähnlich wie Mutationen im *CLCN1*-Gen zum einen die autosomal rezessive Myotonie vom Becker Typ und zum anderen die autosomal dominante Thomsen Form hervorrufen können. Cleiren and al. (2001) fanden somit eine Überlappung der ADO II und ARO auf genetischer Ebene. Unterstützt wird diese Aussage durch einen Bericht über eine an ADO II erkrankte Großfamilie, in der zwei Familienmitglieder an ARO leiden (Frattini, Pangrazio et al. 2003).

Autosomal dominante Osteopetrose Typ I (ADO I)

ADO I ist die einzige Form der Osteopetrose, bei der keine häufigen Knochenbrüche beschrieben wurden (Bollerslev and Mosekilde 1993). In ADO I Patienten sind Defekte im *LRP5*-Gen gefunden worden (Van Hul, Gram et al. 2002; Van Wesenbeeck, Cleiren et al. 2003). Das *LRP5*-Gen verschlüsselt den Low-Density Lipoprotein Receptor Protein 5 (LRP5) und befindet sich wie das *TCIRG1*-Gen in der Region 11q12-13. Interessanterweise wurden Mutationen im *LRP5*-Gen bei verschiedenen Knochenkrankheiten mit erhöhter Knochendichte gefunden. Die Region 11q12-13 scheint damit ebenfalls eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Knochendichte zu haben (Sobacchi, Vezzoni et al. 2004).

Autosomal rezessive Form mit renal-tubulärer Azidose

Charakteristisch für die selten vorkommende, autosomal rezessiv vererbte, Osteopetrose mit renaler tubulärer Azidose und cerebraler Kalzifikation ist ein milderer Krankheitsverlauf (Bolt, Wennink et al. 2005). Mutationen in der

Carboanhydrase Typ II (CA II), die sowohl in den Schaltzellen der Niere als auch in Osteoklasten vorkommen, sind verantwortlich für die fehlende Säuresekretion in beiden Zelltypen (Sly, Hewett-Emmett et al. 1983; Sly, Whyte et al. 1985). Die zytoplasmatische CA II ist normalerweise zuständig für die Umwandlung von CO_2 und H_2O in H^+ und HCO_3^- . Die bereitgestellten Protonen werden dann in der Regel über die H^+ -ATPase in die Resorptionslakune der Osteoklasten bzw. in die Sammelrohre der Niere sezerniert (Tashian, Shreffler et al. 1968; Baron 1989; Blair, Teitelbaum et al. 1989). Die cerebralen Kalzifikationen lassen sich ebenfalls durch das Vorkommen von defekten CA II in neuronalen Zellen des Gehirns erklären. Als Folge äußert sich klinisch eine mentale Retardation (Kida, Palmieri et al. 2006).

Borthwick et al. untersuchte zwei Mitglieder einer türkischen Familie, die die klinischen Zeichen einer Osteopetrose und distalen renalen tubulären Azidose (dRTA) aufwiesen. Während bei einem eine homozygote *frameshift* Mutation im Gen für CA II festgestellt wurde, lag beim anderen der CA II-Spiegel im Normbereich und es waren keine Veränderungen im CA II-Gen nachweisbar. Ursächlich für die Osteopetrose war hier eine homozygote Deletion im *TCIRG1*-Gen. Überdies resultierte die dRTA aus einer homozygoten Mutation im *ATP6V1B1*-Gen (Borthwick, Kandemir et al. 2003). Für die seltene, rezessive Form der dRTA sind Mutationen im Gen für die B1-Untereinheit (*ATP6V1B1*) und im Gen für die $\alpha 4$ -Untereinheit der V-ATPase (*ATP6V0A4*) bekannt. Beide Untereinheiten der V-ATPase kommen speziell in der apikalen Membran von Typ A Schaltzellen im distalen Nephron vor (Karet, Finberg et al. 1999; Stover, Borthwick et al. 2002; Stehberger, Schulz et al. 2003). In dem von Borthwick beschriebenen Fall erzeugen zwei selten auftretende, rezessive Erkrankungen ein klinisches Bild, das dem CA II Mangel nahezu identisch ist.

1.6 Osteoklastenbiologie

Osteoklasten sind Riesenzellen mit einem Durchmesser von 10-100 μm . Sie können mehr als 10 Zellkerne enthalten (Piper, Boyde et al. 1992). Im Organismus ist der Osteoklast die einzige Zelle, die in der Lage ist, Knochen zu resorbieren. Osteoklasten treten bereits mit Bildung der ersten Knochenbälkchen durch Osteoblasten in Erscheinung. Häufig liegen die Osteoklasten in durch Resorption entstandenen Einbuchtungen, den Howshipschen Lakunen, deren Größe und Anzahl Ausdruck der

Osteoklasten-Aktivität ist (Fuller, Thong et al. 1994). Oder sie sitzen kappenartig auf dem freien Ende der Knochenbälkchen. Um sich an die Knochenoberfläche anzuheften, benötigen die Osteoklasten transmembrane Adhäsionsproteine, die so genannten Integrine (Helfrich, Nesbitt et al. 1996). Diese Proteine bilden die Sealing-Zone, die engste Kontaktstelle zwischen Osteoklast und Knochen mit einem Abstand von 0,2 bis 0,5nm. Zwischen den Sealing-Zonen befindet sich die Ruffled Border (Bürstensaummembran), die aus Fusionen saurer Vesikel mit der Osteoklastenmembran entsteht und charakterisiert ist durch eine starke Auffältelung (Vaananen and Horton 1995). Zur Ruffled Border werden durch Mikrotubuli Vesikel transportiert, die u. a. Hydrolasen in die Resorptionslakune entleeren. Für die optimale Aktivität der Hydrolasen ist in der Resorptionslakune die Aufrechterhaltung eines pH-Werts von ~4,5 notwendig (Silver, Murrills et al. 1988). Dies wird durch ein Zusammenspiel zwischen Protonen-, und Anionentransport erzielt. Protonen werden von der zytoplasmatischen CA II durch die Umwandlung von CO_2 und H_2O in H^+ und HCO_3^- bereitgestellt. H^+ gelangt dann durch die V-Typ H^+ -ATPase in der Ruffled Border in die Resorptionslakune. Zum Ausgleich der gebildeten Potentialdifferenz, wird parallel Cl^- in die Resorptionslakune transportiert (Schlesinger, Blair et al. 1997). Das anfallende HCO_3^- wird am gegenüberliegenden Zellpol durch einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionenaustauscher durch Cl^- ersetzt (Teti, Blair et al. 1989; Blair and Zaidi 2006).

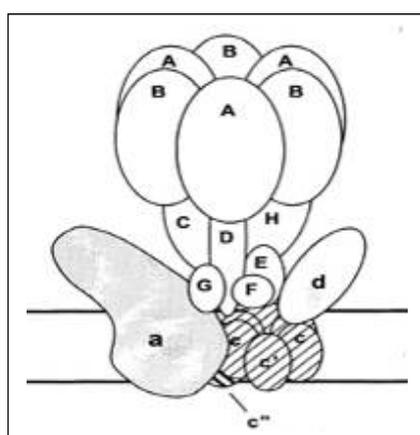
1.7 Vakuoläre H^+ -ATPase

Es gibt drei Klassen von Membranproteinen, die vornehmlich Protonen über die Membran transportieren, die H^+/K^+ -ATPase, der Na^+/H^+ -Austauscher und die vakuoläre H^+ -ATPase (V-ATPase). Letzteres, die V-ATPase, gehört zur Familie der ATP-abhängigen Protonenpumpen. Sie wurde erstmals von Cidon und Nelson (Cidon and Nelson 1983) und von Stone et al. (Stone, Xie et al. 1983) in intrazellulären chromaffinen Granulae entdeckt. Die V-ATPasen befinden sich innerhalb intrazellulärer Kompartimente, wie Endosomen, Lysosomen, sekretorischen und synaptischen Vesikeln, und sind beteiligt an diversen zellulären Vorgängen, wie der rezeptorvermittelten Endozytose (z.B. von LDL und Insulin), Sortierungsmechanismen von Proteinen und Lipiden und neuronalen und hormonellen Signaltransduktionsvorgängen (Forgac 1999). Sie erzeugen einen *proton motor force*, die als Antriebskraft für zahlreiche sekundäre Transportprozesse genutzt wird. Außerdem wurden V-ATPasen in der Plasmamembran von

spezifischen Zellen, wie renalen Schaltzellen, Osteoklasten und Makrophagen identifiziert, wo sie eine entscheidende Rolle in der Säuresekretion und Regulation des zytoplasmatischen pH-Werts spielen (Brisseau, Grinstein et al. 1996; Li, Chen et al. 1999; Brown and Breton 2000).

1.7.1 Struktur und Regulation der V-ATPase

Die V-ATPase bildet einen Komplex aus mehreren Untereinheiten und ist aus zwei Domänen aufgebaut. Die v1-Domäne stellt mit 640kDa den peripheren Komplex dar und ist verantwortlich für die ATP-Hydrolyse. Die v0-Domäne ist der membranständige Teil des Komplexes von 260kDa und zuständig für die Protonen-Translokation (Inoue, Wilkens et al. 2003). Ein strukturelles Modell der V-ATPase ist in der Abbildung 1.2 dargestellt. Die V-ATPase ähnelt der F-ATPase, die primär die Aufgabe hat ATP in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien herzustellen. Man nimmt an, dass beide über Rotationsmechanismen operieren. Die ATP-Hydrolysierung im v1-Abschnitt induziert eine Rotationsbewegung des "Schafts", der Untereinheit zwischen v0 und v1, der wiederum den Proteolipidring der c-Untereinheiten des membranären v0-Sektors in Rotation versetzt und dadurch einen Kontakt zu den beiden Hemikanälen in der a-Untereinheit herstellt, durch diese die Protonen durch die Membran geschleust werden (Kawasaki-Nishi, Nishi et al. 2003).



Zytoplasma

v1

Membran

v0

Lumen

Abbildung 1.2:

Schematisch dargestelltes
Strukturmodell der V-ATPase

Die größte Komponente des v0 Sektors ist die a-Untereinheit, auch 116kD genannt, von der bislang mehrere Isoformen bekannt sind. Die Isoformen sind gewebespezifisch verteilt und haben unterschiedliche Funktionen. In Mäusen sind vier Isoformen (a1-a4) beschrieben worden (Nishi and Forgac

2000; Toyomura, Oka et al. 2000; Oka, Toyomura et al. 2001). Die Isoform $\alpha 3$ beispielsweise ist verantwortlich für ein *Targeting* der V-ATPase in die Bürstensaummembran der Osteoklasten und $\alpha 4$ führt zum Einbau der V-ATPase in die apikale Membran der renalen Schaltzellen. Topologische Studien der α -Untereinheit ergaben, dass dieses Protein aus neun transmembranen Segmenten besteht, mit einer hydrophilen NH₂-terminalen Domäne (45kDa) zur cytoplasmatischen Seite und einer COOH-terminalen hydrophoben Domäne (55kDa) zum Lumen hin gewandt (Leng, Nishi et al. 1999).

In den gut untersuchten Hefezellen sind zwei Formen der α -Untereinheit bekannt, Vph1p und Stv1p. Vph1p ist in der vakuolären Membran lokalisiert und Stv1p findet sich in der Golgi-Membran (Manolson, Wu et al. 1994). In Hefe scheint die Amino-terminale Domäne der α -Untereinheit eine Kontrollfunktion im *Targeting* zu besitzen, während die Carboxyl-terminale Domäne in der ATP-Hydrolyse und im Protonentransport involviert zu sein scheint (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001).

Die Regulation der V-ATPase erfolgt durch unterschiedliche Faktoren. Beteiligt sind verschiedene Hormone und zahlreiche regulatorische Proteine, die mit den Untereinheiten der Protonenpumpe interagieren. Die Dichte der V-ATPase in der Plasmamembran kann zudem durch zelluläre Prozesse wie Endozytose oder Exozytose reguliert werden (Forgac 2000). Ein weiterer wichtiger Mechanismus für die Regulation der V-ATPase ist die reversible Dissoziation des Komplexes in seine beiden Bestandteile v₀ und v₁ (Kane and Smardon 2003). Diese Dissoziation kann u. a. als Antwort auf eine veränderte Umgebung wie Glukoseentzug erfolgen und abhängen vom Vorhandensein von Untereinheiten der V-ATPase. Unterschiedliche Verknüpfungen von Disulfidbrücken im katalytischen Abschnitt beeinflussen ebenfalls die Aktivität der V-ATPase (Stevens and Forgac 1997). Damit Protonenpumpen effizient arbeiten können, benötigen sie überdies einen parallelen Transport von negativen Ladungsträgern (Nelson and Harvey 1999; Forgac 2000). Zum Beispiel verhindern Defekte im Chloridkanal CLC-5 eine geregelte endosomale Ansäuerung in der Niere und verursachen u. a. die Dent'sche Erkrankung (Piwon, Gunther et al. 2000; Marshansky, Ausiello et al. 2002; Gunther, Piwon et al. 2003; Jentsch 2005; Jentsch 2007). Mutationen im Chloridkanal CLC-7 führen zur Osteopetrose (Kornak, Kasper et al. 2001).

1.8 oc-Mausmutante

Die $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase, auch OC116 genannt, wird in Mäusen durch das Gen *Atp6i/Atp6v0a3* kodiert und kommt spezifisch in der Ruffled Border der Osteoklasten vor. Fehlt die $\alpha 3$ -Isoform, so ist die Ansäuerung in der Resorptionslücke gestört und die Osteoklastenfunktion eingeschränkt. Sowohl die spontane osteosclerotic (oc) Mausmutante, die eine Deletion im *Atp6i/Atp6v0a3*-Gen aufweist, als auch das Knockout-Mausmodell weisen einen osteopetrotischen Phänotyp mit lethaler Folge auf (Li, Chen et al. 1999; Scimeca, Franchi et al. 2000). Die oc-Maus wurde im Jackson Laboratory erstmals 1967 als Spontanmutation der C57BL/6J-bf Linie beschrieben (Schlager and Dickie 1967). 1985 lieferte Marks eine genauere phänotypische Beschreibung der oc-Maus (Marks, Seifert et al. 1985). Beide Mausmodelle lassen sich, etwa 10 Tage nach Geburt, von den heterozygoten und Wildtyp-Geschwistern dadurch unterscheiden, dass sie kleiner sind und keinen Zahndurchbruch zeigen. Mit drei Wochen ist das Körpergewicht der Mausmutanten im Vergleich zu normalen Tieren bis zu 70% reduziert und die Lebenserwartung beträgt fünf bis sechs Wochen. In Röntgenaufnahmen sind verkürzte Knochenglieder und eine deutliche erhöhte Knochendichte zu sehen. Histologisch zeigen sich dicht angeordnete, untermineralisierte Knochen-, und Knorpeltrabekel und ein obliterierter Knochenmarkraum. Die Größe und Anzahl der Osteoklasten sind vergleichbar mit den Osteoklasten im Wildtyp. Allerdings entwickeln die Osteoklasten keine regelrechte Ruffled Border. (Udagawa, Sasaki et al. 1992; Nakamura, Takahashi et al. 1997). Einen Nachweis für eine fehlende Ansäuerung der extrazellulären Kompartimente lieferte die Acridin-Orange-Färbung. In Osteoklasten kamen lediglich Ansäuerungen lysosomaler Kompartimente zur Darstellung (Li, Chen et al. 1999), in denen die $\alpha 1$ -Untereinheit der H^+ -Atpase nachweisbar waren (Toyomura, Oka et al. 2000).

