

1 Einleitung

Zellen sind die strukturellen und funktionellen Einheiten lebender Organismen und stellen einen von der Umwelt weitestgehend abgeschlossenen Raum dar, in dem die Prozesse des Lebens ablaufen. Die äußere Grenze dieses Raumes wird von Membranen gebildet, die den Ein- und Ausstrom von Stoffen begrenzen und regulieren. In eukaryontischen Zellen unterteilen Membranen zudem den intrazellulären Raum in abgeschlossene Kompartimente und separieren hierdurch einzelne Prozesse und Komponenten. Sie ordnen komplexe Reaktionsabläufe und sind essentiell für die Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes. Membranen verfügen über bemerkenswerte Eigenschaften, die in ihrem Aufbau und ihrer Zusammensetzung begründet sind.

1.1 Membranen

Biomembranen sind Doppelschichten aus Phospho- und Glykolipiden, die aus einer hydrophilen Kopfgruppe und hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänzen aufgebaut sind. In wässriger Umgebung bilden diese amphiphatischen Moleküle geordnete Strukturen aus, wobei sich die hydrophile Kopfgruppe dem wässrigen Milieu zuwendet und die lipophilen Regionen miteinander in Kontakt treten. Diese so entstandenen Lipiddoppelschichten sind flexibel, selbstschließend und selektiv permeabel. Ihre Flexibilität ermöglicht die nötige Formveränderung, die mit Zellwachstum und Bewegung einhergeht. Die Möglichkeit des Brechens und Wiederverschließens erlaubt zudem die Fusion zweier Membranen. Dies ermöglicht einen vielfältigen Membranfluss, wie er für Prozesse der Exozytose, Endozytose oder Zellteilung nötig ist.

Membranen bilden des Weiteren in einer dreidimensionalen Zelle eine zweidimensionale Umgebung. So können Proteine, entweder die Membran durchspannend, in ihr verankert, oder nur peripher mit ihr assoziiert, Netzwerke ausbilden. In diesen können Vorgänge wie Proteininteraktion und -modifikation sowie enzymatische Reaktionen um ein Vielfaches schneller ablaufen als es frei in Lösung möglich wäre.

Während die Lipiddoppelschicht permeabel für kleine, ungeladene Moleküle und in

gewissem Maße auch für Wasser ist, stellt sie für die meisten wasserlöslichen Makromoleküle und Ionen eine nur schwer zu überwindende Barriere dar. Auf diese Weise können auf beiden Seiten einer Membran unterschiedliche Bedingungen, wie etwa Stoffkonzentration oder Ladungsverteilung, vorherrschen.

Die Ionenzusammensetzung in der Zelle ist für viele Zellfunktionen von entscheidender Bedeutung. Die häufigsten anorganischen Ionen im lebenden Organismus sind Kationen, wie Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Calcium (Ca^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}) und Anionen, wie Chlorid (Cl^-), Hydrogencarbonat (HCO_3^-) und Sulfat (SO_4^{2-}). Durch eine Vielzahl von Transportprozessen sind die Konzentrationen für die entsprechenden Ionen intrazellulär und extrazellulär sehr unterschiedlich. Über Biomembranen herrscht daher ein für die Membran und den jeweiligen Zellzustand spezifischer elektrochemischer Gradient.

1.1.1 Transport über Membranen

Der Transport dieser Ionen über die Membran wird durch eine Vielzahl an Transportproteinen ermöglicht, die in drei Gruppen als Ionenkanäle, Transporter oder Pumpen klassifiziert werden.

Pumpen sind ATPasen, die die Energie der ATP-Hydrolyse verwenden, um Ionen und kleine Moleküle gegen ihren elektrochemischen Gradienten über die Membran zu transportieren. Dieser Prozess wird auch als primär aktiver Transport bezeichnet. Ein Beispiel für eine solche Pumpe ist die vakuoläre H^+ -ATPase. Dieser multimeren Proteinkomplex transportiert Protonen über die Membran von intrazellulären Kompartimenten, zum Beispiel den Endosomen, Lysosomen und Vakuolen, und sorgt damit für deren Ansäuerung.

Kanäle sind integrale Membranproteine, die einen hydrophilen Kanal durch die hydrophobe Membran bilden. Durch diesen wird die Diffusion von Wasser und Ionen durch die Lipiddoppelschicht entlang ihres elektrochemischen Gradienten ermöglicht und reguliert. Die Regulation des Ionenstroms erfolgt durch das Öffnen oder Schließen des Kanals (*gating*), das von der Spannung oder von Liganden beeinflusst werden kann. Es werden daher spannungs- und ligandengesteuerte Kanäle unterschieden. Zudem gibt es noch mechanosensitive Kanäle, bei denen der zugrunde liegende Regulationsmechanismus noch unklar ist. Die meisten Ionenkanäle haben unterschiedliche Leitfähigkeiten für verschiedene Ionensorten, wobei die Selektivität bezüglich der Ladung der Ionen am größten ist. Dies führt zu einer Unterteilung in Anionen- und Kationenkanäle, welche sich wiederum entsprechend des Ions mit der höchsten Leitfähigkeit zum Beispiel in Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle untergliedern lassen. Da mehrere Ionen den Proteinkanal in schneller

Folge passieren können, haben Ionenkanäle einen sehr hohen Durchsatz in der Größenordnung von 10^8 Molekülen pro Sekunde.

Transporter bilden klassischerweise die dritte Gruppe an Transportproteinen. Im Gegensatz zu dem Ionenfluss durch Kanäle setzt der Transport von jedem Ion eine Konformationsänderung des Transporters voraus. Hierdurch ist der Durchsatz von Transportern mit 10^2 - 10^4 Molekülen pro Sekunde deutlich niedriger als der von Kanälen. Sogenannte Kotransporter können mehrere Ionensorten gleichzeitig in die gleiche (Symport) oder entgegengesetzte (Antiport) Richtung transportieren. Sie ermöglichen damit die Kopplung eines Transportes gegen den elektrochemischen Gradienten an den Fluss einer zweiten Ionensorte mit ihrem elektrochemischen Gradienten. Da der treibende elektrochemische Gradient zumeist durch eine ATP hydrolysierende Pumpe aufgebaut wird, bezeichnet man diesen Prozess auch als sekundär aktiven Transport.

1.2 CLC Chloridkanäle und -transporter

Die Familie der CLC-Proteine umfasst sowohl klassische spannungsgesteuerte Chloridkanäle wie auch Transporter in Form von Cl^-/H^+ -Kotransportern.

Chlorid ist im Vertebratenorganismus mit rund 115 mM das Anion mit der höchsten extrazellulären Konzentration. Die intrazelluläre Chloridkonzentration liegt je nach Zelltyp bei 4-40 mM. Dies bedingt, dass Anionenströme hauptsächlich von Chlorid getragen werden. Daher betrachtet man Anionenkanäle funktionell als Chloridkanäle, auch wenn sie in unterschiedlichem Ausmaß prinzipiell auch für andere Anionen permeabel sind. Das Gleichgewichtspotential von Chlorid liegt im Bereich von -90 bis -30 mV und somit in der Nähe des Ruhepotentials der meisten Zellen, welches in der Regel um -60 mV beträgt. Der Chloridstrom über die Zellmembran ist daher in solchen Zellen sehr klein. In einigen Zellen kann es jedoch nach Veränderung der intrazellulären Chloridkonzentration zu einer De- oder Hyperpolarisation nach Öffnung von Chloridkanälen kommen. Die Regulation des Chloridgehaltes erfolgt einerseits über Na^+/Cl^- - oder $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Kotransporter, die die intrazelluläre Chloridkonzentration erhöhen, und K^+/Cl^- -Kotransporter, die dem entgegenwirken. $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher erhöhen die intrazelluläre Chloridionenkonzentration meistens, können Chlorid aber in beide Richtungen in Abhängigkeit vom pH-Wert transportieren.

