

## Abstract

The CLC proteins form a family of chloride channels and transporters. CIC-7, a member of this family, is broadly expressed and localizes to late endosomes and lysosomes where it is thought to support lysosomal acidification. Mutations in CIC-7 cause osteopetrosis and lysosomal storage disease in humans and mice. CIC-7 knockout mice display lysosomal storage material in neurons and in the proximal tubule of the kidney. Neurons of the CNS die as a result, and the mice are blind due to a degeneration of the retina.

Severe osteopetrosis is also caused by mutations in the *OSTM1* gene that encodes a type I transmembrane protein with unknown function. In my thesis I could show that both CIC-7 and Ostm1 proteins co-localize in late endosomes and lysosomes of various tissues, as well as in the ruffled border of bone-resorbing osteoclasts. Co-immunoprecipitations show that CIC-7 and Ostm1 form a molecular complex and suggest that Ostm1 is a  $\beta$ -subunit of CIC-7. Ostm1 needs CIC-7 to reach lysosomes, whereas CIC-7 does not require Ostm1 for trafficking. The luminal domain of Ostm1 is highly glycosylated and cleaved by endolysosomal proteases.

I analyzed Ostm1-deficient *grey-lethal* mice and found that protein levels of CIC-7 are reduced below 10% of normal in tissues including brain, kidney and bone, as well as in osteoclasts in situ. Thus, the interaction with Ostm1 is likely important for protein stability, and Ostm1 mutations might cause osteopetrosis by impairing the acidification of the osteoclast resorption lacuna that depends on CIC-7. I could further show that *grey-lethal* mice, just like CIC-7 knock-out mice, display lysosomal storage, retina- and CNS neurodegeneration in addition to osteopetrosis, pointing to a more general importance of CIC-7/Ostm1 complexes.



# Zusammenfassung

Die CLC-Proteine bilden eine Familie von Chloridkanälen und -transportern. CIC-7, ein Mitglied dieser Familie, ist ubiquitär exprimiert und lokalisiert auf späten Endosomen und Lysosomen. Mutationen in CIC-7 führen zu Osteopetrose und lysosomaler Speicherkrankheit in Maus und Mensch. CIC-7 Knockoutmäuse zeigen lysosomales Speichermaterial in Neuronen und Zellen des proximalen Tubulus der Niere. Die Mäuse sind aufgrund einer Retinadegeneration blind und sterben früh an der fortschreitenden Neurodegeneration und schweren Osteopetrose.

Mutationen in dem Gen *Ostm1*, das für ein Typ-I-Transmembranprotein unbekannter Funktion kodiert, führen ebenfalls zu einer schweren Osteopetrose. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass CIC-7 und Ostm1 in späten Endosomen und Lysosomen verschiedener Gewebe, sowie der *ruffled border* knochenresorbierender Osteoklasten kolokalisieren. Koimmunopräzipitationen zeigen, dass CIC-7 und Ostm1 einen molekularen Komplex bilden und legen nahe, dass es sich bei Ostm1 um eine  $\beta$ -Untereinheit von CIC-7 handelt. Ostm1 benötigt CIC-7 um Lysosomen zu erreichen, während die Zielsteuerung von CIC-7 nicht Ostm1-abhängig ist. Der luminal Abschnitt von Ostm1 ist hoch glykosyliert und wird von lysosomalen Proteasen gespalten.

Durch die Analyse Ostm1-defizienter *grey-lethal* Mäuse konnte ich zeigen, dass die CIC-7 Proteinmenge in Geweben, wie Gehirn, Leber, Niere und Knochen ebenso wie in Osteoklasten auf unter 10% der normalen Menge reduziert ist. Es liegt nahe, dass die Interaktion von Ostm1 und CIC-7 wichtig für die Proteinstabilität ist. Der von Mutationen in Ostm1 verursachten Osteopetrose liegt somit wahrscheinlich eine gestörte Ansäuerung der Resorptionslakune zugrunde, die abhängig von CIC-7 und Voraussetzung für den Abbau von Knochen ist. Desweiteren konnte ich zeigen, dass *grey-lethal* Mäuse genauso wie CIC-7 Knockoutmäuse zusätzlich zu der Osteopetrose lysosomales Speichermaterial sowie eine Retina- und Neurodegeneration aufweisen. Dies deutet auf eine allgemeine Bedeutung des CIC-7/Ostm1-Komplexes hin.