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die $\alpha 3$ -Isoform der V-ATPase wird zwar spezifisch in Osteoklasten exprimiert, kommt aber auch in anderen Gewebearten vor. Der erste Teil des von mir bearbeiteten Projektes beinhaltet die Durchführung von Multi-Tissue-Westernblots zur Untersuchung der Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit in Wildtyp-, und oc/oc-Organen. Im zweiten Teil meiner Arbeit wird der Phänotyp der oc-Mausmutante, die aus dem Jackson Laboratory stammt, makroskopisch und histologisch beschrieben. Der dritte Teil umfasst immunohistochemische und Immunofluoreszenz-Analysen zur Lokalisation der $\alpha 3$ -Untereinheit in Osteoklasten. Der angewandte polyklonale Antikörper gegen die $\alpha 3$ -Untereinheit wurde in der Arbeitsgruppe Jentsch (ZMNH) durch spezifische Immunisierungsmethoden im Kaninchen hergestellt. Mit dieser Arbeit ist der Gewinn weiterer Klärungen über die Lokalisation und Funktion der V-ATPase im Zusammenhang mit CIC-7 bezüglich des osteopetrotischen Krankheitsbilds zu erhoffen.

3 Material und Methode

3.1 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti-a3-Untereinheit 3972(K)	1:50	eigene Herstellung
Anti-a3-Untereinheit 3872 (K)	1:50	eigene Herstellung
Anti-a3-Untereinheit 4872(M)	1:50	eigene Herstellung
Anti-a3-Untereinheit 4772 (M)	1:50	eigene Herstellung
Anti-CLC-7 7N4 (K)	1:300	eigene Herstellung
Anti-31kDa-Untereinheit	1:50	Dr. Steve Gluck
Anti-Kaninchen/Peroxidase	1:2000	DAKO
Anti-Meerschweinchen/Peroxidase	1:2000	DAKO
Anti-Kaninchen/Alexa Fluor 546	1:2000	Molecular Probes
Anti-Kaninchen/Alexa Fluor 488	1:2000	Molecular Probes
Anti-Meerschweinchen/Alexa Fluor 546	1:2000	Molecular Probes
Anti-Meerschweinchen/ Alexa Fluor 488	1:2000	Molecular Probes

3.2 Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer 50% Glycerol; 1mM EDTA; 0,1%(w/v) Xylencyanol in H₂O/DEPC

TAE 10mM Natriumacetat; 1mM Na₂EDTA; 40mM Tris/HCL; pH 8,0

Tail-Puffer (Lysis-Puffer) 50mM KCL; 50mM Tris/HCL pH 8,0; 25mM EDTA; pH 8,0; 0,45% NP40; 0,45% Tween 20

Low TE 10mM Tris-HCL; pH 8,0; 0,1mM Na₂EDTA

PBS 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 7,4mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄

4% PFA 4% Paraformaldehyd wurden unter Rühren bei 70-80° C in PBS gelöst und nach Abkühlen filtriert.

PLP 2% PFA; 75mM Perjodat, 10mM Lysin in PBS pH 7,4

Immuno-Blocklösung 0,2% BSA; 10% Ziegenserum (NGS); 0,5% NP-40 in PBS

Immuno-Carrierlösung	0,2% BSA; 1% Ziegenserum (NGS); 0,5% NP-40 in PBS
Western-Blocklösung	5% Magermilchpulver; 0,2% NP-40; 1 x TBS
Western-Waschlösung	0,1% NP-40; 1 x TBS
Lysis-Puffer (Membranpräp)	140mM NaCl; 20mM Tris/HCl pH 7,6; 5mM EDTA; 1 x Complete

3.3 Molekularbiologische Methode

3.3.1 Isolierung von DNA aus Gewebe für die PCR-Genotypisierung

Ca. 0,5cm lange Schwanzenden wurden mit 500 μ l „Tail-Puffer“ und 20 μ l Proteinase K(14mg/ml Roche) in 1,5ml Eppendorf-Tubes über Nacht bei 55 $^{\circ}$ C inkubiert. Am nächsten Tag wurde pro Ansatz 10 μ l RNase A (10mg/ml) zugesetzt und für 1h bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Um die Proben von Proteinen zu befreien, wurden die Ansätze mit 500 μ l Phenol/Chloroform/Isomyalkohol (25:24:1) gemischt und eine halbe Stunde lang kopfüber rotiert. Hinterher wurden die Proben bei 4 $^{\circ}$ C für 20min mit 15.000Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge gesetzt. Die wässrigen Überstände wurden zur Fällung der DNA mit 40 μ l 8M LiCl sowie 400 μ l Isopropanol versetzt und leicht geschüttelt. Anschließend wurde zur Sedimentation genomischer DNA für 20 min bei 14000Upm zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden mit 70% Ethanol gewaschen und zum Trocknen für 5min in einen Wärmeblock bei 55 $^{\circ}$ C mit offenem Deckel gesetzt. Die getrockneten DNA-Pellets wurden in 150 μ l Low TE gelöst.

3.3.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Genotypisierung

Die Methode der PCR (Saiki et al) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Mittels der PCR ist es möglich, in vitro spezifische DNA-Sequenzen zu synthetisieren. Der PCR-Zyklus beginnt mit einer thermischen Denaturierung (90 $^{\circ}$ C-94 $^{\circ}$ C) des DNA-Doppelstrangs. An den entstandenen Einzelsträngen binden bei Temperaturen von etwa 50 $^{\circ}$ C (Annealingtemperatur) synthetische Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Sequenzen, die den zu amplifizierenden Abschnitt flankieren. Eine hitzestabile DNA-Polymerase

synthetisiert im nächsten Schritt den komplementären dazwischen gelegenen Sequenzabschnitt, von deren 3`-Ende ausgehend. Das entscheidende Prinzip der PCR ist eine zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird.

Von der aus der Schwanzbiopsie isolierten genomischen DNA-Lösung wurden je 1µl für einen 50µl PCR Ansatz genommen. Jeder Ansatz enthielt zudem 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 0,2µM je der drei Primer (Ocf2, Ocf3, Ocr2), 1U Taq-Polymerase (Life Technologie) und 5µl des zur Taq-Polymerase mitgelieferten Reaktionspuffer (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50mM KCl). Das Temperatur Protokoll war wie folgt:

1) Denaturierung	94°C	3 min	
2) Denaturierung	94°C	1 min	
3) Primerbindung	58°C	1 min	3 Zyklen
4) Extension	72°C	3 min	
5) Denaturierung	94°C	30 sec	
6) Primerbindung	56°C	30 sec	39 Zyklen
7) Extension	72°C	2 min	
8) Aufbewahrung	10°C		

3.3.3 Gelelektrophorese von DNA

Nukleinsäuren wandern als Anionen im elektrischen Feld zur Anode. Bei der Gelelektrophorese wandern die verschieden großen Fragmente mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit im Agarosegel, das den Molekülen einen starken Widerstand entgegensetzt.

Zu den zu analysierenden Proben wurden 1/10 Volumen DNA-Auftragpuffer pipettiert. Diese wurden dann in einem 1,5%igen Agarosegel bei 90V aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Kammern, die mit 1x TAE als Laufpuffer gefüllt waren. Auf einem UV-Transilluminator konnten die Banden durch das zuvor zugegebene 5µl Ethiumbromid/100ml Gelvolumen sichtbar gemacht und photographiert werden.

3.3.4 Filmmaterial

Zur Abbildung von Agarosegelen wurde ein Digital-Videosystem der Firma Intas (Göttingen) verwendet. Die Nachbearbeitung digitalisierter Bilder erfolgte mit Photoshop 5.0 (Adobe).

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Membranpräparation aus Organen

Frisch entnommene Organe der Maus wurden mit einer Rasierklinge auf einer eisgekühlten Platte zerkleinert und nach Zugabe von 5ml Lysispuffer pro Gramm Gewebe, wurde das Gemisch im Homogenisator auf Eis homogenisiert. Weitere 5ml Lysispuffer wurden zum Homogenat hinzugefügt und zunächst 2mal 10min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde danach ein drittes Mal für 30min bei 4°C und 50000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Membranpellets wurden in eine Lösung mit 0,1% NP-40 und 1x Complete (Roche) in PBS (pH 7,4) aufgenommen.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page)

Proteine wurden nach dem Laemmli-System (Laemmli, 1970) gemäß ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Hierzu wurden die Proteinlösungen mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min auf 50°C bis 60°C erhitzt. Die anschließende Elektrophorese erfolgte auf 5%igen vertikalen Trenngelen bei 80V in Minigelkammern (Hofer Scientific). Als Molekulargewichtsmarker wurden gefärbte Proteinstandards (wie der Benchmarker von Gibco Brl) verwendet.

3.4.3 Western-Blot

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese in Methanoltransferpuffer equilibriert. Im Tank mit Transferpuffer wurden blasenfrei auf 3 Lagen Filterpapier (3MM Whatman) eine Nitrozellulosemembran (Protan 0,45µm Porengröße, Schleicher & Schuell) gelegt und auf die Membran das Gel gebettet. Auf das Gel kamen wiederum 3 Lagen Filterpapier. Der Transfer wurde in einer Tankblotkammer (Hofer Scientific) mit Transferpuffer bei 70V für 3h oder über Nacht bei 20V, jeweils bei 4°C unter leichtem Rühren durchgeführt. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran anschließend mit Ponceau S gefärbt. Für die Immundetektion wurde die Membran für 30min bei 37°C in Blockpuffer gelegt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper in Blockpuffer für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Im nächsten Schritt wurde die Membran dreimal gewaschen und erneut 30min geblockt, bevor die Membran mit einem

Peroxidase-markierten Zweitantikörper in Blockpuffer 1h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Membran wurde 3-4x mit dem Western-Waschpuffer gewaschen und mit entionisiertem Wasser gespült. Zur Detektion wurde das Renaissance Kit, Du Pont, verwendet. Die Membran wurde für 1min mit der Reaktionslösung beschichtet, die Luminol als Substrat für die Peroxidase enthält. Auf die in eine Plastikfolie eingeschlagene Membran wurde ein Röntgenfilm gelegt und wurde mit Hilfe eines Curix 60 (AFGA) automatisch entwickelt.

3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration an Gesamtprotein einer Lösung wurde mit BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt. Als Standard dienten BSA-Verdünnungsreihen.

3.5 Histologische Techniken

3.5.1 Paraffinschnitte

Die perfusionsfixierten Organe wurden durch eine ansteigenden Isopropanolreihe (60%, 75%, 90% für je 3h und 100% für 12h) entwässert und dann für weitere 12h in einem 1:1 Gemisch aus 100% Isopropanol und reinem Paraffin bei 62°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in reines Paraffin umgelagert und für mindestens 12h im 62°C Ofen inkubiert. Zur Einbettung der Präparate wurde ein halbautomatisches Einbettungsgerät (Leica EG1160) verwendet. Die Paraffinblöcke wurden am Mikrotom 5µm-7µm dick geschnitten, die Schnitte wurden daraufhin im warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Um eine bessere Haftung der Präparate am Objektträger zu erzielen, wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C gelagert. Vor einer Weiterbehandlung der Präparate wurden diese entparaffiniert, indem sie für je 5min in Xylolersatz und in eine absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 70% und 50%) eingelegt wurden.

3.5.2 Gefrierschnitte

Da die meisten Oberflächenantigene durch die Fixation zerstört und für antikörper-immunohistologischen Anwendungen unzugänglich werden können, wurden Gewebeproben alternativ entweder auf Trockeneis in Tissue

Freezing Medium eingefroren oder in Flüssigstickstoff eingetaucht und bei -80°C aufbewahrt. Die gefrorenen Gewebelöckchen wurden in einem Kryotom der Firma Leica bei -20°C 10µm-20µm dick geschnitten und auf Objektträger gezogen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -80°C. Vor Beginn einer Weiterverwendung wurden die Schnitt mit 4% PFA für 5min nachfixiert und darauf mit PBS gespült.

3.5.3 Eindeckeln von Gewebeschnitten

Um die Gewebeschnitte zu entwässern, wurden diese durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 100%) für je 5min gezogen und abschließend für 10min in Xylolersatz inkubiert. Die Objektträger mit den Präparaten wurden dann mit einem mit Entellan bestrichen Deckgläschen eingedeckelt.

3.5.4 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxilin-Eosin-Färbung wurde zum einen Hämatoxilin in Form der Mayer'schen Lösung der Firma Merck verwendet und zum anderen wurde eine Eosinlösung aus 0,1% Eosin und 0,05% Erythrosin G in Wasser eingesetzt. Die Schnitte wurden 5min in die Hämatoxilinlösung, dann zweimal 2min in Wasser getaucht und hinterher unter laufendem Leitungswasser für 5min gehalten. Danach wurden die Schnitte 10min in Eosinlösung inkubiert, in Wasser gewaschen, entwässert und eingedeckelt.

3.5.5 Färbung mit Toluidinblau

Toluidinblau wurde zur Färbung von Knochenschnitten und zur Gegenfärbung von immunhistochemischen DAB-Färbungen genutzt. Die Färbelösung wurde aus 1% Toluidinblau O und 1% Natriumretraborat gemischt und vor Gebrauch filtriert. 5-10min wurden die Knochenschnitte in der Färbelösung inkubiert, dann entwässert und eingedeckelt.

3.5.6 Färbung mit Methylengrün

Zur Gegenfärbung der TRAP-Färbung wurde Methylengrün eingesetzt. Dazu wurden 1g Methylgrün in 100ml Wasser gelöst und 25ml Ethanol absolut

zugesetzt. Die Schnitte wurden nach der Färbelösung mit Wasser gespült, in 70% und 100% Ethanol differenziert und eingedeckelt.

3.5.7 Nissl-Färbung

Diese Färbung stellt spezifisch die Nissl-Schollen der Neuronen dar. Die Schnitte wurden für 5min in der Färbelösung von 1% Kresylviolett in 90% Ethanol inkubiert. Bei Paraffinschnitten erfolgte das Differenzieren mit einem Entfärbegemisch aus 96% Ethanol und 5% Eisessig für 10sec und bei Kryoschnitten wurde bis zu 5min differenziert. Danach wurden die Objektträger nacheinander in 90%, 100% Ethanol und abschließend in Xylolersatz für je 5min gelegt und schließlich eingedeckelt.