Chloridkanäle und -transporter sind in der Zelle an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt [JENTSCH et al. 2002]. An der Plasmamembran spielen sie bei der Zellvolumen-

regulation, dem transepithelialen Transport sowie der Regulation der elektrischen Erregbarkeit eine entscheidende Rolle. In intrazellulären Kompartimenten tragen sie zu der Elektroneutralität von Transmembrantransporten und der Einstellung der natürlichen Ionenkonzentrationen bei.

Neben den im folgenden näher behandelten CLC-Proteinen wurden bisher ligandengesteuerte Chloridkanäle wie die GABA- und Glycinrezeptoren sowie der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) als Chloridkanäle beschrieben und charakterisiert. Eine Reihe putativer Chloridkanäle wie CLCA, Bestrophin und die CLIC-Proteine konnten bisher noch nicht zweifelsfrei als Chloridkanäle charakterisiert werden [JENTSCH et al. 2002].

Die Familie der CLC-Proteine ist evolutionär konserviert. CIC-0 wurde als erster Vertreter aus dem elektrischen Organ des Rochens *Torpedo marmorata* kloniert [JENTSCH et al. 1990]. Heute sind CLC-Homologe in Eu- und Archaeobakterien und in Hefen beschrieben [LURIN et al. 2000, FUJITA et al. 1994, GREENE et al. 1993]. In Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurden ebenfalls CLC-Proteine identifiziert und teilweise auch elektrophysiologisch charakterisiert [SCHRIEVER et al. 1999, HECHENBERGER et al. 1996, RUTLEDGE et al. 2001, FLORES et al. 2006].

In Säugetieren umfasst die Familie 9 Mitglieder. Sie können in drei Unterfamilien, die untereinander weniger als 30% Sequenzhomologie aufweisen, gegliedert werden [JENTSCH et al. 2002]. Die Vertreter der ersten Unterfamilie, CIC-1 und -2, sowie die Kanäle CIC-Ka und -Kb, sind vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert. Bei den Mitgliedern dieser Unterfamilie handelt es sich um echte Chloridkanäle. Vertreter der anderen Unterfamilien (CIC-3, -4 und -5 bzw. CIC-6 und -7) sind hauptsächlich auf intrazellulären Vesikeln lokalisiert und bilden die zweite, respektive dritte Unterfamilie (siehe Abbildung 1.1).

2004 konnte gezeigt werden, dass es sich bei CIC-ec1 aus *Escherichia coli* nicht um einen klassischen Chloridkanal, sondern um einen Cl^- - H^+ -Antiporter handelt [ACCARDI und MILLER 2004]. Dieser koppelt den Transport von Chloridionen an einen entgegengesetzten Transport von Protonen in einem Verhältnis von etwa 2:1. Kurze Zeit später wurde ein solcher Antiportmechanismus auch für die Säuger-CLCs CIC-4 und -5 der zweiten Unterfamilie beschrieben [SCHEEL et al. 2005, PICOLLO und PUSCH 2005]. CIC-6 und -7, die zusammen die dritte Unterfamilie bilden, konnten bisher noch nicht elektrophysiologisch charakterisiert werden. Sowohl CIC-6, als auch CIC-7 weisen neben

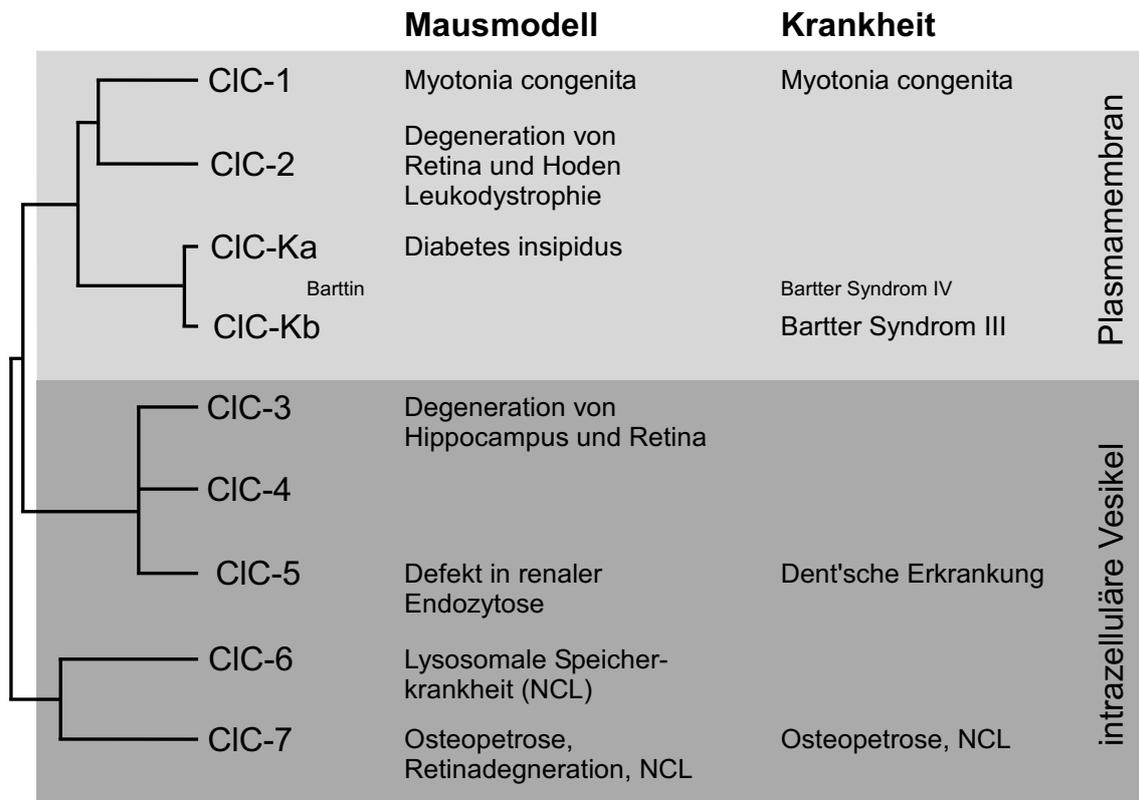


Abbildung 1.1: Die CLC-Chloridkanalfamilie der Säuger. Das Dendrogramm zeigt die Verteilung der neun CLC-Proteine auf die drei Unterfamilien. Verursachte Krankheiten in Maus und Mensch sind angegeben. Bei den an der Plasmamembran lokalisierten Vertretern der ersten Gruppe handelt es sich um echte Chloridkanäle, bei den der zweiten und wahrscheinlich auch dritten Gruppe hingegen um Cl^-/H^+ -Kotransporter. (Modifiziert nach [JENTSCH et al. 2002]).

dem sogenannten 'gating'-Glutamat eine weiteres, charakteristisches Glutamat auf. Dieses sogenannte 'proton'-Glutamat ist unter den CLC-Antiportern konserviert, fehlt jedoch in den CLC-Kanälen. Aufgrund dieses konservierten Glutamats wird auch für CIC-6 und CIC-7 von einem Cl^-/H^+ -Antiportmechanismus ausgegangen [JENTSCH 2007].

Die physiologische Relevanz der CLC-Proteine wird eindrucksvoll durch die Vielfalt der humanen Erkrankungen, die mit Mutationen in diesen Proteinen assoziiert sind, unterstrichen (siehe Abb. 1.1) [JENTSCH et al. 2005]. So führen Mutationen in CIC-1 zu Myotonia congenita [STEINMEYER et al. 1991, KOCH et al. 1992] und Defekte in CIC-KB führen zu dem Bartter Syndrom [SIMON et al. 1997]. Die Dent'sche Erkrankung kann durch Defekte in CIC-5 ausgelöst werden [LLOYD et al. 1997], wohingegen Mutationen in CIC-7 zu Osteopetrose führen [KORNAK et al. 2001].