3.5.8 TRAP-Färbung

Die Tartat-resistente saure Phosphatase (TRAP) ist ein Enzym, das hauptsächlich in Osteoklasten exprimiert ist. 1mg Naphtol-As-MX-Phosphat wurden in 100µl N-N-Dimethylformamid gelöst und mit einem Puffer (pH5) aus 40mM Natriumacetat und 10mM Natriumtartat auf 10ml aufgefüllt. 6mg Fast-Red-Violet LB wurden zugegeben und etwa für 5min im Ultraschallbad aufgelöst. Die Schnittpräparate wurden mit dieser Färbelösung für 10min überschichtet, mit PBS gewaschen und eingedeckelt.

3.5.9 Immunhistochemie mit ABC-Methode

Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein (Teramer) mit vier Bindungsstellen für Biotin, ein wasserlösliches Vitamin. Heute wird ein neueres Produkt verwendet, das Streptavidin, das aus *Streptomyces avidinii* isoliert wird. Nachdem der Primärantikörper an das zu bestimmende Antigen gebunden hat, wird als Zweitantikörper ein Brückenantikörper verwendet, der mit Biotin markiert (biotinyliert) ist und somit in der Lage ist eine Verbindung zum ABC-Komplex herzustellen. An den Komplex ist eine Peroxidase gekoppelt, die ein Substrat in einen unlöslichen Farbstoff umwandelt und so die Antikörper sichtbar macht. Diese Methode besitzt auf Grund der hohen Affinität des ABC-Komplexes eine hohe Empfindlichkeit.

Zur Vorbehandlung wurden die entparaffinierten Schnitte zunächst in einer Citrat-Puffer Lösung (pH 6) durch Wärmeeinwirkung für 5min in der Mikrowelle demaskiert, d.h. die durch die Fixierung verursachte Proteinvernetzungen wurden aufgehoben. Die Präparate auf den Objektträgern wurden dann mit einem Fettstift umrandet und 0,1% SDS in PBS wurden zur Permeabilisierung auf die Schnitte getropft. Nach 5 minütiger Einwirkung wurde zweimal mit PBS gewaschen. Kryoschnitte wurden ohne Wärmebehandlung lediglich mit PFA nachfixiert, mit SDS permeabilisiert und mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden darauf in 0,3% H₂O₂ in Methanol 30min lang inkubiert, wodurch die endogenen Peroxidasen zerstört wurden. Es folgte ein nochmaliges Waschen mit PBS und eine 1 stündige Inkubation in Blockerlösung (0,2% BSA/ 10% Ziegenserum (NGS)/ 0,5% NP-40 in PBS), um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Anschließend wurden die Primärantikörper in Carrierlösung (0,2% BSA/ 1% NGS/ 0,5% NP-40) entsprechend verdünnt und aufgetragen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Der Zweitantikörper wurde am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen in einer Verdünnung von 1:1000 in Carrierlösung auf die Präparate pipettiert. Nach 2h Inkubationszeit wurden die Schnitte gewaschen und es folgte eine weitere 2 stündige Inkubation mit dem ABC-Kit (A und B 1:1000 verdünnt in PBS). Erneut wurden die Schnitte mit PBS und dann mit Tris-Puffer gewaschen. Zur Entwicklung der Präparate wurde eine DAB-Substratlösung (10ml 50mM TrisCl pH 7,6/ 100µl 50mg/ml DAB/ 100µl 1M Imidazol/ 1ml 3% Ammoniumnickelsulfat) hergestellt und unter dem Abzug aufgetragen. Nach 10 minütiger Vorinkubation wurden 10µl 3% H₂O₂ zu 5ml DAB-Lösung hinzugefügt. Ein letztes Mal wurden die Schnitte gewaschen, entwässert und eingedeckelt. Wenn erwünscht, wurde zuvor noch mit einer Färbelösung gegen gefärbt.

3.5.10 Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenzmethode läuft ähnlich der ABC-Methode ab. Anstelle eines Enzyms ist der Zweitantikörper jedoch an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Durch UV-Licht wird dieser Farbstoff zur Emission von sichtbarem Licht angeregt, so dass im Mikroskop ein Farbsignal sichtbar wird. Neben einer schnellen und einfachen Anwendbarkeit dieser Methode ist ein Vorteil, dass bis zu drei verschiedene Antikörper für Kollokalisationsstudien benutzt werden können. Mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop ist es außerdem möglich Objekte in mehreren Ebenen darzustellen.

Wie bei der ABC-Methode kann eine Vorbehandlung zur Demaskierung erfolgen. Danach wurde wie gehabt blockiert (2% BSA/ 0,5% NP-50 in PBS) und hinterher wurden die Erstantikörper in ihrer entsprechenden Verdünnung in Carrierlösung (2% BSA in PBS) aufgetragen und zunächst für 1h bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Tag darauf wurden die Schnitte mit salzhaltigem PBS und einfachem PBS gewaschen und dann nach Auftragen der mit fluorochrommarkierten Zweitantikörper (Cy2/ Cy3/ Cy5 1:1000 bis 1:2000 verdünnt in PBS) für 2h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Vor dem Eindeckeln wurden die Schnitte gewaschen und entwässert.

3.5.11 Färbung der Zellkerne mit TOTO-3 Iodid

TOTO-3 Iodid (Molekular Probes) ist ein Fluorochrom, der Licht von 633nm absorbiert und nach Interkalierung in DNA, Photonen bei 660nm Wellenlänge emittiert. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper bei Immunfluoreszenzversuchen, wurde im vorletzten Waschschrift 0,1µM TOTO-3 in PBS für 5min bei Raumtemperatur auf die Präparate pipettiert. Dann wurden die Schnitte abschließend wie üblich nochmals gewaschen und eingedeckelt.

3.6 Mikroskopie

Die histologischen Untersuchungen wurden am konfokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS NT und an einem Zeiss Axiophot Mikroskop durchgeführt, dem ein Kamerasystem von Optronics engineering angeschlossen war. Die Photos wurden mittels MetaMorph-Software angefertigt.

Das Prinzip des Lichtmikroskops beruht darauf, dass ein Objekt durch optische Abbildung mit mindestens zwei Linsensystemen, dem Objektiv und dem Okular, vergrößert wird. Dabei bildet zunächst das Objektiv das Objekt in ein reales Zwischenbild ab, welches durch das Okular analog zur Lupe vergrößert betrachtet wird. Die Vergrößerung des Mikroskops ergibt sich durch das Produkt aus Objektiv-, und Okularvergrößerung. Das Konfokalmikroskop ist eine Variante des Lichtmikroskops, das optische Schnitte mit mikroskopischer Auflösung in räumlich ausgedehnten Objekten

erzeugen kann. Mit einem Computer können diese Schnittbilder schichtweise zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden.

3.7 Tierversuche

3.7.1 Narkotisierung von Versuchstieren

Zur Narkotisierung der Tiere vor der Perfusionsfixierung wurden 80µl 1% Xylazinhydrochlorid und 120µl 10% Ketaminhydrochlorid gemischt und auf 1ml mit PBS aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 100µl pro 10g Körpergewicht dem Tier peritoneal injiziert.

3.7.2 Perfusionsfixierung

Der Brustkorb eines durch Injektion narkotisierten Tieres wurde eröffnet und mittels einer Butterfly-Kanüle wurde 0,01% Heparin in PBS mit einem Druck von 180 mm/Hg unter Eröffnung der rechten Herzkammer in die linke Herzkammer infundiert. Nach etwa 2min folgte bei konstantem Druck die Perfundierung mit der Fixierlösung für 3-5min in die Herzkammer. Als Fixierlösung wurden die PLP-Lösung und 4% PFA genutzt. Den Mäusen wurden Tibiae, Gehirn, Niere und Augen entnommen. Tibiae wurde über Nacht in der verwendeten Fixierlösung bei 4°C immersionsfixiert und dann für 5 Tage in 250mM EDTA bei 4°C entkalkt. Die übrigen Organe wurden nach der Perfusionsfixierung für eine weitere halbe Stunde immersionsfixiert.

4 Ergebnisse

4.1 Detektion der $\alpha 3$ -Untereinheit im Multi-Tissue-Westernblot

Mit dem spezifischen gegen die $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase gerichteten Antikörper, ließ sich das 116kDa große Protein in verschiedenen Organen der Wildtyp-Mäuse nachweisen. Besonders stark wurde das $\alpha 3$ -Protein in der Niere, Cortex und Auge exprimiert. Im Homogenat der Membranpräparationen von $\alpha 3$ -defizienten Mäusen war keine 116kDa Bande nachweisbar (Abbildung 2.1).

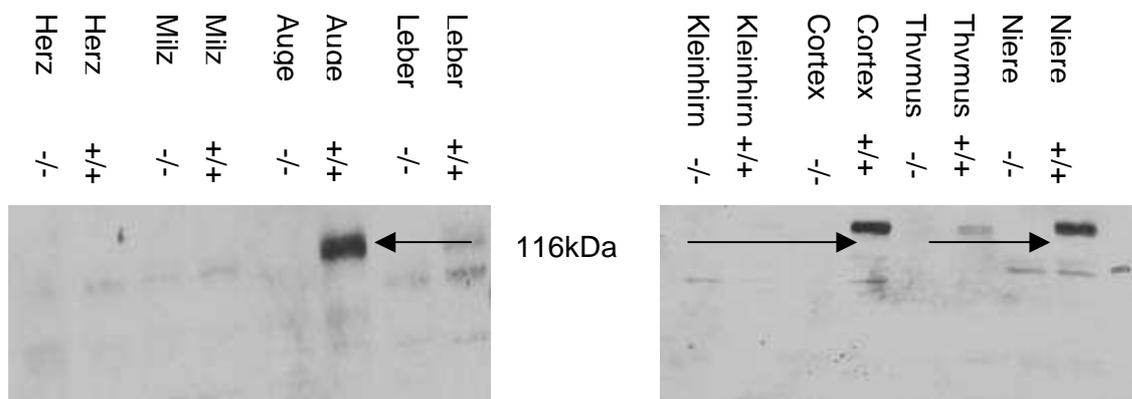


Abbildung 2.1: Westernblot Analyse der Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit in Organlysaten von Wildtyp-Tier und *oc*-Mausmutante

4.2 Phänotypische Charakterisierung der *oc/oc*-Maus

4.2.1 Makroskopische Veränderungen

Nach den Regeln des autosomal rezessiven Erbgangs brachte die Vererbung der *oc*-Mutation einen Anteil von 25% *oc/oc*-Tiere hervor. Die *oc/oc*-Tiere waren in den ersten Tagen nach Geburt von den normalen Geschwister-Tieren nicht zu unterscheiden. Im Alter von 10 Tagen waren die *oc/oc*-Mäuse, obwohl eine ausreichende Nahrungsaufnahme gewährleistet war, äußerlich durch eine verminderte Größe und durch ein reduziertes Körpergewicht zu identifizieren. Die Fellfarbe und Fellbeschaffenheit glichen dem des Wildtyps.

Da bei den meisten oc/oc-Mäusen keine Zähne sichtbar waren, oder der Zahndurchbruch nur unvollständig erfolgt war, erhielten die Tiere ein spezielles Flüssigfutter. Auffallend waren mit dem Alter zunehmende kreiselnde Körperbewegungen. Außerdem zeigten die Tiere eine gesteigerte Erregbarkeit und wirkten unsicher und schreckhaft. Die oc/oc-Mäuse blieben bis maximal 40 Tage am Leben. Häufig verstarben die oc/oc-Mäuse aus noch unklaren Ursachen bereits vor der dritten Lebenswoche. Eine mögliche Erklärung für ihren frühzeitigen Tod könnte sein, dass die Tiere in Stresssituationen hyperventilieren und bei einem niedrigen Kalziumspiegel an tetanischen Krämpfen versterben. Unterschiede zwischen dem Phänotyp heterozygoter und Wildtyp-Tiere, sowie geschlechtsspezifische Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

4.2.2 Histologische Analyse des Knochens

Makroskopisch waren die Röhrenknochen der oc/oc-Tiere im Vergleich zu den der Wildtyp-Tiere verkürzt und die Epiphysen wirkten keulenförmig aufgetrieben. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Epiphysenfuge in Wildtyp-, und heterozygoten Tieren zeigten ein normal differenziertes Knorpelgerüst in regulärer vertikaler Anordnung (Abbildung 2.2.A). Auch die Knochenspongiosa bildete ein regelmäßiges Netzwerk durch gleichmäßig angeordnete Knochenbälkchen (Abbildung 2.2.C). Der Markraum war regelrecht ausgebildet und es fanden sich dort Zellen der Blutbildung.

Die histologische Knochenstruktur von oc/oc-Mäusen dagegen fiel durch eine abnorm verbreiterte, unorganisierte Zone des proliferierenden Knorpels im Bereich der Wachstumszone auf (Abbildung 2.2.B), ähnlich den charakteristischen Merkmalen einer rachitischen Stoffwechselstörung. In der Spongiosa waren breite, dichte, ungeordnete Osteoidtrabekeln eingelagert und es waren unregelmäßige Zungen von Knorpelspannen zu beobachten (Abbildung 2.2.D). Die Markhöhle war durch die massive Spongiosklerose hochgradig eingeengt und teilweise stark fibrosiert. Die eingeschränkte blutbildende Funktion des Knochenmarks schien durch die Milz und Leber ersetzt worden zu sein. Makroskopisch war eine Hepatosplenomegalie festzustellen.

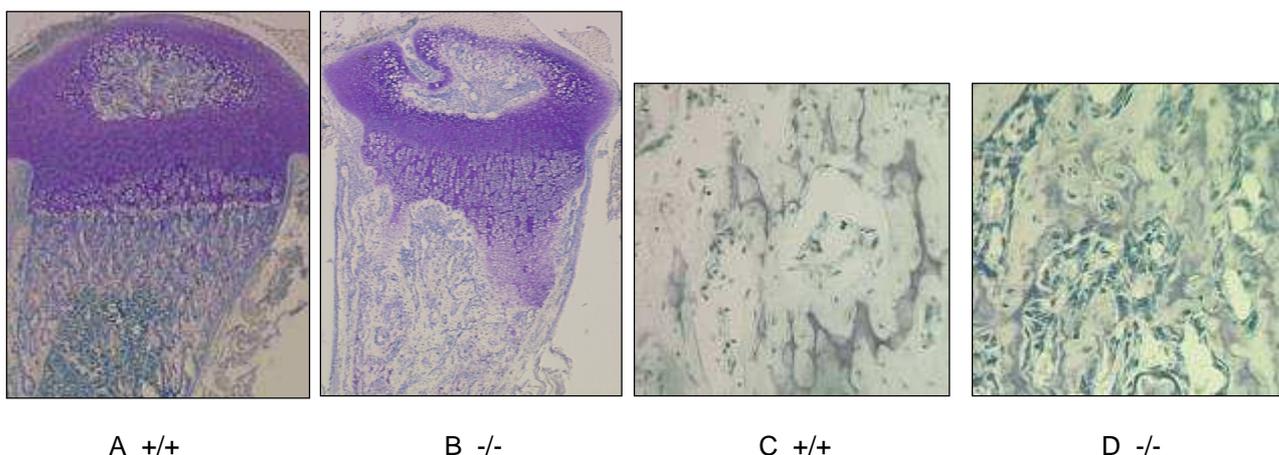


Abbildung 2.2: Toluidinblau gefärbte Paraffin-Schnitte der Tibiae vom Wildtyp-Tier und einer homozygoten *oc*-Mausmutante an Tag P28. (A,B) Tibia-Übersicht mit Darstellung der Epiphysenfuge. Vergrößerung 50x. (C,D) Ausschnitt aus Knochenspongiosa. Vergrößerung 200x.

4.2.3 Histologische Analyse der Retina

Das osteopetrotische Krankheitsbild bei Menschen ist häufig vergesellschaftet mit einer Sehverminderung bis hin zur völligen Erblindung (Gerritsen, Vossen et al. 1994; Steward 2003). Um zu prüfen, ob *oc/oc*-Mäuse, entsprechend den *Clcn7^{-/-}*-Mäusen, einen Verlust an Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht entwickeln oder andere Auffälligkeiten aufweisen, wurden die Augen der *oc/oc*-Mäuse histologisch untersucht. Anders als bei *Clcn7^{-/-}*-Mäusen war die Retina der *oc/oc*-Tiere (Abbildung 2.3.B) mit der der Wildtyp-Tiere (Abbildung 2.3.A) vergleichbar und schienen primär nicht betroffen zu sein.

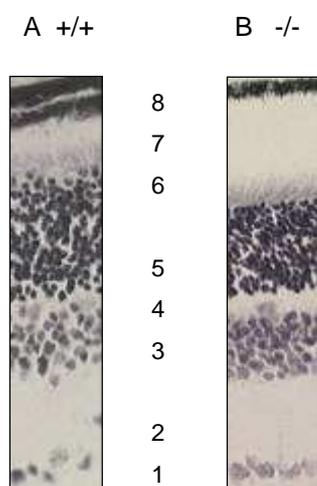


Abbildung 2.3: Nissl-Färbung der Retina einer Wildtyp- und *oc/oc*-Maus an Tag P28. Vergrößerung 100x.

1=Ganglienzellschicht, 2=Innere plexiforme Schicht, 3=Innere Körnerzellschicht, 4=Äußere plexiforme Schicht, 5=Äußere Körnerzellschicht, 6=Innere Segmente der Photorezeptoren, 7=Äußere Segmente der Photorezeptoren, 8=Retinales Pigmentepithel

4.2.4 CT-Befunde von der Schädelbasis

Um den Sehnervkanal zu beurteilen, wurden Mikro-CT-Aufnahmen vom oc/oc-Schädel im Vergleich zum Wildtyp-Schädel angefertigt. Die oc/oc-Maus zeigte eine massive Osteopetrose im Bereich des Schädels (Abbildung 2.4.B). Das Schädeldach war erheblich dicker und die Knochenstrukturen wirkten vergrößert und gestaucht im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Der Canalis opticus in der vorderen Schädelgrube, durch den der Sehnerv zur Orbita gelangt, war bei der oc/oc-Maus stark eingeengt ähnlich wie bei der *Clcn7^{-/-}*-Maus.

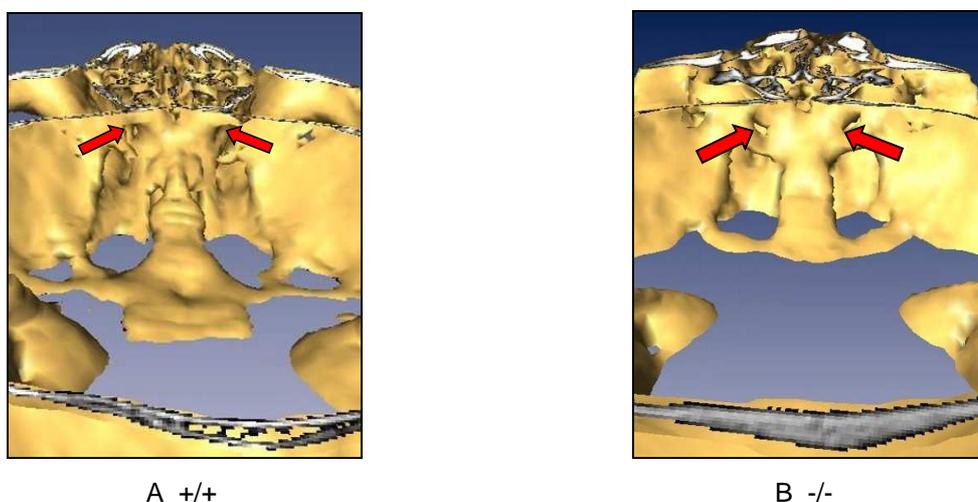


Abbildung 2.4: Mikro-CT vom Schädel einer Wildtyp-Maus und einer oc/oc-Mausmutante. Die Pfeile bezeichnen die Foramina des Canalis opticus.

4.2.5 Histologische Analyse des Gehirns

In einzelnen Osteopetrosefällen bei Menschen ist zum Visusverlust eine cerebrale Neurodegeneration beschrieben worden (Gerritsen, Vossen et al. 1994; Steward 2003). Klinisch äußert sich diese als mentale Retardierung und durch Krampfanfälle. Auch in den osteopetrotischen *Clcn7^{-/-}*-Mäusen wurde eine Neurodegeneration nachgewiesen. Die *Clcn7^{-/-}*-Mäuse zeigen neuronale Ablagerungen, die lysosomalen Speichererkrankungen sehr ähnlich sind und insbesondere an die Lipidspeichererkrankung neuronale Zeroidlipofuszinose erinnern (Kornak et al. 2001; Kasper, Planells-Cases, Fuhrmann, Scheel et al. 2005).

Die zum Vergleich angefertigten histologischen Hirnpräparate der oc/oc-Mäuse zeigten in der Nissl-Färbung dagegen keinerlei auffallende Veränderungen: Die corticalen Pyramidenzellen waren nicht geschwollen

(Abbildung 2.5.B) und die Zellarchitektur des Hippokampus erschien regelrecht (Abbildung 2.5.A). Es waren keine Hinweise für das Vorliegen von abgestorbenem Zellmaterial nachweisbar.

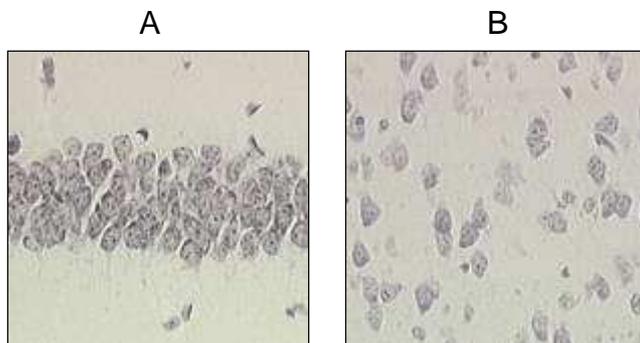
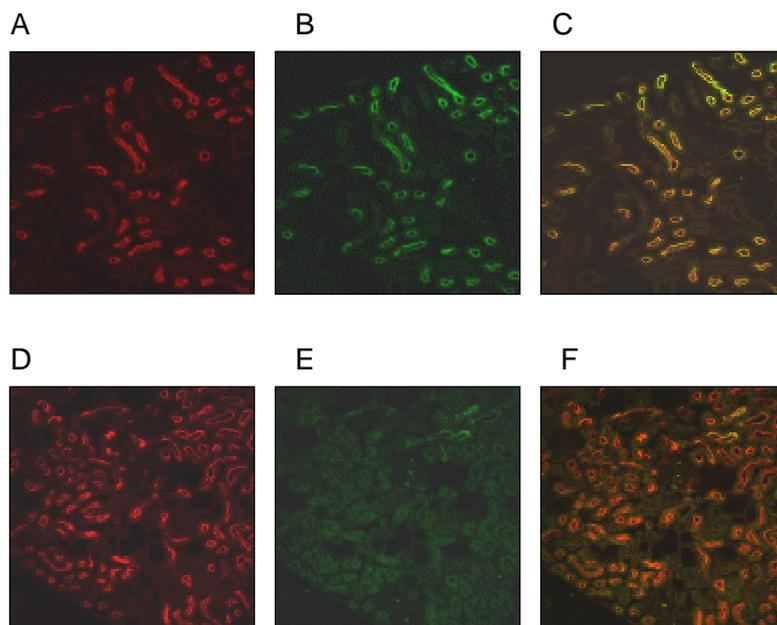


Abbildung 2.5: Nissl-Färbung von Hippocampus (A) und Cortex (B) einer oc/oc-Maus an Tag P33. Vergrößerung 200x.

4.2.6 Expression des Natrium-Phosphat-Kotransporters in der Niere

Der Natrium-Phosphat-Kotransporter-2 (Napi-2) ist ein Transportprotein, das in der Bürstensaummembran und in endozytotischen Kompartimenten von proximalen Tubuluszellen der Niere lokalisiert ist. Dieser ist zuständig für die Rückresorption von etwa 80% des über die Bürstensaummembran transportierten Phosphats. Napi-2 gelangt nach der Internalisierung in endozytotische Kompartimente (Murer, Hernando et al. 2003). Gegensätzlich zur Endozytose von Megalin, das als wichtigster apikaler Membranrezeptor der Niere einem Recyclingmechanismus unterliegt (Christensen and Birn 2002), wird Napi-2 in Lysosomen abgebaut und gelangt nicht zurück zur Plasmamembran. Die Endozytose von Napi-2 wird durch die Ausschüttung von Parathormon (PTH) und durch den Serum-Phosphat-Spiegel reguliert (Bacic, Lehir et al. 2006). Ein erhöhter PTH-Spiegel im Serum führt zu einer Internalisierung des Transporters. Bei Phosphatmangel dagegen wird zur Steigerung der Phosphat-Rückresorption kompensatorisch Napi-2 verstärkt in die Bürstensaummembran des proximalen Tubulus transportiert.

Die an das rachitische Krankheitsbild erinnernden, histologischen Veränderungen im Knochen der oc/oc-Mäuse sind hinweisend für eine gestörte Kalzium-, und Phosphat-Hömoostase. Mit Antikörpern gegen Napi-2 und Villin wurden die Nieren der oc/oc-Mäuse, im Vergleich zu denen der Wildtyp-Mäuse, mittels Immunofluoreszenz untersucht.



+/+

Abbildung 2.6: Expression des Natrium-Phosphat-Kotransporters 2 in der Niere einer Wildtyp- und oc-Knockout-Maus an Tag P19. (A,D) Villin (rot), (B,E) Napi-2 (grün), (C,F) Merge. Vergrößerung 50x.

-/-

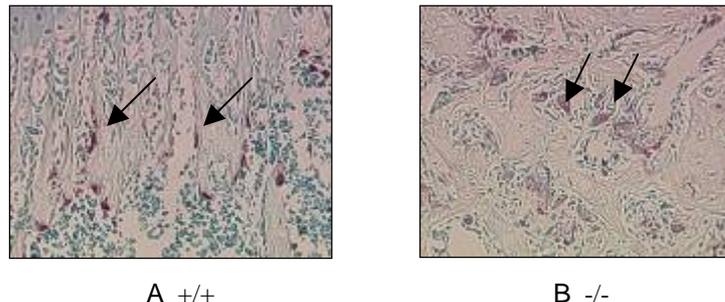
In den renalen Tubuluszellen sowohl der Wildtyp-Mäuse, als auch der oc/oc-Mäuse, war eine intensive Anfärbung der Bürstensaummembran durch den anti-Villin-Antikörper zu beobachten (Abbildung 2.6.A/D). Im Wildtyp war die Anfärbung von Villin kolokalisiert mit den Napi-2-Transportern, die in subapikalen Vesikeln unterhalb der Bürstensaummembran aufzufinden waren (Abbildung 2.6.C). Diese Lokalisation ist vereinbar mit dem oben beschriebenen lysosomalen Abbau der Napi-2-Transporter. In den oc/oc-Mäusen war die Anfärbung der Napi-2-Transporter insgesamt schwach ausgeprägt (Abbildung 2.6.E/F), was für eine herabgesetzte renale Phosphat-Rückresorption spricht. Die gleichmäßige Verteilung der Transporter in den Tubuluszellen könnte möglicherweise hinweisend sein für das Vorliegen einer systemischen Regulationsstörung, z. B. eines sekundären Hyperparathyreoidismus.

4.3 Untersuchung der Osteoklasten in oc/oc-Mäusen

4.3.1 Morphologie der Osteoklasten

oc/oc-Mäuse sind der Kategorie von osteopetrotischen Mausmutanten zu zuordnen, die eine Störung im Ansäuerungsmechanismus aufweisen. Eine ungestörte physiologische Knochenresorption ist elektronenmikroskopisch u.a. an der Beschaffenheit der Ruffled Border von Osteoklasten erkennbar. Als Ruffled Border, wird die aufgefaltete Oberfläche der Osteoklasten bezeichnet, die der Knochengrundsubstanz zugewandt ist. Durch die

Auffältelung wird die aktiv resorbierende Zelloberfläche vergrößert. Aktive Osteoklasten formen eine Lakune (Resorptionslakune) zwischen Knochen und der Ruffled Border, die sich in der histologischen Färbung (Toluidinblau-Färbung) als Aufhellung darstellt. Überdies sind reife Osteoklasten mittels der histochemischen TRAP-Färbung gut nachweisbar. Dabei werden die spezifisch Tartrat-resistenten sauren Phosphatasen in den Vesikeln der Osteoklasten rot angefärbt (Abbildung 2.7).



A +/+

B -/-

Abbildung 2.7: TRAP-Färbung von Osteoklasten (Pfeil) einer Wildtyp-Maus (A) und oc/oc-Mausmutante (B) an Tag P33. Vergrößerung 100x.

In den Knochenpräparaten der oc/oc-Mäuse waren unter dem Lichtmikroskop zahlreiche, relativ große, langgestreckte Osteoklasten zu sehen. Bezüglich der Anzahl und Größe der Osteoklasten waren keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyp und oc/oc-Mäusen festzustellen. Innerhalb der Osteoklasten waren etwa 2-7 Zellkerne zu zählen. Die oc/oc-Osteoklasten befanden sich zwischen der dichten unregelmäßigen Spongiosa und verstärkt an der Corticalis, wo eine langstreckige subperiostale Knochenneubildung zu beobachten war. Zwischen Knochen und Osteoklast kam die Resorptionslakune nur andeutungsweise zur Darstellung. Außerdem war in oc/oc-Osteoklasten keine starke Vakuolarisierung des Zytoplasmas zu beobachten, wie sie in Wildtyp-Osteoklasten zu sehen war. Zusammenfassend deutet der oben beschriebene histologische Knochenbefund auf eine gestörte Resorptionstätigkeit der oc/oc-Osteoklasten hin. Die Osteoklasten-Differenzierung scheint dagegen ungestört zu sein.

4.3.2 Lokalisation der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase in Osteoklasten

Die extrazelluläre Ansäuerung der Resorptionslücke wird durch die H^+ -ATPase im Zusammenspiel mit ClC-7 gewährleistet (Schlesinger, Blair et al. 1997; Kornak, Kasper et al. 2001). Unter Anwendung von immunhistochemischen Methoden wurde die Lokalisation der für die Osteoklasten spezifischen $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase im Knochen genauer bestimmt.