1.2.1 Die Struktur der CLC-Proteine

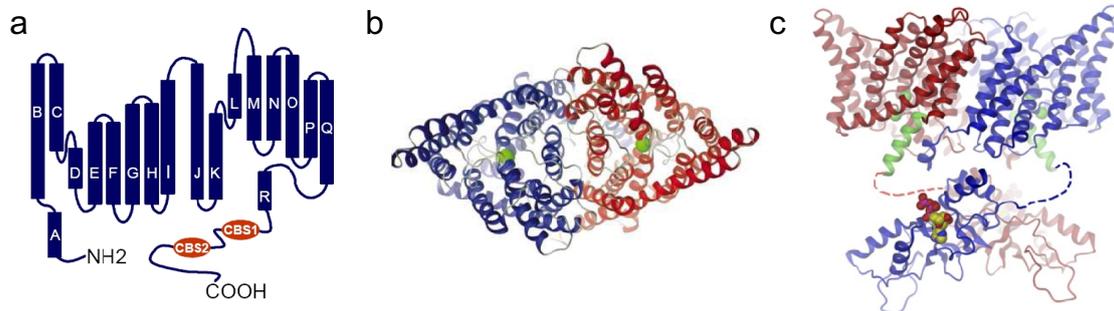


Abbildung 1.2: Topologie und Struktur eukaryontischer CLC-Kanäle und -Transporter. a, Die 18 Helices, von denen nur einzelne die Membran vollständig durchspannen, weisen eine interne Homologie zwischen der N-terminalen (Helix A-I) und der C-terminalen (Helix J-R) Proteinhälfte auf [DUTZLER et al. 2002]. b, Struktur eines CLC-Dimers von *Salmonella typhimurium* in der Aufsicht aus dem extrazellulären Raum. In grün sind die Cl⁻Ionen in den beiden getrennten Poren angedeutet [DUTZLER et al. 2002]. c, Putative Struktur eines eukaryontischen CLC mit intrazellulärer Domäne von der Membranebene aus betrachtet. Die Struktur ist zusammengesetzt aus dem Transmembranbereich von ecClC aus *Escherichia coli* sowie dem C-Terminus von ClC-5 mit gebundenem ATP. Chloridionen sind als grüne Sphären dargestellt [DUTZLER 2007].

Die Struktur von CLC-Proteinen konnte mittels biochemischer und elektrophysiologischer Untersuchungen eukaryontischer CLC-Proteine [JENTSCH et al. 1990, LUDEWIG et al. 1996] sowie über Kristallstrukturanalysen prokaryotischer CLC-Kanäle aus *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* [DUTZLER et al. 2002] aufgeklärt werden (Abb. 1.2). Zwei identische Untereinheiten bilden einen funktionellen Kanal. Dabei besteht der Transmembranbereich jeder Untereinheit aus 17 α -Helices, von denen nur einzelne die Membran vollständig durchspannen. Die beiden Untereinheiten bilden über diesen Transmembranbereich eine ausgedehnte Kontaktfläche miteinander aus, verfügen jedoch jeweils über eine separate Pore. Dieses *double barrel*-Modell wurde aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen schon 1984 postuliert [MILLER und WHITE 1984]. Es unterscheidet sich deutlich von den bekannten Strukturen der Kationenkanäle und GABA- sowie Glycinrezeptoren, bei denen alle Untereinheiten an der Bildung einer Pore beteiligt sind. Die Bildung von Heterodimeren aus verschiedenen CLC-Untereinheiten konnte *in vitro* [LORENZ et al. 1996, WEINREICH und JENTSCH 2001] und für ClC-4/5 *in vivo* [MOHAMMAD-PANAH et al. 2003] nachgewiesen werden.

Elektrophysiologische Studien insbesondere an ClC-0 ergaben, dass die Kanäle spannungssensitiv sind und durch zwei Mechanismen gesteuert werden: erstens eine schnelle Aktivierung, die für beide Untereinheiten unabhängig erfolgt, und zweitens einen gemeinsamen Porenschluss. Öffnen und Schließen können durch die Chloridionenkonzentration

und den pH-Wert moduliert werden [PUSCH et al. 1995]. Da für CLC-6 und CLC-7 eine Expression an der Plasmamembran bisher nicht möglich war, sind ihre elektrophysiologische Eigenschaften weiterhin unklar.

Die bislang elektrophysiologisch charakterisierten CLC-Proteine zeigen eine Leitfähigkeit von $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ und werden über das Membranpotential, das Zellvolumen, den pH oder die Chloridkonzentration reguliert [JENTSCH et al. 2002]. Einige Studien zeigen eine regulatorische Beteiligung von intrazellulären Botenstoffen und Phosphorylierung [VANOYE und GEORGE 2002, FURUKAWA et al. 2002, BENNETTS et al. 2005].

Die C-Termini eukaryontischer CLC-Proteine weisen im Gegensatz zu den prokaryontischen Vertretern zwei CBS-Domänen auf. CBS-Domänen wurden in der Cystathion- β -Synthase identifiziert [BATEMAN 1997] und zeichnen sich durch ihr oft paarweises Auftreten und gegenseitige Interaktion aus. Das gehäufte Auftreten krankheitsverursachender Mutationen in diesen Domänen weist auf eine physiologisch wichtige Funktion hin. Neuere Untersuchungen bei CLC-Kanälen deuten auf eine Beteiligung an Oligomerisationsprozessen und Lokalisationsmechanismen hin [CARR et al. 2003, ESTEVEZ et al. 2004, HEBEISEN et al. 2004]. Für die CBS-Domänen von CLC-1 [BENNETTS et al. 2005], CLC-2 [SCOTT et al. 2004] und CLC-5 [WELLHAUSER et al. 2006, MEYER et al. 2007] konnte eine Bindung von ATP und anderen Adenosinphosphaten gezeigt werden, weshalb eine regulatorische Funktion postuliert wurde. Der genaue Mechanismus einer solchen Regulation und ihre physiologische Rolle bleibt jedoch weiterhin unklar, da die Affinität für ATP, ADP und AMP in den Untersuchungssystemen sehr ähnlich war. Neueste Studien an CLC-K deuten darauf hin, dass bei CLC-Proteinen nur die CBS-2-Domäne an der Dimerisierung beteiligt ist, wohingegen bisher von einer antiparallelen Interaktion zwischen CBS-1 und CBS-2 der beiden Untereinheiten ausgegangen wurde [MARKOVIC und DUTZLER 2007]. Innerhalb eines Monomeres binden CBS-1 und CBS-2 aneinander. Die Funktion der CBS-Domänen in CLC-Proteinen ist darüber hinaus noch weitgehend unverstanden.

1.2.2 Bindungspartner von CLC-Proteinen

Kanäle und Transporter sind oft aus mehreren Untereinheiten, die für die Bildung der Pore, die Regulation oder die Stabilität des Komplexes verantwortlich sind, aufgebaut. Zudem können sie in dem Zytoskelett verankert sein und mit Transport- und Motorproteinen interagieren. Schließlich kann durch Bindung von Enzymen wie Phosphatasen und Kinasen eine vielfältige Regulation des Komplexes erfolgen. Für CLC-Proteine sind eine

Reihe von Interaktionen mit anderen Proteinen beschrieben worden.