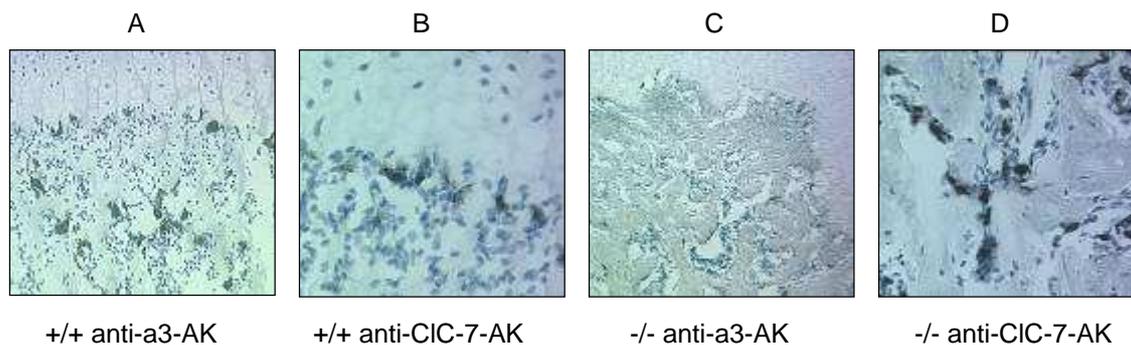


Abbildung 2.8: Immunhistochemische Untersuchung der Tibia mittels DAB-Färbung bei einer Wildtyp- und oc/oc-Maus an Tag P19. Vergrößerung 100x.

Die Färbung mit dem anti- $\alpha 3$ -Antikörper und einem enzymgekoppelten Zweitantikörper zeigte, sowohl im Paraffin-, als auch im Gefrierschnitt von Wildtyp-oc-Knochen deutliche, homogen verteilte Signale im Zytoplasma der Osteoklasten (Abbildung 2.8.A). Die Gegenfärbung mit Toluidinblau hob die Multinuklearität der Osteoklasten hervor. In einer weiteren Untersuchung wurden die Wildtyp-oc-Knochen mit dem anti-ClC-7-Antikörper angefärbt (Abbildung 2.8.B). Hierbei schienen die ClC-7-Signale sich verstärkt an die Knochen zu gewandte Seite der Osteoklasten zu konzentrieren. Vergleichend zum Wildtyp folgte die Analyse der oc/oc-Knochen. Andeutungsweise konnten sehr schwache $\alpha 3$ -Anfärbungen innerhalb der Osteoklasten in der Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop detektiert werden (Abbildung 2.8.C). Die ClC-7-Signale im oc/oc-Knochen kamen, ähnlich wie die Signale im Wildtyp, sehr stark zur Darstellung (Abbildung 2.8.D).

In Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten sich korrelierende Ergebnisse: Der Wildtyp zeigte eine Konzentrierung des ClC-7 Chloridkanals an der Ruffled Border (Abbildung 2.9.B) und eine Verteilung der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase im Zytoplasma (Abbildung 2.9.A). Zudem waren in der konfokalen Laser-Mikroskopie eindeutige Überlappungen von $\alpha 3$ und ClC-7 im Osteoklasten-Zytoplasma zu sehen (Abbildung 2.9.D). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bei aktiven Osteoklasten ClC-7 und $\alpha 3$

überwiegend in gleichen Vesikeln sitzen, und CIC-7 dann präferentiell zur Ruffled Border gelangt.

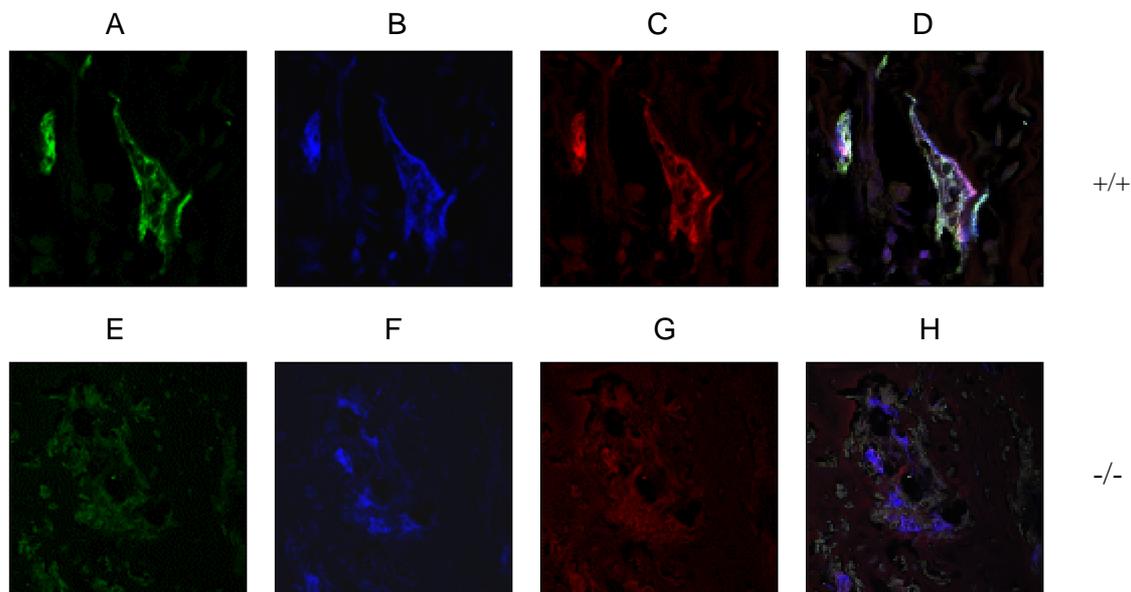


Abbildung 2.9: Immunofluoreszenz Analyse der Tibia mit verschiedenen Antikörpern bei einer Wildtyp- und oc/oc-Maus an Tag P19. (A,E) a3-Untereinheit der V-ATPase (grün), (B,F) CIC-7 (blau), (C,G) 31kd Protein (rot), (D,H) Merge. (A-D) Vergrößerung 300x. (E-H) Vergrößerung 100x.

Ein weiteres interessantes Verteilungsmuster zeigten Färbungen mit dem anti-31kd-Antikörper. Dieser Antikörper ist gegen ein Epitop des E1 Sektors des V1 Komplexes gerichtet, das in den V-Typ-Protonenpumpen vorkommt. In Wildtyp-Knochen war auffällig, dass sich stellenweise, intensive 31-kd-Signale in der Ruffled Border und in intrazellulären Vakuolenmembranen identifizieren ließen (Abbildung 2.9.C), die größtenteils mit CIC-7 kolokalisierten (Abbildung 2.9.D). Dieses Verteilungsmuster unterstützt die These, dass CIC-7 als Ausgleichsstrom für die V-Typ-Protonenpumpe eine wichtige Rolle spielt. Auch an Nieren war eine endosomale Kolokalisation der 31-kd-Signale mit CIC-5 feststellbar.

In oc/oc-Knochenschnitten waren mit dem anti-a3-Antikörper in der Immunfluoreszenz-Anfärbung nahezu keine Signale sichtbar (Abbildung 2.9.E). Wohingegen unter Anwendung des anti-31kd-Antikörpers oc/oc-Osteoklasten durch eine schwache Fluoreszenz zu detektieren waren (Abbildung 2.9.G). Die Immunfluoreszenz mit dem anti-CIC-7-Antikörper in oc/oc-Osteoklasten zeigte eine starke Intensität vesikulärer Signale, die im gesamten Zytoplasma homogen verteilt waren (Abbildung 2.9.F). Eine Konzentration von CIC-7 zur oc/oc-Osteoklastenoberfläche war nicht zu beobachten. Dies deutet auf eine ungenügend ausgebildete Ruffled Border inaktiver Osteoklasten hin.

5 Diskussion

5.1 Einfluss der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase auf den Knochenphänotyp im Vergleich zu CIC-7

In ca. 50-60% der Patienten, die an der infantilen malignen autosomal rezessiven Osteopetroseform (ARO) leiden, wurden Mutationen im *TCIRG1*-Gen gefunden (Michigami 2002; Scimeca et al. 2003; Susani et al. 2004). Das *TCIRG1* kodiert die $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase, die spezifisch in der Ruffled Border der Osteoklasten lokalisiert ist und Protonen in die Resorptionslakune sezerniert. Fehlt die $\alpha 3$ -Untereinheit, ist in Folge der Unfähigkeit der Osteoklasten das extrazelluläre Kompartiment anzusäuern, ein völliges Ausbleiben der Knochenresorption zu erwarten.

Parallel zum humanen osteopetrotischem Knochenphänotyp weisen die osteopetrotischen *oc/oc*- und *Clcn7^{-/-}*- Mausmutanten, denen das Gen für die $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase bzw. für CIC-7 fehlt, bezüglich der makroskopischen und histologischen Ausprägung des Knochenphänotyps und hinsichtlich der Morphologie und Funktion der Osteoklasten eine gute Übereinstimmung. Osteoklasten in *oc/oc*-Mäusen und *Clcn7^{-/-}*- Mausmutanten entwickeln keine regelrechte Ruffled Border und weisen im Pit Assay einen völligen Funktionsverlust auf. Bei beiden Mausmodellen kommen die extrazellulären Kompartimente zwischen Osteoklasten und Knochen in der Acridin-Orange-Färbung nicht zur Darstellung, was hinweisend ist für eine fehlende Ansäuerung (Li et al. 1999). Ein Kompensationsmechanismus für die fehlende $\alpha 3$ -Untereinheit bzw. fehlenden CIC-7-Kanal in *oc/oc*-Mäusen bzw. *Clcn7^{-/-}*-Mäusen scheint nicht zu existieren. Dies bekräftigt die Hypothese, dass ein ungestörtes Zusammenspiel der H^+ -ATPase mit CIC-7 von zentraler Bedeutung für die Funktion der Osteoklasten ist.

Patienten mit *TCIRG1*-Mutationen scheinen insgesamt ein engeres klinisches Spektrum aufzuweisen als Patienten mit *CLCN7*-Mutationen (Campos-Xavier et al. 2005; Chu et al. 2006). Mutationen im *CLCN7*-Gen wurden interessanterweise sowohl bei Patienten mit autosomal rezessiver

Osteopetrose als auch autosomal dominanter Osteopetrose beobachtet. Im Gegensatz zur rezessiven Form verläuft die dominante Osteopetroseform milder. Die dominanten Mutationen in CIC-7 setzen scheinbar die Osteoklastenaktivität herab, während durch rezessive Mutationen die Funktion der Osteoklasten völlig blockiert werden und zu einer abnorm erhöhten Knochenmasse führen. Daher ist zu vermuten, dass Mutationen in CIC-7 an der Regulation der Knochenmasse beteiligt sind (Kornak, Ostertag et al. 2006).

5.2 Retinaler Phänotyp der *Clcn7^{-/-}*-Maus verglichen zur *oc/oc*-Maus

Eine verminderte Sehfähigkeit bei Osteopetrosepatienten ist eine häufig auftretende neurologische Komplikation (Keith 1968; Beighton and Hamersma 1985; Ruben, Morris et al. 1990; Siatkowski, Vilar et al. 1999; Waguespack, Hui et al. 2007). Als Ursache werden zum einem sekundäre Folgen einer Sklerosierung der Schädelknochen mit Verengung des Canalis opticus oder einer intrakraniellen Hirndruckerhöhung durch Verengung des Foramen jugulare, die zu Papillenödemen und einer Atrophie des Sehnervs führen (Siatkowski, Vilar et al. 1999), diskutiert. Zum anderem liefern eine Reihe von Berichten Hinweise für das Vorliegen einer primären Retinadegeneration. Beispielsweise wurde in zahlreichen Fällen trotz operativer Dekompression des Sehnervs oder erfolgreicher Knochenmarkstransplantation ein Fortschreiten der Sehverschlechterung beschrieben (Thompson, Kriss et al. 1998; Abinun, Newson et al. 1999). Auch konnte nicht bei allen sehunfähigen Patienten computertomographisch oder post mortem eine Sklerosierung der Schädelknochen mit Verengung des Sehnervkanals und Kompression des Sehnervs festgestellt werden. Elektrophysiologische und ophthalmoskopische Untersuchungen sprachen ebenfalls für eine primäre Retinadegeneration und nicht für eine sekundäre Schädigung des Sehnervs (Hoyt and Billson 1979; Ruben, Morris et al. 1990).

Zur weiteren Abklärung der retinalen Veränderungen wurden die Augen der osteopetrotischen Mausmodelle, der *Clcn7^{-/-}*- und *oc/oc*-Maus, näher untersucht. Schädel-CT-Aufnahmen der *Clcn7^{-/-}*- und der *oc/oc*-Maus zeigten manifeste osteopetrotische Symptome: Die Schädeldecke war massiv verdickt und der Canalis opticus war stark eingeengt. Weiterführende histologische Untersuchungen ergaben bei erst 2-4 Wochen alten *Clcn7^{-/-}*-

Mäusen eine Retinadegeneration mit einem fast kompletten Verlust der Photorezeptoren und einer unversehrten bis geringfügig verringerten Ganglionzellschicht (Kornak, Kasper et al. 2001). In der Literatur wurde ein nahezu identisches histologisches Bild bei einem post mortem untersuchten Osteopetrose-Patienten beschrieben, allerdings ohne Anhalt für Kompressionsschäden des Sehnervs (Keith 1968). Da eine Kompression des Sehnervs in der Regel zunächst retrograd die Ganglionzellschicht schädigen würde und nicht die Photorezeptoren, sprechen diese histologischen Befunde eher für eine primäre Retinadegeneration. Diese Hypothese wurde durch Elektroretinogram-Analysen bestätigt. Lichtimpulse lösten nur geringe elektrophysiologische Reaktionen in der Retina der *Clcn7^{-/-}*-Mäuse aus (Kasper, Planells-Cases et al. 2005). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen zeigte das histologisch untersuchte Auge der *oc/oc*-Maus eine regelrechte Retina. Weiterhin konnten im Elektroretinogramm keine Unterschiede zwischen den elektrophysiologischen Reaktionen der *oc/oc*-Retina und der Wildtyp-Retina festgestellt werden (Kasper, Planells-Cases et al. 2005).

Zusammenfassend war bei den *oc/oc*-Mäusen, trotz computertomographisch festgestellter Verengung des *Canalis opticus*, kein Sehverlust zu beobachten. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass das frühzeitige Versterben der *oc/oc*-Mutanten die Entwicklung sekundärer Sehnervschäden verhindert haben. In Zusammensicht ist aus den Ergebnissen zu schließen, dass bei hochgradig fortschreitender Sehunfähigkeit sekundäre Kompressionsschäden des Sehnervs vermutlich eine untergeordnete Rolle spielen. Bei Osteopetrosepatienten mit neurologischen Problemen liegen wahrscheinlich eher Mutationen in *CIC-7* vor. Mutationen in der $\alpha 3$ -Untereinheit der V-Typ H^+ -ATPase scheinen eher seltener mit neurologischen Komplikationen assoziiert zu sein.

Im Multi-Tissue-Westernblot zeigte sich mit dem Antikörper gegen die $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase beim Wildtyp-Tier eine deutliche Expression in der Membranpräparation vom Auge. Im Allgemeinen ist die V-Typ H^+ -ATPase an Ansäuerungsprozessen von endosomalen Vesikeln und Lysosomen beteiligt und schafft ein pH-Optimum für proteolytische Enzyme, so auch u. a. im phagolysosomalen System des retinalen Pigmentepithels (RPE) (Deguchi et al. 1994). Zellen des RPE sind aktive Phagozyten, die zuständig sind für den Abbau der distalen Segmente der Photorezeptoren (Nguyen-Legros and Hicks 2000). Versuche mit Bafilomycin A1, einem spezifischen Inhibitor der H^+ -ATPase, führte zu erhöhten pH-Werten und verhinderte den Abbau der Photorezeptoren. Erstaunlicherweise lag keine

Störung in der Fusion der Phagozyten mit den Lysosomen vor. Indes war die Retinadegeneration mit der Abbaustörung der Photorezeptoren rückzuführen auf die inaktiven lysosomalen Enzyme auf Grund des verschobenen pH-Werts (Deguchi et al. 1994). Als ubiquitär vorkommendes lysosomales Protein wurde Cathepsin D in den Lysosomen und Phagolysomen des retinalen Pigmentepithels nachgewiesen (Hayasaka, Hara, Mizuno 1975). Korrelierend war bei der histologischen Analyse des Cathepsin D-Knockout-Tiers eine Degeneration der Photorezeptoren festzustellen (Koike et al. 2000).

Auf Grund der unversehrten Retina in der oc/oc-Maus stellt sich die Frage, ob die Funktion der $\alpha 3$ -Untereinheit durch andere Untereinheiten der V-Typ H^+ -ATPase oder andere Protonentransporter kompensiert werden kann. Interessant wären dazu u. a. Experimente mit Bafilomycin A in oc/oc-Zellen. Außerdem könnte eine Bestimmung der genauen Lokalisation der $\alpha 3$ -Untereinheit in der Retina z. B. mittels immunhistochemischer Methoden zu weiteren Erkenntnissen beitragen, um die Funktion der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase im Auge zu klären.

Im retinalen Pigmentepithel (RPE) sind verschiedene Formen von Cl^- -Kanälen gefunden worden (Weng, Godley et al. 2002; Hartzell, Qu et al. 2005). Interessant ist, dass neben den $Clcn7^{-/-}$ -Mäusen weitere $Clcn^{-/-}$ -Mutanten retinale Veränderungen zeigen. So weisen $Clcn2^{-/-}$, $Clcn3^{-/-}$ und $Clcn6^{-/-}$ -Knockout-Mäuse (Bosl, Stein et al. 2001; Stobrawa, Breiderhoff et al. 2001; Poet, Kornak et al. 2006), sowie Patienten mit Mutationen im Bestrophin-Gen (Hartzell, Qu et al. 2005; Qu, Chien et al. 2006) eine Retinadegeneration auf. Allerdings ist bei den jeweiligen Cl^- -Kanal-Defekten von unterschiedlichen Pathomechanismen auszugehen, da die einzelnen Chloridkanäle unterschiedlich lokalisiert sind. CIC-2 befindet sich in der Plasmamembran. Bei $Clcn2^{-/-}$ -Mäusen wird daher spekuliert, dass die Retinadegeneration auf einer Regulationsstörung des ionalen Milieus zwischen Photorezeptoren und RPE beruht (Bosl, Stein et al. 2001). CIC-3 tritt dagegen in synaptischen Vesikeln und späten Endosomen auf, so dass als Ursache eine gestörte synaptische Transmission nicht auszuschließen ist (Stobrawa, Breiderhoff et al. 2001). Bezüglich CIC-7 wird eine zugrundeliegende lysosomale Dysfunktion diskutiert, da CIC-7 in Lysosomen vorkommt. Der Nachweis einer erhöhten Aktivität der β -Hexosamidase und Anreicherung von elektronendichten Speichersubstanzen in der Retina der $Clcn7^{-/-}$ -Mäuse sprechen für das Vorliegen einer lysosomalen Störung (Kasper, Planells-Cases et al. 2005). Die $Clcn7$ -Knockout-Mäuse weisen überdies eine generalisierte Neurodegeneration auf, die der neuronalen

Zeroidlipofuszinose (NCL) sehr ähnlich ist. Die neuronale Zeroidlipofuszinose (NCL) gehört zum Formenkreis der lysosomalen Funktionsstörungen (Dawson and Cho 2000; Goebel and Wisniewski 2004) und ist charakterisiert durch lysosomal nicht abgebaute Lipofuszin-Pigmente (Goebel 2000). Auch in grey-lethal (gl) Mutanten, deren CIC-7-Ostm1 Interaktion im lysosomalen Sortierungsweg gestört ist (siehe 1.5.3) sind retinale und/oder cerebrale neurodegenerative Veränderungen mit Ablagerungen von elektronendichten Substanzen zu beobachten (Pangrazio, Poliani et al. 2006). Beim Menschen sind retinale Lipofuchszin-Ablagerungen z. B. bei der humanen altersabhängigen Makulardegeneration (AMD) nachgewiesen worden. Die AMD ist assoziiert mit Mutationen im *Bestrophin*-Gen, das im RPE die basolateral lokalisierten Cl⁻-Kanäle verschlüsselt (Hartzell, Qu et al. 2005; Qu, Chien et al. 2006). Die basolateralen Cl⁻-Kanäle im RPE sind wahrscheinlich verantwortlich für die Reifung der Phagolysosomen und Aufrechterhaltung der endo-lysosomalen Prozesse. Insgesamt scheint also ein ungestörter endo-lysosomaler Mechanismus maßgebend für die Erhaltung einer normalen retinalen Funktion zu sein.

5.3 Cerebraler Phänotyp der *Clcn7*^{-/-}-Maus verglichen zur *oc/oc*-Maus

Im Gehirn von Wildtyp-Mäusen wird CIC-7 in Pyramidenzellen des Hippocampus, in Purkinje-, und Granulazellen des Cerebellums und im Cortex exprimiert (Kornak, Kasper et al. 2001). Bei etwa 20 Tage alten *Clcn7*^{-/-}-Mäusen war histologisch in diesen Bereichen ein beginnender neuronaler Verlust sichtbar. Nach weiteren 10 bis 20 Tagen entwickelte sich eine fast komplette Degeneration der CA3 Region des Hippocampus. Gleichzeitig war an den betroffenen Stellen eine Astrozytose und eine Aktivitätszunahme der Mikroglia in der GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)-Färbung zu beobachten. Unter dem UV-Mikroskop waren autofluoreszierende, amorphe, PAS (Periodsäure-Schiff) positive Ablagerungen im Zytoplasma der Neuronen zu sehen. Elektronenmikroskopisch zeigten sich echoreiche, granulo-lamelläre Substanzen (Kasper, Planells-Cases et al. 2005). Diese Speichersubstanzen sind vereinbar mit zellulären Lipofuszin-Ablagerungen und sind nahezu identisch mit GROD (granular, osmiophilic deposit), die als klassische Zeichen der neuronalen Zeroidlipofuchsinose (NCL) gelten (Goebel, Wisniewski 2004). Zudem wurde eine Akkumulation von Speicherinhaltsstoffen, z. B. der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-

Synthese nachgewiesen, die ebenfalls für die NCL charakteristisch ist. Ähnlich wie bei den retinalen Veränderungen waren somit im gesamten Gehirn der *Clcn7^{-/-}*-Mäuse Schäden nachweisbar, die an eine lysosomale Funktionsstörung erinnern.

Entsprechende Untersuchungen an *oc/oc*-Mäusen ergaben dagegen keine Auffälligkeiten. Die Ergebnisse waren mit denen der Wildtyp-Tiere vergleichbar (Kasper, Planells-Cases et al. 2005).

Der im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Multi-Tissue-Westernblot zeigte beim Wildtyp-Tier ein deutliches Signal der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase in der Membranpräparation vom Gehirn. Für eine ungestörte Erregungsleitung finden im Neuron zahlreiche endolysosomale und sekretorische Prozesse statt z. B. beim Recyclingvorgang an der synaptischen Membran nach Sekretion von Neurotransmittern. Dabei werden Plasmamembrananteile mit den darauf sitzenden Clathrin umhüllten Vesikeln invaginiert. Im Zytoplasma wird der Clathrinmantel enzymatisch abgespalten und nach Transmitterbeladung im Zytosol stehen dann die Vesikel für eine erneute Exozytose bereit (Bauerfeind 1996). Während gute Kenntnisse auf ultrastruktureller Ebene existieren, ist über die Dynamik und der molekularen Maschinerie der Endozytose und des intrazellulären *traffickings* in neuronalen Zellen noch wenig bekannt. Die endozytotischen und sekretorischen Vorgänge in der Nervenzelle scheinen ähnlich zu verlaufen wie in Osteoklasten und in Schaltzellen der Niere (Heuser, Reese 1973; Parton, Dotti 1993; Morgan, Augustin, Lafer 2002). Hierbei ist eine Absenkung des pH-Werts in den intrazellulären Kompartments notwendig, der durch einen Protonentransport erreicht wird. Die deutliche Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit im Westernblot zeigt, dass die H^+ -ATPase auch im Gehirn bei Ansäuerungsprozessen involviert ist.

Wie oben bereits erwähnt, ist aber davon auszugehen, dass Mutationen in der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase kaum Auswirkungen auf neurologische Symptome haben. Zu klären ist, ob die $\alpha 3$ -Untereinheit durch homologe Isoformen zu ersetzen ist und somit in *oc/oc*-Mäusen eine primäre neuronale Funktionsstörung verhindert wird. Bekannt ist bislang, dass die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ der H^+ -ATPase im Hirn, überwiegend in Endosomen und synaptischen Vesikeln, exprimiert werden (Nishi and Forgac 2000; Toyomura, Oka et al. 2000; Toyomura, Murata et al. 2003). Die genaue Identifikation der Interaktionen der $\alpha 3$ -Untereinheit mit anderen Proteinkomplexen und dessen Lokalisation und Funktion in Nervenzellen

stellt eine Herausforderung dar, um die Grundmechanismen der Endozytose in neuronalen Zellen zu verstehen.

Interessant sind die Untersuchungsergebnisse an so genannten Rescue-Clcn7-Mäusen. Es wurde ein transgenes Konstrukt hergestellt, das das Clcn7-Gen in Verbindung mit einem Osteoklast spezifischen Promoter, dem TRAP-Promoter, beinhaltet. Dieses Konstrukt wurde dann durch eine Pronukleusinjektion in das Mausgenom eingefügt. Nach Kreuzung dieses transgenen Tieres mit der Clcn7^{-/-}-Maus, konnte die Lebensdauer der gezeugten Rescue-Clcn7-Mäuse verlängert und die Knochenveränderungen behoben werden. Die cerebrale und retinale Degeneration dagegen blieben bestehen. Ähnlich wie die Clcn7^{-/-}-Mäuse zeigten die Rescue-Clcn7-Mäuse einen progredienten Verlauf der neuronalen Degeneration (Kasper, Planells-Cases et al. 2005). Die neuronale Degeneration scheint unabhängig vom Knochenstoffwechsel auf einem eigenständigen Pathomechanismus zu beruhen und könnte Ausdruck eines Überlappungssyndroms mit einer primären lysosomalen Speichererkrankung sein z. B. einem lysosomalen Enzymdefekt.

Die Knochenmarkstransplantation ist für Osteopetrose-Patienten bislang die einzige längerfristig Erfolg versprechende Therapie (Gerritsen, Vossen et al. 1994). Symptomatische Behandlungen mit Prednisolon, γ -Interferon, Kalzitriol, Parathormon und M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) kamen bisher nur mit wechselndem Erfolg zum Einsatz (Mohn, Capanna et al. 2004). Angelehnt an den oben genannten Ergebnissen würden von einer Knochenmarkstransplantation wahrscheinlich nur Osteopetrose-Patienten ohne Sehverlust und ohne ZNS-Degeneration profitieren. Patienten mit Defekten in der α 3-Untereinheit der Protonenpumpe haben nach einer Knochenmarkstransplantation wahrscheinlich eine bessere Prognose als Patienten mit CIC-7-Defekten. oc/oc-Mäuse zeigten nach einer in utero Stammzelltransplantation in einigen Fällen eine Voll-, bis Teilreversibilität des Phänotyps (Frattini, Blair et al. 2005).

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das oc/oc-Mausmodell geeignet ist, um die Funktion der H⁺-ATPase nicht nur in einzelnen Organen zu studieren, sondern auch im physiologischen Kontext eines Gesamtorganismus. Die bisherigen Analysen des oc/oc-Mausmodells bieten die Grundlage für eine Reihe weiterer Ansätze zur Aufklärung der Rolle der V-Typ H⁺-ATPase bei zellulären Vorgängen und Ansäuerungsprozessen. Hinsichtlich des Kalzium-Phosphat-Stoffwechsels könnten z. B. durch Provokationstestungen, indem hohe Konzentrationen von einzelnen Elektrolyten oder Hormonen einem oc/oc-Tier appliziert werden, die klinischen Folgen und Variationen mit Auswirkung auf u. a. Knochen, Niere und pH-Verschiebungen in Urin und Blut überprüft werden.

Die von mir durchgeführten Westernblot-Analysen ergaben eine starke Expression der α 3-Untereinheit im Auge und Gehirn. Allerdings ist die Frage nach der genauen Lokalisation der α 3-Untereinheit und dessen Funktion im Auge und Gehirn noch weitgehend ungeklärt. Um die Sortierungs- und Transportmechanismen des endozytotischen Apparates in neuronalen Zellen besser zu verstehen, können weitere vergleichende physiologische Experimente z. B. Messung der Konzentration von Cathepsin D und immunhistochemische Analysen mit Koloaktionen von Chloridkanälen im Wildtyp- und oc/oc-Tieren sehr hilfreich sein. Obwohl Mutationen in der α 3-Untereinheit eher seltener neurologische Komplikationen zu verursachen scheinen, könnte trotzdem eine Klärung der zu Grunde liegenden Mechanismen der α 3-Untereinheit im Auge und Gehirn, möglicherweise für die Entwicklung therapeutischer Strategien bei verschiedenen neurologischen und/oder neurologisch assoziierten Erkrankungen von Nutzen sein.

6 Zusammenfassung

Die vakuoläre H⁺-ATPase (V-ATPase) findet sich innerhalb intrazellulärer Kompartimente und in der Plasmamembran von spezifischen Zellen, wie renalen Schaltzellen und Osteoklasten, wo sie eine entscheidende Rolle in der Säuresekretion und Regulation des zytoplasmatischen pH-Werts spielen. Im engen Zusammenhang zur V-ATPase stehen Chloridkanäle, die eine elektronenneutrale Ansäuerung der betreffenden Kompartimente ermöglichen.