Für eine Spleißvariante von CIC-3 konnte eine Assoziation mit GOPC (Golgi-assoziiertes PDZ- und coiled-coil-motivtragendes Protein) [GENTZSCH et al. 2003] gezeigt werden. CIC-5 interagiert mit Cofilin [HRYCIW et al. 2003], der Ubiquitin-Proteinligase WWP2 [SCHWAKE et al. 2001] und Nedd4-2 [HRYCIW et al. 2004] und möglicherweise NHERF2 (*sodium-proton exchange regulatory factor 2*) [HRYCIW et al. 2006]. Für CIC-2 konnte eine Bindung an Dynein gezeigt werden [DHANI et al. 2003].

Mit Barttin konnte 2001 eine essentielle β -Untereinheit von CIC-Ka und -Kb identifiziert werden [BIRKENHÄGER et al. 2001, ESTÉVEZ et al. 2001]. Barttin besitzt zwei Transmembrandomänen sowie einen kurzen N-Terminus und einen langen C-Terminus, die beide zytoplasmatisch lokalisiert sind. Mutationen im N-Terminus führen bei Menschen zum Bartter-Syndrom Typ IV. Dies äußert sich in der von CIC-Ka Defizienz bekannten Diabetes Insipidus sowie dem von CIC-Kb bekannten renalen Salzverlust und zusätzlicher Taubheit. Barttin ist in der basolateralen Membran spezifischer Nierentubuli sowie in der basolateralen Membran kaliumsezernierender Epithelien im Innenohr lokalisiert, in denen es mit CIC-Ka/Kb kolokalisiert. Nach alleiniger ektopischer Expression von CIC-Ka, -Kb oder Barttin in Oozyten sind keine oder nur geringe Ströme messbar. Barttin erhöht jedoch die Oberflächenexpression von CIC-K, so dass nach heterologer Expression von CIC-K/Barttin größere Ströme gemessen werden können [ESTÉVEZ et al. 2001].

1.2.3 Die CLC-Proteine des endozytotischen Weges

Die intrazellulären Vertreter der CLC-Familie sind auf Vesikeln des endozytotischen und sekretorischen Weges lokalisiert. Der endozytotische Weg stellt ein Netzwerk aus membranumschlossenen Vesikeln und Kompartimenten dar, das für die Aufnahme von Molekülen aus dem extrazellulären Raum, sowie ihren intrazellulären Transport und oft ihren Abbau zuständig ist (siehe Abbildung 1.3). Es steht in engem Kontakt mit dem sekretorischen Weg, über den neu synthetisierte Proteine an die Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum gelangen. Über beide Wege wird durch kontinuierliche Abschnürung von Vesikeln an der Plasmamembran sowie Fusion solcher mit der Plasmamembran der Membranhalt im Gleichgewicht gehalten.

Durch rezeptorvermittelte Endozytose oder Flüssigphasenendozytose, bei der ein kleiner Teil der Plasmamembran als Vesikel abgeschnürt wird, gelangt endozytiertes Material

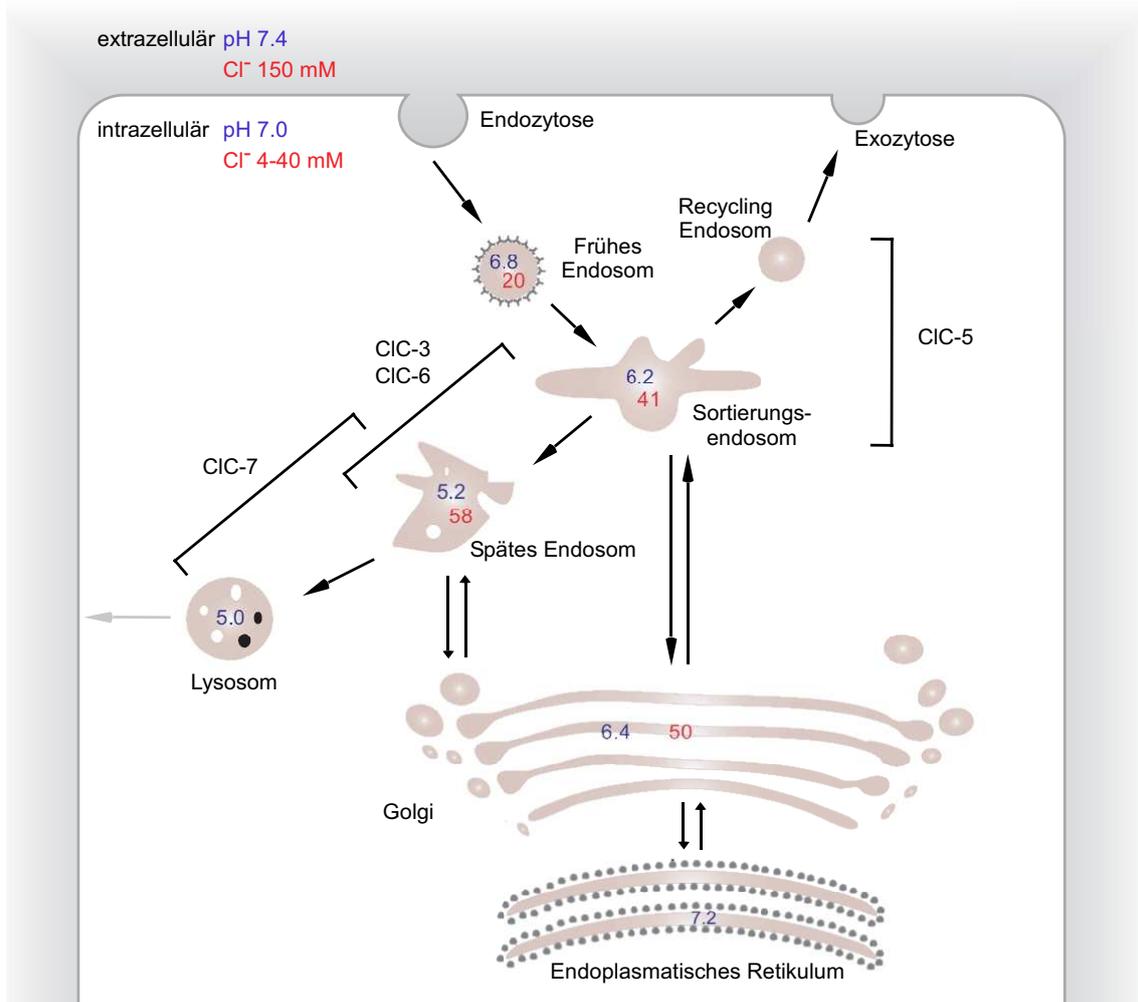


Abbildung 1.3: CLC-Proteine im endozytotischen Weg. Membran- und Proteinfluss durch intrazelluläre Kompartimente. Die verschiedenen Kompartimente des endo- und exozytotischen Weges stehen in engem Austausch. Die einzelnen Kompartimente unterscheiden sich in Protein- und luminaler Ionenkomposition (pH, blau; Chloridkonzentration, rot, in mM). Die Lokalisation der intrazellulären Vertreter der CLC-Proteinfamilie ist angegeben. Modifiziert nach [FAUNDEZ und HARTZELL 2004].

nach weniger als fünf Minuten in frühe Endosomen und weiter in die oft tubulären Sortierungsendosomen. Proteine, die nicht zur Degradation bestimmt sind, gelangen aus dem Sortierungsendosomen in die Recyclingendosomen, von wo aus sie zurück an die Plasmamembran transportiert werden. Etwa 4-30 Minuten nach der Aufnahme wird das späte Endosom erreicht. Dieses Kompartiment weist oft Lysobisphosphatidische-Säure (LBPA) reiche, intraluminale Vesikel auf, die an der Sortierung der Proteine für einen Abbau in Lysosomen beteiligt sind. Aufgrund dieser intraluminale Vesikel wird es als *multivesicular body* (MVB) bezeichnet [GRUENBERG und STENMARK 2004]. Aus dem spä-

ten Endosom gelangen Proteine in das Lysosom.

Neu synthetisierte Proteine können das Lysosom über zwei Wege erreichen. Zum einen können sie über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert werden, von der sie mittels adapter- oder rezeptorvermittelter Endozytose über den endozytotischen Weg in das Lysosom sortiert werden. Zum anderen können sie direkt über adaptervermittelte Sortierung aus dem Golgi-Apparat in Endosomen gelangen [NAKATSU und OHNO 2003].

Der genaue Mechanismus, wie Material von frühen Endosomen bis zu Lysosomen transportiert wird, konnte noch nicht zweifelsfrei geklärt werden. Verschiedene Modelle, wie die Reifung vom Endosom zu Lysosom oder ein vesikulärer Transport, bei dem Vesikel Material von Endosomen zu Lysosomen transportieren, wurden vorgeschlagen. Ebenso sind eine kurzzeitige Fusion zweier Vesikel, bei der ein Teil des Materials ausgetauscht wird (*kiss and run*), die vollständige Fusion von Endosom und Lysosom (*fusion*) oder eine Neubildung von Lysosom und Endosom aus einem zuvor gebildeten Hybridorganell (*fusion-fission*) in der Diskussion [LUZIO et al. 2007].

Das Lysosom wird allgemein als Endpunkt des endozytotischen Weges verstanden und für dieses Kompartiment bestimmte, neu synthetisierte oder endozytierte Proteine müssen zuvor das späte Endosom passieren. Das Lysosom ist ein vesikuläres Kompartiment, welches reich an hydrolysierenden Enzymen und verantwortlich für den Abbau von Makromolekülen ist [KORNFELD und MELLMAN 1989]. Entdeckt wurde das Lysosom vor 50 Jahren von Christian de Duve bei Untersuchungen der intrazellulären Verteilung von Enzymen durch differentielle Zentrifugation [BAUDHUIN et al. 1965]. In Säugetierzellen misst es üblicherweise etwa 0,5 µm im Durchmesser und hat einen elektronendichten Kern. Heute charakterisiert man Lysosomen durch ein saures Lumen sowie die Proteine Syntaxin 7, Rab7 und die Glycoproteine Lamp-1, Lamp-2 und Lamp-3 (CD63), die sie mit späten Endosomen gemeinsam haben. Von späten Endosomen sind sie durch das Fehlen des Mannose-6-Phosphatrezeptors sowie die Anwesenheit von prozessiertem Cathepsin D zu unterscheiden [KORNFELD und MELLMAN 1989]. Der luminale pH von 4,6-6,0 wird durch eine H⁺-ATPase aufrecht gehalten [MELLMAN et al. 1986]. Lysosomen und lysosomenähnliche Kompartimente sind neben dem Proteinabbau für eine Reihe spezialisierter Funktionen verantwortlich. Hierzu zählen etwa die Antigenpräsentation von MHC Klasse II Molekülen [HARDING und GEUZE 1993] und der Knochenabbau [BARON et al. 1985]. Melanosomen sind an der Reifung und Sekretion von Pigmenten beteiligt, und die lytischen Körper der cytotoxischen T-Lymphozyten essentiell für die Immunantwort.

1.2.4 Ansäuerung von Endosomen und Lysosomen

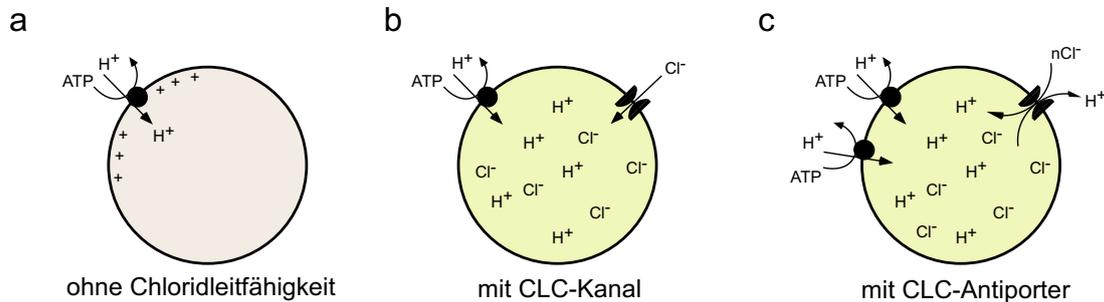


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Vesikelansäuerung. a) der von der H⁺-ATPase vermittelte Protoneneinstrom führt zu einem innen positiven Membranpotential und dem Erliegen des Protoneneinstroms. Das Vesikel wird nur schwach angesäuert. b) Ein CLC-Chloridkanal vermittelt den Einstrom negativer Ladung, so dass der Protonentransport der H⁺-ATPase elektroneutral ablaufen kann. Das Vesikel kann stark angesäuert werden. c) Ein Cl⁻/H⁺-Antiporter der CLC-Familie vermittelt einen Einstrom negativer Ladung bei gleichzeitigem Export von H⁺. Das Vesikel kann ebenso stark angesäuert werden. Der ATP-Verbrauch ist jedoch größer (hier durch Darstellung von zwei H⁺-ATPasen angedeutet), da ein Teil der H⁺-Ionen das Vesikel über den Antiporter wieder verlässt.

Die Kompartimente des endozytotischen und sekretorischen Weges sind verschieden stark angesäuert. Nach der Endozytose fällt der luminaire pH von etwa 6,8 in frühen Endosomen bis auf etwa pH 5,0 im Lysosom ab (siehe Abb. 1.3). Der pH ist eine physiologisch wichtige Größe. Die Aktivität von Enzymen sowie vielen anderen Prozessen ist an ein spezifisches pH-Optimum gebunden. So ist etwa ein saurer pH für die endosomale Dissoziation von Rezeptor-Liganden-Komplexen und Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Enzym-Komplexen von entscheidender Bedeutung. Auch die Aufnahme von Neurotransmittern in synaptische Vesikel zeigt eine starke pH-Abhängigkeit.

In intrazellulären Kompartimenten des endozytotischen und sekretorischen Weges wird eine Absenkung des pH durch metabolische Prozesse im Vesikel und den Transport von Protonen in das Lumen erreicht. Die Akkumulation von Protonen in Vesikeln wird im wesentlichen durch die zu den Pumpen zählende vakuoläre H⁺-ATPase unter ATP-Hydrolyse vermittelt.

Die vakuoläre H⁺-ATPase ist ein großer, multimerer Proteinkomplex, der aus zwei Teilen besteht. Der in die Membran inserierte V₀-Sektor bildet die Pore, während der zytoplasmatische V₁-Sektor für die ATP-Hydrolyse verantwortlich ist. Die H⁺-ATPase ist ubiquitär exprimiert, ihre Zusammensetzung aus verschiedenen Isoformen der einzelnen Untereinheiten variiert jedoch je nach Gewebe und subzellulärer Lokalisation [NISHI und FORGAC 2002]. So ist etwa die α3-Untereinheit des V₀-Sektors überwiegend lysosomal lokalisiert [TOYOMURA et al. 2003].

Die Ansäuerung der Vesikel durch die H^+ -ATPase ist elektrogen und führt zur Entstehung eines innen positiven Membranpotentials, das den weiteren Import von Protonen behindert (siehe Abb. 1.4a). Neben der H^+ -ATPase sind in den vesikulären Membranen jedoch noch weitere Proteine exprimiert, die das Membranpotential und direkt oder indirekt den pH-Wert beeinflussen können [FAUNDEZ und HARTZELL 2004]. Hierzu gehören auch die intrazellulären Vertreter der hier behandelten CLC-Proteinfamilie (Abb. 1.3). Durch den passiven Nachstrom von Cl^- wird das durch die ATPase erzeugte Membranpotential verringert und somit ein niedrigerer pH ermöglicht (siehe Abb. 1.4b). Dass der Abbau des Membranpotentials durch Einstrom von Cl^- eine wesentliche Rolle für die effektive Azidifizierung von vesikulären Kompartimenten spielt, konnte etwa anhand der Knockout Mausmodelle für CLC-3 und -5 gezeigt werden [PIWON et al. 2000, STOBRAWA et al. 2001]. Bildgebende Verfahren zur Cl^- - und pH-Messung haben es zudem erlaubt zu zeigen, dass die Cl^- -Konzentration in Endosomen parallel zu ihrer Ansäuerung ansteigt [SONAWANE et al. 2002, SONAWANE und VERKMAN 2003]. Der Transport von Protonen und die effiziente Ansäuerung durch die H^+ -ATPase sind demnach an den Influx von Cl^- -Ionen gekoppelt, der in vielen Fällen durch CLC-Proteine vermittelt wird.

Wie bereits erläutert, handelt es sich bei einigen, möglicherweise sogar bei allen, intrazellulären Vertretern der CLC-Familie um H^+/Cl^- -Antiporter. Als solche könnten sie ebenfalls einen Ladungsausgleich vermitteln, wobei der ATP-Verbrauch jedoch größer wäre (siehe Abb. 1.4c). Als Antiporter könnten sie jedoch eine unmittelbare Kopplung der Chloridkonzentration an die H^+ -Konzentration herstellen, während durch einen Chloridkanal nur die Kopplung der Chloridkonzentration an das Potential möglich ist.

1.2.5 CLC-7 – Osteopetrose und Neurodegeneration

CLC-7 bildet zusammen mit seinem nächsten Verwandten, dem spät-endosomalen CLC-6 die dritte Unterfamilie der CLC-Proteine. Während CLC-6 nahezu ausschließlich in Neuronen exprimiert ist [POËT et al. 2006], weist CLC-7 eine ubiquitäre Expression auf [BRANDT und JENTSCH 1995, KORNAK et al. 2001, KASPER et al. 2005].

CLC-7 ist vorwiegend in spät-endosomalen/lysosomalen Kompartimenten lokalisiert, wo es mit dem lysosomalen Transmembranprotein-1 (Lamp1) kolokalisiert [KORNAK et al. 2001]. Eine Sonderrolle spielt CLC-7 in Osteoklasten, den knochenresorbierenden Zellen (siehe Kapitel 1.3.1).

Die gezielte Inaktivierung von CLC-7 in der Maus führt zu deutlich reduzierter Körpergröße (Abb. 1.5a) und frühem Tod nach 4-6 Wochen. Anstelle der Markhöhle von Röh-

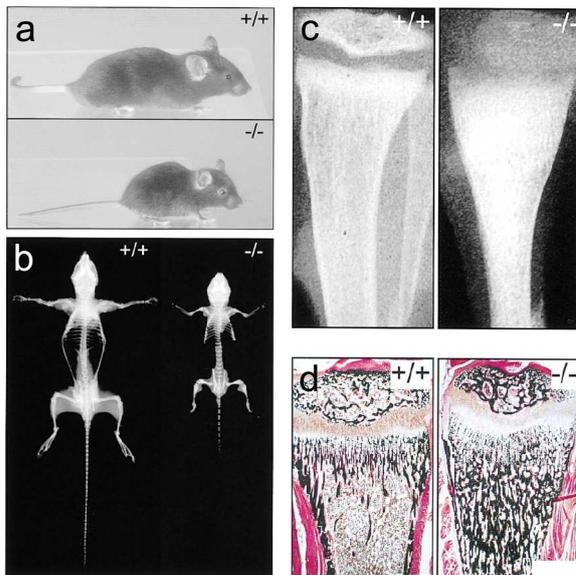


Abbildung 1.5: Osteopetrotischer Phänotyp von *Clcn7*^{-/-}-Mäusen. **a, b)** *Clcn7*^{-/-} Tiere sind deutlich kleiner als ihre Wildtypgeschwister und zeichnen sich durch eine gedrungene Körperhaltung aus. **(b)**, Kontakt-Röntgenaufnahmen. **c, d)** die Tibia von *Clcn7*^{-/-} Tieren weist in Röntgenaufnahmen (**c**) sowie Van-Kossa Färbungen von calcifiziertem Material (schwarz) (**d**) eine erhöhte Knochendichte sowie einen Verlust des Markraumes auf. [KORNAK et al. 2001].

renknochen findet sich calcifiziertes Material (Abb. 1.5b-d). Eine solche vergrößerte Knochendichte wird als Osteopetrose bezeichnet (siehe Kapitel 1.3) und bringt einen deformierten Körperbau, ein gestörtes Immunsystem und extramedulläre Hämatopoese sowie einen unterbleibenden Zahndurchbruch mit sich [KORNAK et al. 2001]. CIC-7-Knockout Geschwister von Mäusen mit brauner Fellfarbe tragen ein graues Fell (AG Jentsch, unveröffentlichte Daten). Mäuse mit einem Defekt im CIC-7-Gen (*Clcn7*) weisen zudem eine Retinadegeneration sowie eine schwere Neurodegeneration auf [KASPER et al. 2005].

Diese bei CIC-7 defizienten Mäusen beobachtete Neurodegeneration zeichnet sich durch eine fortschreitende Degeneration des Hippocampus, insbesondere der CA3-Region, sowie des cerebralen Cortex aus. Sie führt im Alter von etwa 35 Tagen zu einem vollständigen Verlust der Neurone in der CA3 Region. Die beobachtete Neurodegeneration geht mit einer Astrozytose und Mikrogliaaktivierung einher. Nervenzellen aller Hirnregionen weisen perinukleäre Ablagerungen von elektronendichtem Material lysosomalen Ursprungs auf. Das Speichermaterial ist positiv für zwei Marker humaner neuronaler Ceroid-Lipofuscinosen (NCL) [KASPER et al. 2005]. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine genetisch heterogene Gruppe lysosomaler Speicherkrankheiten, als deren gemeinsame Ursache eine lysosomale Disfunktion angenommen wird [MOLE 2004]. Auch in Menschen führen Defekte im *CLCN7*-Gen zu Neurodegeneration [FRATTINI et al. 2003] und schwerer Osteopetrose [KORNAK et al. 2001].

Da CIC-7 mit Ausnahme von Osteoklasten nicht an der Plasmamembran exprimiert ist und auch durch Überexpression von Wildtyp und mutiertem CIC-7 in Säugetierzellen

oder *Xenopus* Oozyten keine Oberflächenexpression erreicht werden konnte, ist bisher keine elektrophysiologische Charakterisierung möglich gewesen. Die Existenz eines bei den Antiportern CIC-4 und -5, nicht aber bei den CLC-Kanälen konservierten 'proton'-Glutamates legt aber eine Funktionsweise als Cl^-/H^+ -Antiporter nahe [JENTSCH 2007].

Messungen des lysosomalen pH mit Hilfe ratiometrischer pH-sensitiver Farbstoffe zeigten, dass in CIC-7 defizienten Zellen keine Veränderung des lysosomalen pH vorliegt. Auch die mit Hilfe eines membranpermeablen Substrates für das lysosomale Enzym Tripeptidylpeptidase I gemessene lysosomale Aktivität erschien unverändert [KASPER et al. 2005]. Bereits zuvor konnte hingegen ein Ansäuerungsdefekt für die Resorptionslakune von CIC-7-Knockout Tieren gezeigt werden [KORNAK et al. 2001].

1.3 Osteopetrose

Der Auf- und Abbau von Knochensubstanz ist ein unverzichtbarer Prozess in sich entwickelnden und ausgewachsenen Knochen. Er ermöglicht die Formgebung und eine Anpassung an die wechselnden mechanischen Belastungen des Knochens. Dieser Prozess beruht auf dem Zusammenspiel zweier Zelltypen: den knochenbildenden Osteoblasten und den Osteoklasten, die wahrscheinlich als einzige Zellen des Organismus zum Knochenabbau befähigt sind.

1.3.1 Osteoklasten

Osteoklasten entstehen aus einkernigen Vorläuferzellen, die unter Stimulation durch Wachstumsfaktoren zu einem reifen Osteoklasten fusionieren, der mit 10 bis 20 Zellkernen leicht eine Größe von 100 μm erreichen kann. Der Knochenabbau setzt eine Anlagerung an die Knochenoberfläche durch Integrine voraus, was eine Reihe von Veränderungen des Zytoskeletts, wie z.B. die Bildung eines Aktinringes um die Stelle der Anhaftung, induziert. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer massiven Fusion saurer Vesikel mit der innerhalb des Aktinringes gelegenen, dem Knochen zugewandten Membran, die sich dadurch vergrößert und auffaltet. In der so entstandenen *ruffled border* ist die vakuoläre H^+ -ATPase hoch exprimiert. Sie pumpt Protonen in den Resorptionslakune genannten Raum zwischen Osteoklast und Knochen (Abb. 1.6). Der saure pH der Lakune führt zur Lösung von Hydroxylapatit aus dem Knochen und ermöglicht die maximale Aktivität der ebenfalls über Vesikel sezernierten sauren Hydrolasen, die die organischen Bestandteile des Knochens, hauptsächlich Kollagen, zersetzen. Die sich in der Lakune anhäufenden

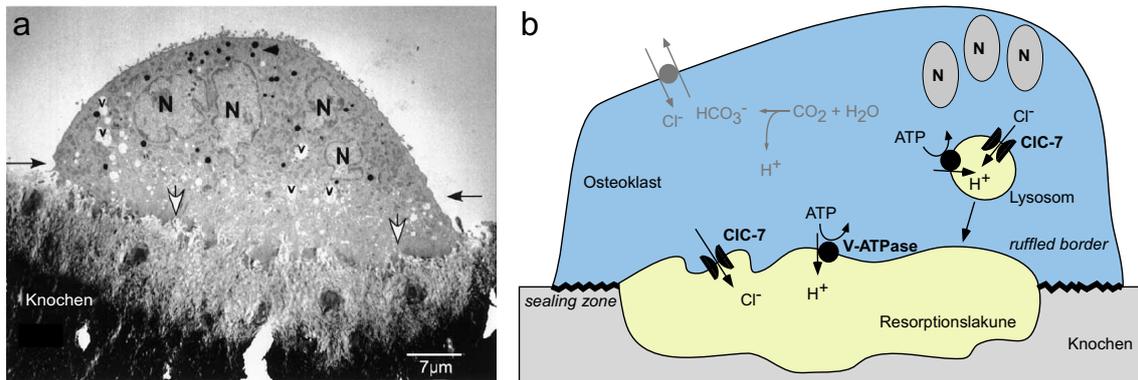


Abbildung 1.6: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines aktiven Osteoklasten.
a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines knochenresorbierenden Osteoklasten. Die *ruffled border* befindet sich zwischen den Pfeilen. (N) Nukleus, (v) endozytotisches Vesikel, (Pfeilspitze) sekretorische Vesikel. **b)** Schematische Zeichnung eines Osteoklasten. Die *ruffled border* sowie die Resorptionslakune werden durch die *sealing zone*, an der der Osteoklast über Integrine fest am Knochen haftet, vom extrazellulären Raum isoliert. In der *ruffled border* befinden sich sowohl hier vakuoläre H^+ -ATPase als auch der Chloridtransporter CIC-7. Die in die Resorptionslakune sezernierten Protonen und Chloridionen werden durch das Zusammenwirken der Carboanhydrase II und eines Anionenaustauschers bereitgestellt (grau). (Modifiziert nach [STENBECK 2002]).

Abbauprodukte werden durch Transzytose zum gegenüberliegenden Zellpol des Osteoklasten transportiert und dort freigesetzt [SALO et al. 1997]. Die Sekretion und Resorption läuft in unterschiedlichen Bereichen der *ruffled border* ab [MULARI et al. 2003]. Zur Erzeugung der für die Ansäuerung der Lakune benötigten Protonen wandelt eine cytoplasmatische Carboanhydrase CO_2 und H_2O in H^+ und HCO_3^- um. Das anfallende HCO_3^- wird durch einen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher aus der Zelle entfernt und durch Cl^- ersetzt (Übersicht in [VAANANEN et al. 2000]).

1.3.2 Genetische Ursachen der Osteopetrose

Eine unzureichende Osteoklastenaktivität führt zu einer Anhäufung von Knochenmaterial und verhindert den Umbau zu mechanisch stabilem Knochen. Die resultierende Sprödigkeit bei gleichzeitig erhöhter Dichte der Knochen führte zu der Bezeichnung Marmor-knochenkrankheit bzw. Osteopetrose. Der Phänotyp kann durch Fehler während der Osteoklastendifferenzierung oder durch das Vorhandensein funktionsunfähiger Osteoklasten hervorgerufen werden. Die Analyse spontaner oder gentechnisch erzeugter osteopetrotischer Mausmutanten hat viel zum Verständnis der Funktionsweise des Osteoklasten beigetragen [TEITELBAUM und ROSS 2003], und mittlerweile konnten sieben genetische Ursachen für die erbliche humane Osteopetrose aufgeklärt werden. Drei dieser Gene sind

an der Säuresekretion des Osteoklasten beteiligt.

Mutationen in der Carboanhydrase Typ II, die sowohl in den Schaltzellen der Niere als auch in Osteoklasten vorkommt, führen zu autosomal rezessiver Osteopetrose (ARO) mit renaler tubulärer Azidose, die einen eher milden Verlauf aufweist [SLY et al. 1983]. Die rezessiv vererbte infantile maligne Osteopetrose ist dagegen eine schwere Erkrankung, die in den ersten Lebenswochen beginnt und ohne Therapie innerhalb von zwei bis zehn Jahren zum Tode führt [GERRITSEN et al. 1994b]. Die betroffenen Kinder leiden unter Anämie, Leber- und Milzvergrößerung, häufigen Knochenbrüchen, Taub- und Blindheit [WILSON und VELLODI 2000] sowie häufiger Abwehrschwäche [REEVES et al. 1979]. Die einzige wirksame Therapie besteht in frühzeitiger Knochenmarktransplantation.

Mutationen in *TCIRG1*, dem Gen für die $\alpha 3$ -Untereinheit der vakuolären H^+ -ATPase, konnten in unabhängigen Fällen als häufigste genetische Ursache der infantilen malignen Osteopetrose identifiziert werden [FRATTINI et al. 2000, KORNAK et al. 2000, MICHIGAMI et al. 2002, SCIMECA et al. 2003]. Die H^+ -ATPase ist ein großer Enzymkomplex aus mindestens 13 Untereinheiten, von denen bis jetzt zehn mehrere Isoformen aufweisen [NISHI und FORGAC 2002]. Diese Isoformen sind teilweise gewebsspezifisch und modulieren möglicherweise die Eigenschaften des Enzyms den örtlichen physiologischen Anforderungen entsprechend. Vier Isoformen sind von der α -Untereinheit der ATPase bekannt, wobei Isoform $\alpha 3$, zunächst OC116 oder Atp6i genannt, besonders stark in Osteoklasten exprimiert wird [LI et al. 1996, TOYOMURA et al. 2000]. Der Verlust der $\alpha 3$ -Untereinheit in einem transgenen Mausmodell ebenso wie in der spontanen Mausmutante *osteosclerotic (oc)* führt zu einer lethalen Osteopetrose. $\alpha 3$ -defiziente Mäuse sterben in einem Alter von maximal fünf Wochen. Sowohl die Osteoklastendifferenzierung als auch die Adhäsion an Knochen ist normal, während die Bildung der Resorptionslakune und die damit verbundene Knochenresorption unterbleibt [LI et al. 1999, SCIMECA et al. 2000].

Die autosomal-dominante Osteopetrose (ADO) ist beim Menschen die am häufigsten vorkommende Form der Osteopetrose. An autosomal-dominanter Osteopetrose-Typ II (ADOII, Albers-Schönberg Krankheit) erkrankte Patienten zeigen oft einen langsameren Krankheitsverlauf und sind üblicherweise nicht blind. Mutationen im *CIC-7*-Gen (*CLCN7*) konnten als Ursache von ADO II ausgemacht werden, können aber auch den übrigen Formen der Osteopetrose zugrunde liegen [WAGUESPACK et al. 2003, FRATTINI et al. 2003, CAMPOS-XAVIER et al. 2003, LETIZIA et al. 2004]. Aufgrund der Dimerstruktur von *CIC-7* wird in Patienten mit heterozygot dominant-negativen Mu-

tationen eine CIC-7-Restaktivität von mindestens 25% erwartet [CLEIREN et al. 2001, FRATTINI et al. 2003], was den milderen Krankheitsverlauf erklären kann.

1.4 Die *grey-lethal* Maus

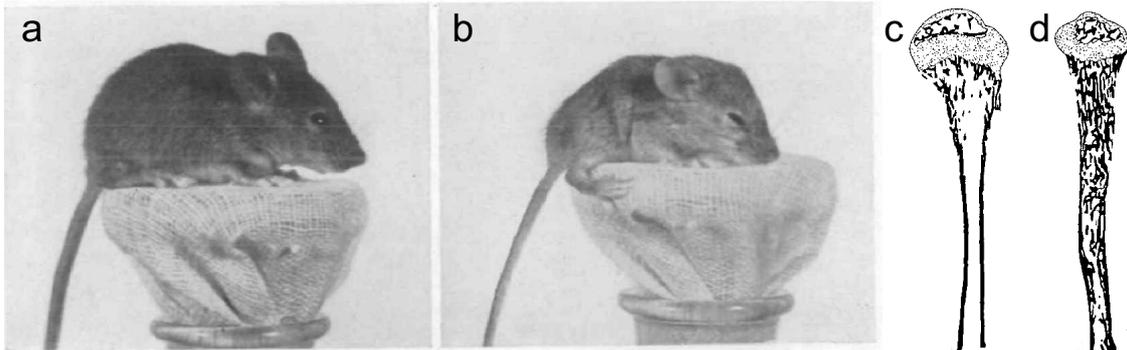


Abbildung 1.7: Phänotyp der *grey-lethal* Maus. Photographie einer 25 Tage alten Wildtyp- (a) und *grey-lethal* Maus (b). Zeichnung eines Längsschnitts durch die Tibia einer Wildtyp (c) und *grey-lethal* Maus (d). Knochen ist schwarz, Knorpel punktiert dargestellt [GRUNEBERG 1936].

Neben den bereits erwähnten Defekten in CIC-7, der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase und der Carboanhydrase Typ II war mit der *grey-lethal* Maus eine weitere genetische Ursache für schwere maligne, autosomal-rezessive Osteopetrose bekannt [GRUNEBERG 1935].

Die von der spontanen Mausmutante *grey-lethal* (*gl*) [GRUNEBERG 1935, GRUNEBERG 1936] gezeigte Form der Osteopetrose spiegelt die humane maligne autosomale Form sehr gut wieder und ist dem von Mutationen in *CLCN7* oder der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase hervorgerufenen Phänotyp vergleichbar. Homozygote *grey-lethal* Mäuse (*gl*) erreichen ein Alter von drei bis vier Wochen. Durch eine Knochenmarktransplantation kann eine normale Knochendichte wiederhergestellt werden [WALKER 1975]. In *gl*-Mäusen sind Osteoklasten vorhanden, aber nicht funktionell. Die *grey-lethal* Mutation führt zu einer Umorganisation des Zytoskeletts und einer gestörten Bildung der *ruffled border* [RAJAPUROHITAM et al. 2001], was auf eine Beteiligung an Prozessen zur Bildung der *ruffled border* oder an Endozytose-/Exozytoseprozessen hindeutet. Weitere an der Osteoklastendifferenzierung und -funktion beteiligte Proteine wie Src, TRAF-6, H^+ -ATPase und Cathepsin-K sind in *gl*-Osteoklasten normal exprimiert. Dies zeigt, dass der *gl*-Phänotyp nicht auf einen Expressionsdefekt dieser Proteine zurückzuführen ist und *grey-lethal* kein *upstream*-Regulator dieser Gene

[RAJAPUROHITAM et al. 2001].

Dem Labor von Jean Vacher gelang es 2003 den *gl*-Lokus mittels Positionsklonierung zu isolieren. Das Gen ist breit exprimiert und kodiert laut bioinformatischer Vorhersage für ein 338 Aminosäuren langes Typ-I-Transmembranprotein. Eine bei einem Osteopetrosepatienten identifizierte Mutation betrifft die Donorspleißstelle von Intron V. Das Fehlspleißen führt zu einem vorzeitigen Translationsabbruch vor der putativen Transmembrandomäne. Für die Mutation in der *grey-lethal* Maus ist die Deletion eines 7,5 kB langen Abschnitts, der die Promotorregion sowie Exon 1 einschließt, verantwortlich [CHALHOUB et al. 2003].

Über datenbankgestützte Untersuchungen konnten Orthologe in mehreren Vertebraten, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* [ABRAHAMS et al. 2002] sowie *Anopheles gambiae* identifiziert werden. Es scheint sich bei *grey-lethal* nicht um einen Vertreter einer Genfamilie zu handeln, da bisher keine Homologe gefunden werden konnten.

In dem Labor von Marylin Farquhar wurde *grey-lethal* unabhängig aus *rattus norvegicus* kloniert und als GAIP-interacting protein N terminus (GIPN) beschrieben [FISCHER et al. 2003]. GIPN wurde als Typ-II-Transmembranprotein mit einer E3 Ubiquitinligaseaktivität charakterisiert.

Im Folgenden werden Mäuse, die homozygot für den *grey-lethal* Locus sind, als *grey-lethal* (*gl*) bezeichnet. Diese Mäuse sind defizient für das von *grey-lethal* kodierte Protein Osteopetrose-assoziiertes Transmembranprotein 1 (*Ostm1*).

2 Fragestellung

Sowohl CIC-7-Knockout als auch *gl*-Mäuse weisen eine schwere Osteopetrose auf und sterben im Alter von wenigen Wochen. Beide Mausmutanten weisen zudem im Gegensatz zu braunen Wildtypmäusen eine graue Fellfärbung auf. Ausgehend von dieser Ähnlichkeit der Phänotypen beider Mausmutanten sollte das Zusammenspiel der Proteine CIC-7 und *Ostm1* untersucht werden. Zunächst sollte das bisher kaum beschriebene Protein *Ostm1* biochemisch näher charakterisiert werden. Im weiteren lag der Schwerpunkt der Analyse auf einem Vergleich der beiden Phänotypen und der Untersuchung einer potentiellen physikalischen Interaktion beider Proteine. Zum Abschluss sollte der Versuch unternommen werden die zelluläre Funktion der Proteine oder des Komplexes näher zu beschreiben. Durch die Arbeit sollten Erklärungsansätze für die molekularen Ursachen der durch Mutationen in *OSTM1* verursachte Osteopetrose gefunden werden, sowie weitere Informationen über die Funktionsweise und Regulation von CIC-7 gewonnen werden.