Die $\alpha 3$ -Untereinheit der H⁺-ATPase kommt gemeinsam mit ClC-7 spezifisch in der Ruffled Border der Osteoklasten vor, wo sie für die Protonensekretion in die Resorptionslakune verantwortlich ist. Der saure pH-Wert in der Resorptionslakune ist Voraussetzung für die resorptive Aktivität der Osteoklasten.

Mittels eines Multi-Tissue-Westerblots mit einem spezifisch gegen die $\alpha 3$ -Untereinheit der H⁺-ATPase gerichteten Antikörper wurde in der Wildtyp-Maus zudem eine starke Expression des $\alpha 3$ -Proteins in der Niere, Gehirn und im Auge nachgewiesen.

Die oc-Mausmutante, die eine Deletion im Gen *Atp6i/Atp6v0a3* für die $\alpha 3$ -Untereinheit aufweist, war mit zunehmendem Alter äußerlich durch ein zurückgebliebenes Wachstum zu identifizieren. Die Röhrenknochen dieser Tiere waren verkürzt. Der Zahndurchbruch blieb aus oder war nur ansatzweise zu erkennen. Histologische Analysen des Knochens zeigten osteopetrotische Knochenveränderungen mit charakteristischen Merkmalen einer rachitischen Stoffwechsellage. Die an der Niere festgestellte verminderte Expression des Natrium-Phosphat-Kotransporters im proximalen Tubulus kann ebenfalls hinweisend sein für eine gestörte Kalzium-Phosphat-Homöostase. Die Osteoklastenmorphologie in oc/oc-Mäusen war unauffällig bis auf eine verminderte Anzahl transzytotischer Vesikel. Zusätzlich konnte die typische Konzentration von ClC-7 in der Ruffled Border nicht beobachtet werden, was auf eine gestörte Resorptionstätigkeit der Osteoklasten hindeutet. In Osteoklasten der Wildtyp-Mäuse bestand dagegen eine Kolokalisation von ClC-7 mit der $\alpha 3$ -Untereinheit der H⁺-ATPase in der

Ruffled Border. Die oc/oc-Mäuse wiesen histologisch keine primären Retinaschäden oder cerebrale Veränderungen auf.

Für die Schädigung von neuronalen Zellen im Rahmen des osteopetrotischen Krankheitsbildes sind vermutlich Defekte in Chloridkanälen verantwortlich, die zu lysosomalen Abbaustörungen führen. Mutationen in der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase scheinen nur bei einer kleinen Zahl an Osteopetrosefällen mit neurologischen Symptomen verbunden zu sein.

7 Literaturverzeichnis

- Abinun, M., T. Newson, et al. (1999). "Importance of neurological assessment before bone marrow transplantation for osteopetrosis." Arch Dis Child **80**(3): 273-4.
- Agata, Y., A. Kawasaki, et al. (1996). "Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes." Int Immunol **8**:765-72
- Arron, JR., Y. Choi, et al. (2000). "Bone versus immune system." Nature **408**:535-6
- Bacic, D., M. Lehir, et al. (2006). "The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone." Kidney Int **69**(3): 495-503.
- Baron, R. (1989). "Polarity and membrane transport in osteoclasts." Connect Tissue Res **20**(1-4): 109-20.
- Baron, R. (2004). "Arming the osteoclast." Nat Med **10**:458-60.
- Bauerfeind R, Galli T, De Camilli P. (1996). "Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling". J Neurocytol. **25**(12):701-15.
- Beighton, P. and H. Hamersma (1985). "Ophthalmological complications in the sclerosing bone dysplasias." Ophthalmic Paediatr Genet **6**(3): 129-34.
- Benichou, O., E. Cleiren, et al. (2001). "Mapping of autosomal dominant osteopetrosis type II (Albers-Schonberg disease) to chromosome 16p13.3." Am J Hum Genet **69**(3): 647-54.
- Blair, H. C. and N. A. Athanasou (2004). "Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption." Histol Histopathol **19**(1): 189-99.
- Blair, H. C., S. L. Teitelbaum, et al. (1989). "Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump." Science **245**(4920): 855-7.
- Blair, H. C. and M. Zaidi (2006). "Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways." Rev Endocr Metab Disord **7**(1-2): 23-32.
- Blair, H. C., M. Zaidi, et al. (2002). "Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation." Biochem J **364**(Pt 2): 329-41.
- Bollerslev, J. and L. Mosekilde (1993). "Autosomal dominant osteopetrosis." Clin Orthop Relat Res(294): 45-51.
- Bolt, R. J., J. M. Wennink, et al. (2005). "Carbonic anhydrase type II deficiency." Am J Kidney Dis **46**(5): A50, e71-3.
- Borthwick, K. J., N. Kandemir, et al. (2003). "A phenocopy of CAII deficiency: a novel genetic explanation for inherited infantile osteopetrosis with distal renal tubular acidosis." J Med Genet **40**(2): 115-21.
- Bosl, M. R., V. Stein, et al. (2001). "Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel disruption." Embo J **20**(6): 1289-99.
- Brisseau, G. F., S. Grinstein, et al. (1996). "Interleukin-1 increases vacuolar-type H⁺-ATPase activity in murine peritoneal macrophages." J Biol Chem **271**(4): 2005-11.
- Brown, D. and S. Breton (2000). "H⁽⁺⁾V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas

- deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways." J Exp Biol **203**(Pt 1): 137-45.
- Burgess, T. L., Y. Qian, et al. (1999). "The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts." J Cell Biol **145**(3): 527-38.
- Campos-Xavier, A. B., J. M. Saraiva, et al. (2003). Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. Hum Genet. **112**: 186-9
- Campos-Xavier, A. B., J. Casanova, et al. (2005). "Intrafamilial phenotypic variability of osteopetrosis due to chloride channel 7 (CLCN7) mutations." Am J Med Genet A. **1;133A**(2):216-8
- Chalhoub, N., N. Benachenhou, et al. (2003). "Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human." Nat Med **9**(4): 399-406.
- Chen, W., S. Yang, et al. (2007). "Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence." Hum Mol Genet **16**(4): 410-23.
- Christensen, E. I. and H. Birn (2002). "Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(4): 256-66.
- Chu, K., R. Synder, et al. (2006). "Disease status in autosomal dominant osteopetrosis type 2 is determined by osteoclastic properties." J Bone Miner Res **21**:1089-97
- Cidon, S. and N. Nelson (1983). "A novel ATPase in the chromaffin granule membrane." J Biol Chem **258**(5): 2892-98.
- Cleiren, E., O. Benichou, et al. (2001). "Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CLCN7 chloride channel gene." Hum Mol Genet **10**(25): 2861-7.
- Cody, J. D., F. R. Singer, et al. (1997). "Genetic linkage of Paget disease of the bone to chromosome 18q." Am J Hum Genet **61**(5): 1117-22.
- Dawson, G. and S. Cho (2000). "Batten's disease: clues to neuronal protein catabolism in lysosomes." J Neurosci Res **60**(2): 133-40.
- Deguchi, J., A. Yamamoto, et al. (1994). "Acidification of phagosomes and degradation of rod outer segments in rat retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(2):568-79.
- Engsig, M. T., Q. J. Chen, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones." J Cell Biol **151**(4): 879-89.
- Esterberg, J., R. A. Kassim, et al. (2003). "Hip pain in a case of hypophosphatemic osteomalacia." Am J Orthop **32**(9): 455-8.
- Everts, V., W. Korper, et al. (2006). "Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone." J Bone Miner Res **21**(9): 1399-408.
- Feeney L. (1973). " The phagolysosomal system of pigment epithelium. A key to retinal disease." Invest Ophthalmol **12**(9):635-8.
- Felix, R., M. G. Cecchini, et al. (1990). "Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse." J Bone Miner Res **5**(7): 781-9.
- Forgac, M. (1999). "Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases." J Biol Chem **274**(19): 12951-4.

- Forgac, M. (2000). "Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H(+)-ATPases." J Exp Biol **203**(Pt 1): 71-80.
- Franzoso, G., L. Carlson, et al. (1997). "Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development." Genes Dev **11**(24): 3482-96.
- Frattini, A., H. C. Blair, et al. (2005). "Rescue of ATPa3-deficient murine malignant osteopetrosis by hematopoietic stem cell transplantation in utero." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14629-34.
- Frattini, A., P. J. Orchard, et al. (2000). "Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis." Nat Genet **25**(3): 343-6.
- Frattini, A., A. Pangrazio, et al. (2003). "Chloride channel CICN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis." J Bone Miner Res **18**(10): 1740-7.
- Fuller, K., J. T. Thong, et al. (1994). "Automated three-dimensional characterization of osteoclastic resorption lacunae by stereoscopic scanning electron microscopy." J Bone Miner Res **9**(1): 17-23.
- Gelb, B. D., K. Moissoglu, et al. (1996). "Cathepsin K: isolation and characterization of the murine cDNA and genomic sequence, the homologue of the human pycnodysostosis gene." Biochem Mol Med **59**(2): 200-6.
- Gerber, H. P., T. H. Vu, et al. (1999). "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation." Nat Med **5**(6): 623-8.
- Gerritsen, E. J., J. M. Vossen, et al. (1994). "Bone marrow transplantation for autosomal recessive osteopetrosis. A report from the Working Party on Inborn Errors of the European Bone Marrow Transplantation Group." J Pediatr **125**(6 Pt 1): 896-902.
- Gerritsen, E. J., J. M. Vossen, et al. (1994). "Autosomal recessive osteopetrosis: variability of findings at diagnosis and during the natural course." Pediatrics **93**(2): 247-53.
- Goebel, H. H. (2000). "Morphological aspects of the neuronal ceroid lipofuscinoses." Neurol Sci **21**(3 Suppl): S27-33.
- Goebel, H. H. and K. E. Wisniewski (2004). "Current state of clinical and morphological features in human NCL." Brain Pathol **14**(1): 61-9.
- Good, D. A., F. Busfield, et al. (2002). "Linkage of Paget disease of bone to a novel region on human chromosome 18q23." Am J Hum Genet **70**(2): 517-25.
- Gori, F., L. C. Hofbauer, et al. (2000). "The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated." Endocrinology **141**(12): 4768-76.
- Gunther, W., N. Piwon, et al. (2003). "The CIC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease." Pflugers Arch **445**(4): 456-62.
- Haagerup, A., J. M. Hertz, et al. (2000). "Cathepsin K gene mutations and 1q21 haplotypes in at patients with pycnodysostosis in an outbred population." Eur J Hum Genet **8**(6): 431-6.
- Hansen, M. F., M. Seton, et al. (2006). "Osteosarcoma in Paget's Disease of Bone." J Bone Miner Res **21** Suppl 2: P58-63.

- Hartzell, C., Z. Qu, et al. (2005). "Looking chloride channels straight in the eye: bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration." Physiology (Bethesda) **20**: 292-302.
- Haussler, M. R. and T. A. McCain (1977). "Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (second of two parts)." N Engl J Med **297**(19): 1041-50.
- Hayasaka, S., S. Hara, K. Mizuno (1975). "Degradation of rod outer segment proteins by cythepsin D." J Biochem **78**(6):1365-7.
- Heaney, C., H. Shalev, et al. (1998). "Human autosomal recessive osteopetrosis maps to 11q13, a position predicted by comparative mapping of the murine osteosclerosis (oc) mutation." Hum Mol Genet **7**(9): 1407-10.
- Helfrich, M. H., S. A. Nesbitt, et al. (1996). "Beta 1 integrins and osteoclast function: involvement in collagen recognition and bone resorption." Bone **19**(4): 317-28.
- Henriksen, K., M. Karsdal, et al. (2003). "RANKL and vascular endothelial growth factor (VEGF) induce osteoclast chemotaxis through an ERK1/2-dependent mechanism." J Biol Chem **278**(49): 48745-53.
- Henriksen, K., M. G. Sorensen, et al. (2006). "Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification." J Bone Miner Res **21**(1): 58-66.
- Hernando, N., J. Forgo, et al. (2000). "PTH-Induced downregulation of the type IIa Na/P(i)-cotransporter is independent of known endocytic motifs." J Am Soc Nephrol **11**(11): 1961-8.
- Hessle, L., K. A. Johnson, et al. (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9445-9.
- Heuser, J. E., Reese, T. S. (1973). "Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction." J Cell Biol. **57**(2):315-44
- Hill, P. A. (1998). "Bone remodelling." Br J Orthod **25**(2): 101-7.
- Hocking, L. J., C. A. Herbert, et al. (2001). "Genomewide search in familial Paget disease of bone shows evidence of genetic heterogeneity with candidate loci on chromosomes 2q36, 10p13, and 5q35." Am J Hum Genet **69**(5): 1055-61.
- Hofbauer, L. C. (2006). "Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG)." Ann Endocrinol (Paris) **67**(2): 139-41.
- Hofbauer, L. C. and A. E. Heufelder (2001). "Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology." J Mol Med **79**(5-6): 243-53.
- Hou, W. S., D. Bromme, et al. (1999). "Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis." J Clin Invest **103**(5): 731-8.
- Hoyt, C. S. and F. A. Billson (1979). "Visual loss in osteopetrosis." Am J Dis Child **133**(9): 955-8.
- Inoue, T., S. Wilkens, et al. (2003). "Subunit structure, function, and arrangement in the yeast and coated vesicle V-ATPases." J Bioenerg Biomembr **35**(4): 291-9.

- Ishida, Y., Y. Agata (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." EMBO J **11**: 3887-95
- Jentsch, T. J. (2005). "Chloride transport in the kidney: lessons from human disease and knockout mice." J Am Soc Nephrol **16**(6): 1549-61.
- Jentsch, T. J. (2007). "Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters." J Physiol **578**(Pt 3): 633-40.
- Johnson, J. A. and R. Kumar (1994). "Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins." Semin Nephrol **14**(2): 119-28.
- Kane, P. M. and A. M. Smardon (2003). "Assembly and regulation of the yeast vacuolar H⁺-ATPase." J Bioenerg Biomembr **35**(4): 313-21.
- Karet, F. E., K. E. Finberg, et al. (1999). "Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness." Nat Genet **21**(1): 84-90.
- Kasper, D., R. Planells-Cases, et al. (2005). "Loss of the chloride channel CIC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration." Embo J **24**(5): 1079-91.
- Kawasaki-Nishi, S., K. Bowers, et al. (2001). "The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis." J Biol Chem **276**(50): 47411-20.
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi, et al. (2003). "Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases." FEBS Lett **545**(1): 76-85.
- Keith, C. G. (1968). "Retinal atrophy in osteopetrosis." Arch Ophthalmol **79**(3): 234-41.
- Kida, E., S. Palmiello, et al. (2006). "Carbonic anhydrase II in the developing and adult human brain." J Neuropathol Exp Neurol **65**(7): 664-74.
- Kodama, I., S. Niida, et al. (2004). "Estrogen regulates the production of VEGF for osteoclast formation and activity in op/op mice." J Bone Miner Res **19**(2): 200-6.
- Koga, T., M. Inui, et al. (2004). "Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis." Nature **428**: 758-63
- Koike, M., H. Nakanishi, et al. (2000). "Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons." J Neurosci **20**(18): 6898-906.
- Kong, Y., H. Yoshida, et al. (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." Nature **379**:315-23.
- Kornak, U., D. Kasper, et al. (2001). "Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man." Cell **104**(2): 205-15.
- Kornak, U., A. Ostertag, et al. (2006). "Polymorphisms in the CLCN7 gene modulate bone density in postmenopausal women and in patients with autosomal dominant osteopetrosis type II." J Clin Endocrinol Metab **91**(3): 995-1000.

- Kornak, U., A. Schulz, et al. (2000). "Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis." Hum Mol Genet **9**(13): 2059-63.
- Kreft, A., J. Reimann, et al. (2000). "Fibre content and cellularity of the bone marrow of the iliac crest, vertebral column and sternum in chronic myeloproliferative disorders." Leuk Lymphoma **38**(1-2): 165-73.
- Lacey, D. L., H. L. Tan, et al. (2000). "Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo." Am J Pathol **157**(2): 435-48.
- Lacey, D. L., E. Timms, et al. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell **93**(2): 165-76.
- Lange, P. F., L. Wartosch, et al. (2006). "CIC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function." Nature **440**(7081): 220-3.
- Laurin, N., J. P. Brown, et al. (2001). "Paget disease of bone: mapping of two loci at 5q35-qter and 5q31." Am J Hum Genet **69**(3): 528-43.
- Lazner, F., M. Gowen, et al. (1999). "Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin." Hum Mol Genet **8**(10): 1839-46.
- Leng, X. H., T. Nishi, et al. (1999). "Transmembrane topography of the 100-kDa α subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase." J Biol Chem **274**(21): 14655-61.
- Li, C. Y., K. J. Jepsen, et al. (2006). "Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass." J Bone Miner Res **21**(6): 865-75.
- Li, Y. C., A. E. Pirro, et al. (1997). "Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9831-5.
- Li, Y. P., W. Chen, et al. (1999). "Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification." Nat Genet **23**(4): 447-51.
- Manolson, M. F., B. Wu, et al. (1994). "STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p." J Biol Chem **269**(19): 14064-74.
- Manolson, M. F., H. Yu, et al. (2003). "The $\alpha 3$ isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large (≥ 10 nuclei) and small (< 10 nuclei) osteoclasts." J Biol Chem **278**(49): 49271-8.
- Marks, S. C., Jr., M. F. Seifert, et al. (1985). "Osteosclerosis, a recessive skeletal mutation on chromosome 19 in the mouse." J Hered **76**(3): 171-6.
- Marneros, A. G., J. Fan, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function." Am J Pathol **167**(5): 1451-9.
- Marshansky, V., D. A. Ausiello, et al. (2002). "Physiological importance of endosomal acidification: potential role in proximal tubulopathies." Curr Opin Nephrol Hypertens **11**(5): 527-37.
- Meghji, S. (1992). "Bone remodelling." Br Dent J **172**(6): 235-42.

- Michigami T, Kageyama T, et al. (2002) "Novel mutations in the $\alpha 3$ subunit of vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase in a Japanese patient with infantile malignant osteopetrosis". Bone **30**(2):436-9.
- Mohn, A., R. Capanna, et al. (2004). "Autosomal malignant osteopetrosis. From diagnosis to therapy." Minerva Pediatr **56**(1): 115-8.
- Morgan, J.R., Augustine G. J., Lafer E.M. (2002). "Synaptic vesicle endocytosis: the races, places and molecular faces". Neuromolecular Med. **2**(2):101-14.
- Murer, H., N. Hernando, et al. (2003). "Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule." Annu Rev Physiol **65**: 531-42.
- Nagahama, K., K. Aoki, et al. (2004). "The deficiency of immunoregulatory receptor PD-1 causes mild osteopetrosis." Bone **35**(5): 1059-68.
- Nakamura, I., N. Takahashi, et al. (1997). "Lack of vacuolar proton ATPase association with the cytoskeleton in osteoclasts of osteosclerotic (oc/oc) mice." FEBS Lett **401**(2-3): 207-12.
- Nellisery, M. J., S. S. Padalecki, et al. (1998). "Evidence for a novel osteosarcoma tumor-suppressor gene in the chromosome 18 region genetically linked with Paget disease of bone." Am J Hum Genet **63**(3): 817-24.
- Nelson, N. and W. R. Harvey (1999). "Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases." Physiol Rev **79**(2): 361-85.
- Nguyen-Legros, J. and D. Hicks (2000). "Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium." Int Rev Cytol **196**: 245-313.
- Niida, S., M. Kaku, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption." J Exp Med **190**(2): 293-8.
- Nishi, T. and M. Forgac (2000). "Molecular cloning and expression of three isoforms of the 100-kDa α subunit of the mouse vacuolar proton-translocating ATPase." J Biol Chem **275**(10): 6824-30.
- Oka, T., T. Toyomura, et al. (2001). "Four subunit α isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H⁺-ATPase. Cell-specific expression during development." J Biol Chem **276**(35): 33079-85.
- Panda, D. K., D. Miao, et al. (2001). "Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7498-503.
- Pangrazio, A., P. L. Poliani, et al. (2006). "Mutations in OSTM1 (grey lethal) define a particularly severe form of autosomal recessive osteopetrosis with neural involvement." J Bone Miner Res **21**(7): 1098-105.
- Parton, R.G., C.G. Dotti (1993). "Cell biology of neuronal endocytosis". J Neurosci Res **1**;36(1):1-9.
- Pettersson, U., O. M. Albagha, et al. (2005). "Polymorphisms of the CLCN7 gene are associated with BMD in women." J Bone Miner Res **20**(11): 1960-7.
- Piper, K., A. Boyde, et al. (1992). "The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro." Anat Embryol (Berl) **186**(4): 291-9.
- Piwon, N., W. Gunther, et al. (2000). "Clc-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease." Nature **408**(6810): 369-73.

- Poet, M., U. Kornak, et al. (2006). "Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13854-9.
- Purroy, J. and N. K. Spurr (2002). "Molecular genetics of calcium sensing in bone cells." Hum Mol Genet **11**(20): 2377-84.
- Qu, Z., L. T. Chien, et al. (2006). "The anion-selective pore of the bestrophins, a family of chloride channels associated with retinal degeneration." J Neurosci **26**(20): 5411-9.
- Quarello, P., M. Forni, et al. (2004). "Severe malignant osteopetrosis caused by a GL gene mutation." J Bone Miner Res **19**(7): 1194-9.
- Rajapurohitam, V., N. Chalhoub, et al. (2001). "The mouse osteopetrotic grey-lethal mutation induces a defect in osteoclast maturation/function." Bone **28**(5): 513-23.
- Ramirez, A., J. Faupel, et al. (2004). "Identification of a novel mutation in the coding region of the grey-lethal gene OSTM1 in human malignant infantile osteopetrosis." Hum Mutat **23**(5): 471-6.
- Roodman, G. D. and J. J. Windle (2005). "Paget disease of bone." J Clin Invest **115**(2): 200-8.
- Ruben, J. B., R. J. Morris, et al. (1990). "Chorioretinal degeneration in infantile malignant osteopetrosis." Am J Ophthalmol **110**(1): 1-5.
- Sabbagh, Y., T. O. Carpenter, et al. (2005). "Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(27): 9637-42.
- Saftig, P., E. Hunziker, et al. (2000). "Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice." Adv Exp Med Biol **477**: 293-303.
- Sakai, Y., J. Kishimoto, et al. (2001). "Metabolic and cellular analysis of alopecia in vitamin D receptor knockout mice." J Clin Invest **107**(8): 961-6.
- Schlager, G. and M. M. Dickie (1967). "Spontaneous mutations and mutation rates in the house mouse." Genetics **57**(2): 319-30.
- Schlesinger, P. H., H. C. Blair, et al. (1997). "Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption." J Biol Chem **272**(30): 18636-43.
- Scimeca, J. C., A. Franchi, et al. (2000). "The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants." Bone **26**(3): 207-13.
- Scimeca, J. C., D. Quincey, et al. (2003). "Novel mutations in the TCIRG1 gene encoding the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar proton pump in patients affected by infantile malignant osteopetrosis." Hum Mutat **21**(2): 151-7.
- Siatkowski, R. M., N. F. Vilar, et al. (1999). "Blindness from bad bones." Surv Ophthalmol **43**(6): 487-90.
- Silver, I. A., R. J. Murrills, et al. (1988). "Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts." Exp Cell Res **175**(2): 266-76.
- Sly, W. S., D. Hewett-Emmett, et al. (1983). "Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(9): 2752-6.

- Sly, W. S., M. P. Whyte, et al. (1985). "Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification." N Engl J Med **313**(3): 139-45.
- Smith, A. N., F. Jouret, et al. (2005). "Vacuolar H⁺-ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone." J Am Soc Nephrol **16**(5): 1245-56.
- Sobacchi, C., P. Vezzoni, et al. (2004). "Association between a polymorphism affecting an AP1 binding site in the promoter of the TCIRG1 gene and bone mass in women." Calcif Tissue Int **74**(1): 35-41.
- Stehberger, P. A., N. Schulz, et al. (2003). "Localization and regulation of the ATP6V0A4 (a4) vacuolar H⁺-ATPase subunit defective in an inherited form of distal renal tubular acidosis." J Am Soc Nephrol **14**(12): 3027-38.
- Stevens, T. H. and M. Forgac (1997). "Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 779-808.
- Steward, C. G. (2003). "Neurological aspects of osteopetrosis." Neuropathol Appl Neurobiol **29**(2): 87-97.
- Stobrawa, S. M., T. Breiderhoff, et al. (2001). "Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus." Neuron **29**(1): 185-96.
- Stone, D. K., X. S. Xie, et al. (1983). "An ATP-driven proton pump in clathrin-coated vesicles." J Biol Chem **258**(7): 4059-62.
- Stover, E. H., K. J. Borthwick, et al. (2002). "Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss." J Med Genet **39**(11): 796-803.
- Suda, T., N. Udagawa, et al. (1995). "Modulation of osteoclast differentiation by local factors." Bone **17**(2 Suppl): 87S-91S.
- Sun, S. G., Y. S. Lau, et al. (2006). "Bone stromal cells in pagetic bone and Paget's sarcoma express RANKL and support human osteoclast formation." J Pathol **209**(1): 114-20.
- Susani L. Pangrazio A., et al. (2004) "TCIRG1-dependent recessive osteopetrosis: mutation analysis, functional identification of the splicing defects, and in vitro rescue by U1 snRNA." Hum Mutat. **24**(3):225-35.
- Takayangi, H., K. Ogasawara, et al. (2000) "T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ ." Nature **408**:600-5
- Tashian, R. E., D. C. Shreffler, et al. (1968). "Genetic and phylogenetic variation in the different molecular forms of mammalian erythrocyte carbonic anhydrases." Ann N Y Acad Sci **151**(1): 64-77.
- Teitelbaum, S. L. and F. P. Ross (2003). "Genetic regulation of osteoclast development and function." Nat Rev Genet **4**(8): 638-49.
- Teti, A., H. C. Blair, et al. (1989). "Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts." J Clin Invest **83**(1): 227-33.
- Thompson, D. A., A. Kriss, et al. (1998). "Early VEP and ERG evidence of visual dysfunction in autosomal recessive osteopetrosis." Neuropediatrics **29**(3): 137-44.

- Tondravi, M. M., S. R. McKercher, et al. (1997). "Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1." Nature **386**(6620): 81-4.
- Toyomura, T., Y. Murata, et al. (2003). "From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺-ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation." J Biol Chem **278**(24): 22023-30.
- Toyomura, T., T. Oka, et al. (2000). "Three subunit α isoforms of mouse vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. Preferential expression of the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation." J Biol Chem **275**(12): 8760-5.
- Udagawa, N., T. Sasaki, et al. (1992). "Lack of bone resorption in osteosclerotic (oc/oc) mice is due to a defect in osteoclast progenitors rather than the local microenvironment provided by osteoblastic cells." Biochem Biophys Res Commun **184**(1): 67-72.
- Vaananen, H. K. (1993). "Mechanism of bone turnover." Ann Med **25**(4): 353-9.
- Vaananen, H. K. and M. Horton (1995). "The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure." J Cell Sci **108 (Pt 8)**: 2729-32.
- Van Hul, E., J. Gram, et al. (2002). "Localization of the gene causing autosomal dominant osteopetrosis type I to chromosome 11q12-13." J Bone Miner Res **17**(6): 1111-7.
- Van Wesenbeeck, L., E. Cleiren, et al. (2003). "Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density." Am J Hum Genet **72**(3): 763-71.
- Villa, A., P. Vezzoni, et al. (2006). "Osteopetroses and immunodeficiencies in humans." Curr Opin Allergy Clin Immunol **6**(6): 421-7.
- Waguespack, S. G., S. L. Hui, et al. (2007). "Autosomal dominant osteopetrosis: clinical severity and natural history of 94 subjects with a chloride channel 7 gene mutation." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 771-8.
- Weng, T. X., B. F. Godley, et al. (2002). "Oxidant and antioxidant modulation of chloride channels expressed in human retinal pigment epithelium." Am J Physiol Cell Physiol **283**(3): C839-49.
- White, A. and G. Wallis (2001). "Endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralisation." Curr Biol **11**(15): R589-91.
- Xing, L., T. P. Bushnell, et al. (2002). "NF-kappaB p50 and p52 expression is not required for RANK-expressing osteoclast progenitor formation but is essential for RANK- and cytokine-mediated osteoclastogenesis." J Bone Miner Res **17**(7): 1200-10.
- Yoshida, H., S. Hayashi, et al. (1990). "The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene." Nature **345**(6274): 442-4.
- Zaidi, M., H. C. Blair, et al. (2003). "Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics." J Bone Miner Res **18**(4): 599-609.
- Zaidi, M., et al. (2007). "Skeletal remodeling in health and disease." Nat Med. **13**(7):791-801. Review.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mir im Laufe meiner Doktoranten Tätigkeit mit Rat und Tat beistanden.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Thomas J. Jentsch bedanken, der mir die Möglichkeit gab an diesem Projekt zu arbeiten unter hervorragend zur Verfügung gestellten Arbeitsbedingungen.

Ebenfalls danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. Denise Horn für die freundliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem in erster Linie Herrn Dr. Uwe Kornak für die beispielhafte Unterstützung durch grosse fachliche und menschliche Kompetenz während der gesamten Zeit der Promotionsarbeit. Ohne seine stetige Motivation wäre diese Arbeit nicht zu Stande und zum Abschluss gekommen.

Weiter danke ich Frau Dr. Dagmar Kaspar und Herrn Dr. Jens Fuhrmann, die mich ebenfalls während meiner praktischen Arbeit unterstützten.

Nicht zu vergessen sind alle anderen Mitarbeiter der ehemaligen Arbeitsgruppe Jentsch am ZMNH, bei denen ich für die nette Zusammenarbeit meinen Dank aussprechen möchte. Danke!

9 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

10 Erklärung

„Ich, Juliana He-Jung Park, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Morphologische Charakterisierung der osteosklerotischen oc-Mausmutante im Zusammenhang mit Chloridkanal ClC-7“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift