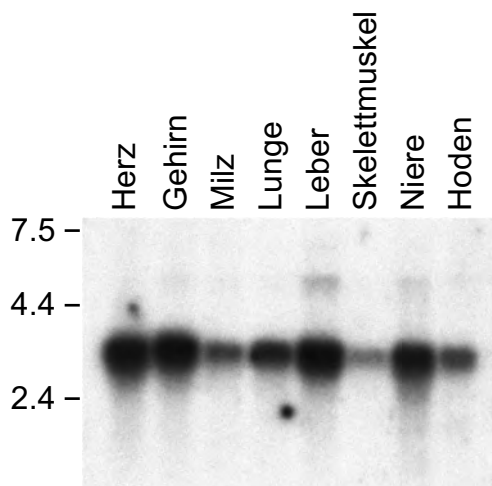


## 3 Ergebnisse

Chalhoub und Kollegen konnten zeigen, dass eine spontane Mutation im *grey-lethal* (*gl*) Gen verantwortlich für den osteopetrotischen Phänotyp der *grey-lethal* Maus ist [CHALHOUB et al. 2003]. Das von *grey-lethal* kodierte Protein Ostm1 (Osteopetrose-assoziiertes Transmembranprotein 1) wurde als Typ-I-Transmembranprotein mit einer Lokalisation auf intrazellulären Membranen beschrieben. Zunächst soll im folgenden das Protein Ostm1 näher charakterisiert werden, bevor im Anschluss das Zusammenspiel von CIC-7 und Ostm1 sowie der Phänotyp der *grey-lethal* Maus näher untersucht wird.

### 3.1 Charakterisierung des Proteins Ostm1

#### 3.1.1 Gewebsverteilung von Ostm1



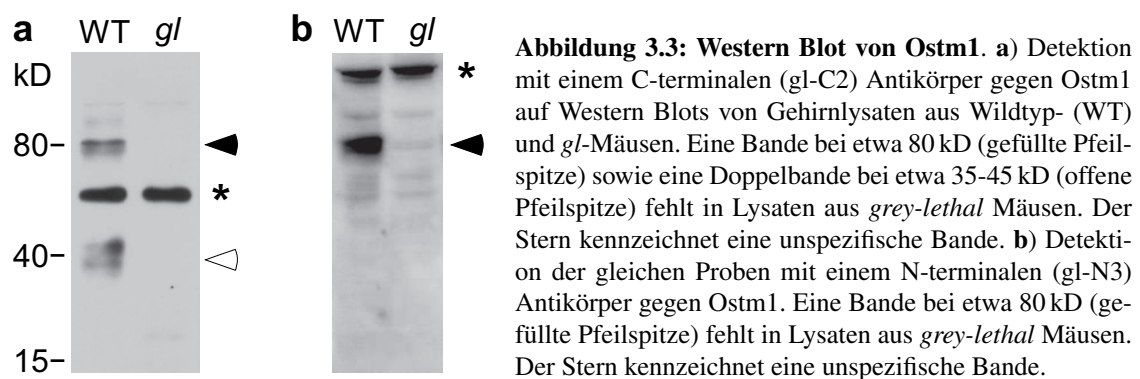
**Abbildung 3.1: Ostm1 ist ubiquitär exprimiert.** Northern-Blot Analyse mit einer 1kb cDNA Sonde gegen Ostm1 auf einem MTN™ Multiple Tissue Northern-Blot von Clontech. Das etwa 3kB große Transkript konnte in allen getesteten Geweben mit unterschiedlich starker Expression nachgewiesen werden

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, in welchen Geweben Ostm1 exprimiert ist. Bisher war eine Expression von Ostm1 in mehreren Geweben nachgewiesen worden [CHALHOUB et al. 2003, FISCHER et al. 2003]. Der von Lena Wartosch (AG



Für die Lokalisation der Expression von Ostm1 in Zellen und Geweben, wie auch für biochemische Untersuchung von Proteinlysaten wurden polyklonale Antiseren generiert (Abb. 3.2).

Antikörper, die gegen Epitope im C-Terminus von Ostm1 gerichtet sind (gl-C1, gl-C2, gl-C3) erkannten drei spezifische Banden in Western Blot-Untersuchungen von Gewebs- und Zellysaten. Neben einer Bande bei etwa 80 kD (große Form) wurde eine Doppelbande bei 35-45 kD (kleine Form) erkannt, die in Lysaten aus *gl*-Zellen und -Geweben fehlten (Abb. 3.3 a). Eine oft dominante Bande bei etwa 55 kD wurde hingegen in WT- sowie *gl*-Proben erkannt und war damit als unspezifisch anzusehen.



Antikörper, die gegen Epitope im N-Terminus von Ostm1 gerichtet sind (gl-N3), erkannten eine spezifische Bande bei etwa 80 kD sowie eine unspezifische Bande bei etwa 100 kD (Abb. 3.3 b). Aufgrund der schwachen Detektion mit N-terminalen Antikörpern konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass die mit C-terminalen Antikörpern nachgewiesene Doppelbande bei 35-45 kD mit N-terminalen Antikörpern nicht nachzuweisen ist.

Das *gl*-Transkript, sowie die für transiente Transfektion von Zellen verwendete *gl*-cDNA, kodieren für ein 338 Aminosäuren langes Protein mit einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 37 kD. Die kleinen (35-45 kD) im Western Blot beobachteten Form könnte möglicherweise dem unmodifizierten Translationsprodukt entsprechen. Für die große Form konnte eine alternative Spliceform ausgeschlossen werden, da sie auch nach Expression der für 338 Aminosäuren kodierenden cDNA nachgewiesen werden konnte. Mögliche Prozesse, die zu dem Auftreten einer großen und einer kleinen Form von Ostm1 führen können, sind beispielsweise Dimerisierung, Glycosylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder proteolytische Spaltung. Im folgenden sollte die Natur der beiden Formen näher untersucht werden.

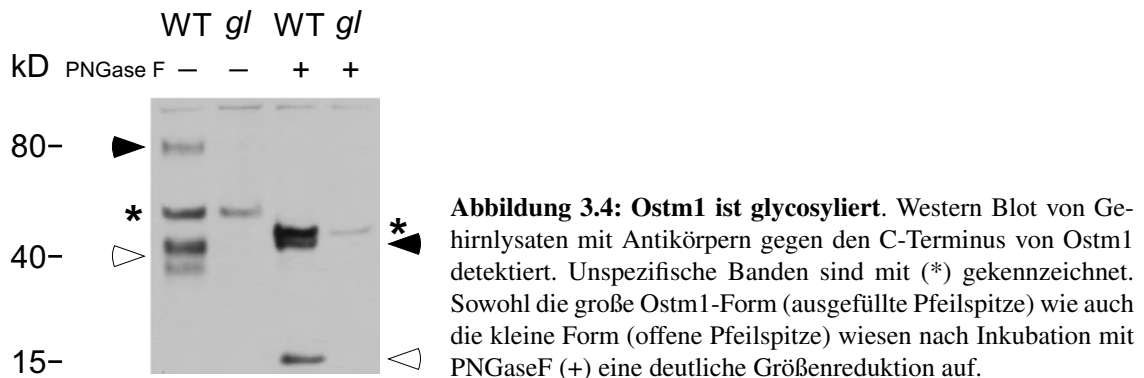
### 3.1.3 Aufklärung der Topologie von Ostm1

Basierend auf einer *in silico*-Vorhersage wurde postuliert, dass es sich bei Ostm1 um ein Typ-1-Transmembranprotein mit spaltbarem Signalpeptid, luminalem N-Terminus, einer Transmembrandomäne und zytoplasmatischem C-Terminus handelt [CHALHOUB et al. 2003] (siehe Abbildung 3.2 für eine Übersicht der im Folgenden besprochenen Strukturelemente von Ostm1). Kurze Zeit später wurde Ostm1 jedoch in einer unabhängigen Arbeit unter dem Namen GIPN aus Ratte kloniert und eine E3-Ubiquitinligaseaktivität zugeschrieben. Gleichzeitig wurde eine Typ-2-Transmembrankonfiguration postuliert [FISCHER et al. 2003]. Für die Ligaseaktivität ist eine zytoplasmatische Lokalisation der RING-Finger Domäne zwingende Voraussetzung, die jedoch nicht mit der von Chalhoub postulierten Topologie in Einklang zu bringen ist. Um die Topologie von Ostm1 aufzuklären wurde zunächst die *in silico*-Vorhersage überprüft und der Glycosylierungszustand sowie die Sezernierung von artifiziellen Proteinfragmenten untersucht.

Mit Hilfe des Kyte-Doolittle-Algorithmus [KYTE und DOOLITTLE 1982] lässt sich die Hydrophobizität der primären Aminosäuresequenz vorhersagen. Eine solche Vorhersage, wie sie sowohl von Fischer et al. als auch von Chalhoub et al. für Ostm1 durchgeführt wurde, zeigte zwei hydrophobe Abschnitte. Der erste liegt unmittelbar am N-Terminus, der zweite 30 Aminosäuren vor dem C-Terminus. Die ersten 34 Aminosäuren wiesen neben der recht hohen Hydrophobizität eine mögliche Spaltstelle sowie sehr niedrige Sequenzidentität zwischen Maus und Ratte auf, was auf ein spaltbares Signalpeptid hindeuten kann. Für den zweiten hydrophoben Abschnitt ergab sich nach Kyte-Doolittle eine hohe Wahrscheinlichkeit als Transmembrandomäne. Eine verlässliche Aussage über die zu erwartende Transmembrantopologie ist auf Basis von *in silico*-Untersuchungen nicht möglich.

Über den Eucaryotic Linear Motif (ELM) Server ([elm.eu.org](http://elm.eu.org) [PUNTERVOLL et al. 2003]) zur motivbasierten Vorhersage von funktionellen Sequenzbereichen in Proteinen konnten 10 zwischen Maus und Mensch konservierte möglichen N-Glycosylierungsstellen mit dem Konsensusmotiv NX[ST] (wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann) im Bereich vor dem zweiten hydrophoben Abschnitt vorhergesagt werden (siehe Abb. 3.2). Die letzten drei Aminosäuren der Maus-Sequenz entsprechen dem Consensus einer N-Glycosylierungsstelle. Eine Glycosylierung an dieser Stelle kann jedoch ausgeschlossen werden, da eine Glycosylierungsstelle mindestens 60 Aminosäuren vor dem C-Terminus liegen muss.

N-gekoppelte Glycosylierung erfolgt nur im Lumen des Endoplasmatischen-Retikulum (ER). Der Nachweis einer N-Glycosylierung von Ostm1 würde daher Rückschlüsse auf die Topologie zulassen. Experimentell kann dies durch Deglycosylierung und die damit verbundene Größenreduzierung nachgewiesen werden. Eine deutliche Reduktion der Größe von Ostm1 würde hierbei darauf hindeuten, dass der Bereich vor dem zweiten hydrophoben Abschnitt im Lumen und der Carboxyterminus im Cytoplasma liegt. Das Enzym Peptid N-Glycosidase F (PNGase-F) spaltet spezifisch N-glycosylierte Zucker vom Aminosäurerückgrat der Proteine [ELDER und ALEXANDER 1982, ALEXANDER und ELDER 1989]. Mit Hilfe dieses Enzyms ist der Glycosylierungszustand von Proteinen *in vitro* nachweisbar.



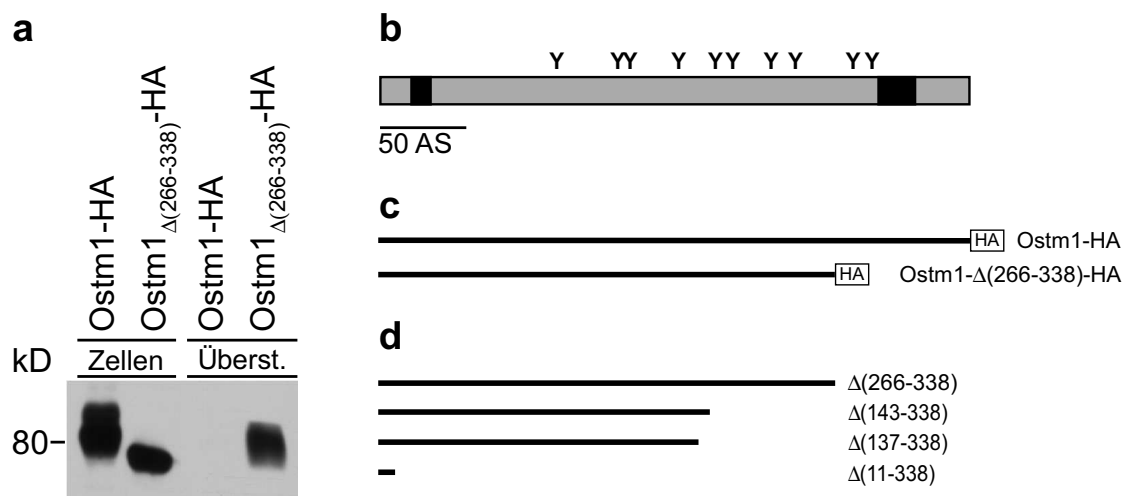
Gehirnlysate von WT- und *gl*-Mäusen wurden mit oder ohne PNGaseF unter denaturierenden Bedingungen bei 37 °C inkubiert und mittels Western Blot und Immundetektion analysiert.

Wie in Abbildung 3.4 gezeigt führte die Inkubation mit PNGaseF zu einer Reduktion des scheinbaren Molekulargewichts der großen Form von Ostm1 von etwa 80 kD auf 50 kD (ausgefüllte Pfeilspitze) und der kleinen Doppelbande von 35-45 kD auf eine Einzelbande bei etwa 15 kD (offene Pfeilspitze).

Je nach Oligomerisierungsgrad weisen Zuckerseitenketten eine Größe von ca. 2-3 kD auf. Der Gewichtsverlust der großen Form um etwa 30 kD lässt darauf schließen, dass die meisten oder alle der 10 putativen Glycosylierungsstellen *in vivo* genutzt werden.

Um auf eine Abspaltung des putativen Signalpeptides *in vivo* zu testen, wurden von Jens Fuhrmann (AG Jentsch) HEK293 Zellen mit DNA transfiziert, die für Ostm1 und ein vor dem putativen Signalpeptid liegendes HA-Epitop kodiert. In Western Blot-Untersuchungen auf Lysaten solcher Zellen konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von Ostm1 detektiert werden konnte, während das HA-Epitop nicht detektierbar war (Da-

ten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.5: Der N-Terminus von Ostm1 ist luminal orientiert.** a) Western Blot mit einem HA-Antikörper von Zelllysaten (Spur 1 und 2) und Zellkulturüberständen (Spuren 3 und 4) von HEK293 Zellen, die Ostm1 (Spuren 1 + 3) oder eine trunkierte Form von Ostm1 (Spuren 2 + 4) mit C-terminalem HA-Epitop exprimierten. Beide Proteine sind in Zelllysaten nachweisbar. In Zellkulturüberständen ist nur die trunkierte Form, nicht aber Wildtyp-Ostm1 detektierbar. Schwarze Box, hydrophober Sequenzabschnitt; Y, Konsensussequenz für N-gekoppelte Glycosylierung. b) Schematische Darstellung von Ostm1. c) Schematische Darstellung der exprimierten Proteine. Die schwarzen Balken kennzeichnen den von den beiden exprimierten DNAs abgedeckten Sequenzbereich von Ostm1. Ostm1-HA codiert für die gesamte Länge mit C-Terminalem HA-Epitop. Ostm1- $\Delta(266-339)$ -HA codiert für eine verkürzte Form, der der zweite hydrophobe Sequenzabschnitt sowie der C-Terminus fehlt. d) Darstellung der vorhergesagten Translationsprodukte von bekannten humanen *gl*-Mutationen die sämtlich zu einer Trunkation vor dem zweiten hydrophoben abschnitt führen [CHALHOUB et al. 2003, RAMÍREZ et al. 2004, PANGRAZIO et al. 2006].

Proteine, die ein Signalpeptid tragen werden am rauen ER synthetisiert und kotranslational durch die ER-Membran in das Lumen eingeführt. Fehlen hydrophobe Bereiche, welche für eine Verankerung in der Membran sorgen, oder Sequenzmotive, die eine gezielte Sortierung in subzelluläre Kompartimente vermitteln, enden solche Proteine im extrazellulären Raum.

Im folgenden wurde dies ausgenutzt, um zu untersuchen, ob Ostm1 ein Signalpeptid besitzt und ob der Aminoterminus nach der luminalen oder zytoplasmatischen Seite orientiert ist. Hierzu wurde eine DNA für eine Mutante generiert, bei der der zweite hydrophobe Abschnitt, sowie der C-Terminus durch ein HA-Epitop ersetzt wurde (Abb. 3.5 c). DNA für Ostm1 oder die Mutante wurde in HEK293 Zellen transfiziert. Zelllysate sowie Zellkulturüberstände wurden per Western Blot untersucht (Abb. 3.5 a). In Zelllysaten waren beide Formen detektierbar. Die Mutante ohne hydrophoben Abschnitt, nicht aber die

Wildtyp Form, konnte im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass der C-terminale, nicht aber der N-terminale hydrophobe Abschnitt eine Transmembrandomäne darstellt. Der gesamte aminoternale Bereich, der vor dem hier als Transmembrandomäne identifizierten zweiten hydrophoben Abschnitt liegt (hier kurz als N-Terminus benannt) ist demnach dem Lumen zugewandt.

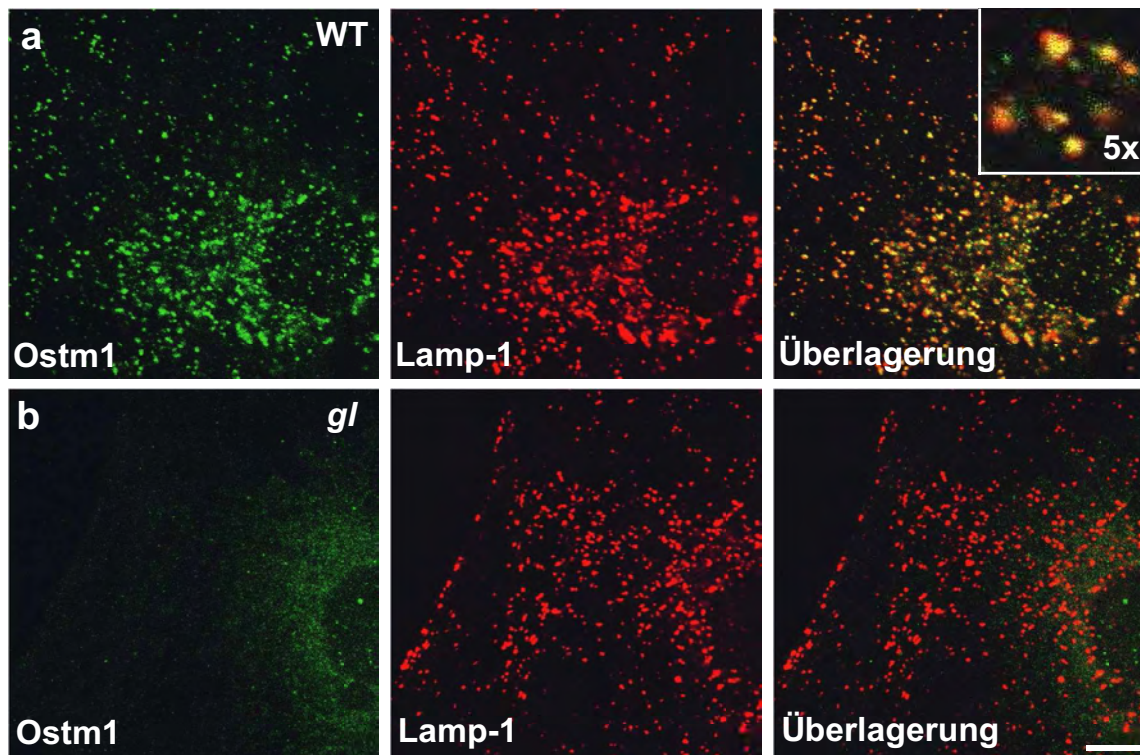
Die generierte Mutante führt zu einem ähnlichen Translationsprodukt, wie es nach einer beim Menschen zu Osteopetrose führenden Mutation zu erwarten ist [CHALHOUB et al. 2003]. Neben dem hier nachgebildeten verfrühten Translationsstop bei Aminosäure 265 wurden beim Menschen weitere Mutationen in *OSTM1* beschrieben, die zu verfrühtem Translationsstop führen (siehe Abb. 3.5 d) [CHALHOUB et al. 2003, RAMÍREZ et al. 2004, PANGRAZIO et al. 2006]. Die hier gezeigte Sekretion von *Ostm1* mit fehlender Transmembrandomäne legt nahe, dass es auch in diesen Patienten zu einer Sekretion des mutierten Proteins und somit zu einem vollständigen Funktionsverlust kommt.

Zusammengenommen konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass es sich bei dem ersten hydrophoben Abschnitt um ein spaltbares Signalpeptid, bei dem zweiten hingegen um eine Transmembrandomäne handelt und der hoch glycosylierte Aminoternus dem Lumen zugewandt ist. Bei *Ostm1* handelt es sich somit um ein Typ-I-Transmembranprotein.

#### 3.1.4 Subzelluläre Lokalisierung von *Ostm1*

Die Lokalisation in der Zelle kann einen ersten Hinweis auf die Funktion eines Proteins geben. Zudem ist für ein direktes Zusammenspiel von *Ostm1* und *CIC-7* zumindest eine räumlich und zeitlich zum Teil überlappende Lokalisation Voraussetzung. Die subzelluläre Lokalisation von *Ostm1* war bisher von Chalhoub und Kollegen nur grob als intrazellulär beschrieben worden [CHALHOUB et al. 2003]. Fischer und Kollegen beschrieben eine Lokalisation im Bereich der Plasmamembran von HEK293 Zellen sowie basaler Lokalisation in Nierentubuli [FISCHER et al. 2003]. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde daher unter Zuhilfenahme der generierten Antikörper die Verteilung von *Ostm1* in der Zelle untersucht. Hierbei wurde die Spezifität durch Immunfärbung auf *Ostm1*-defizienten Zellen aus *gl*-Mäusen kontrolliert.

Immunfärbung von Fibroblasten mit Antikörpern gegen den C-Terminus von *Ostm1* (grün) zeigte ein punktförmiges Muster auf, das an eine vesikuläre Verteilung erinnerte. Kofärbung mit Lamp1 (rot), einem etablierten Marker für späte Endosomen und Lyso-



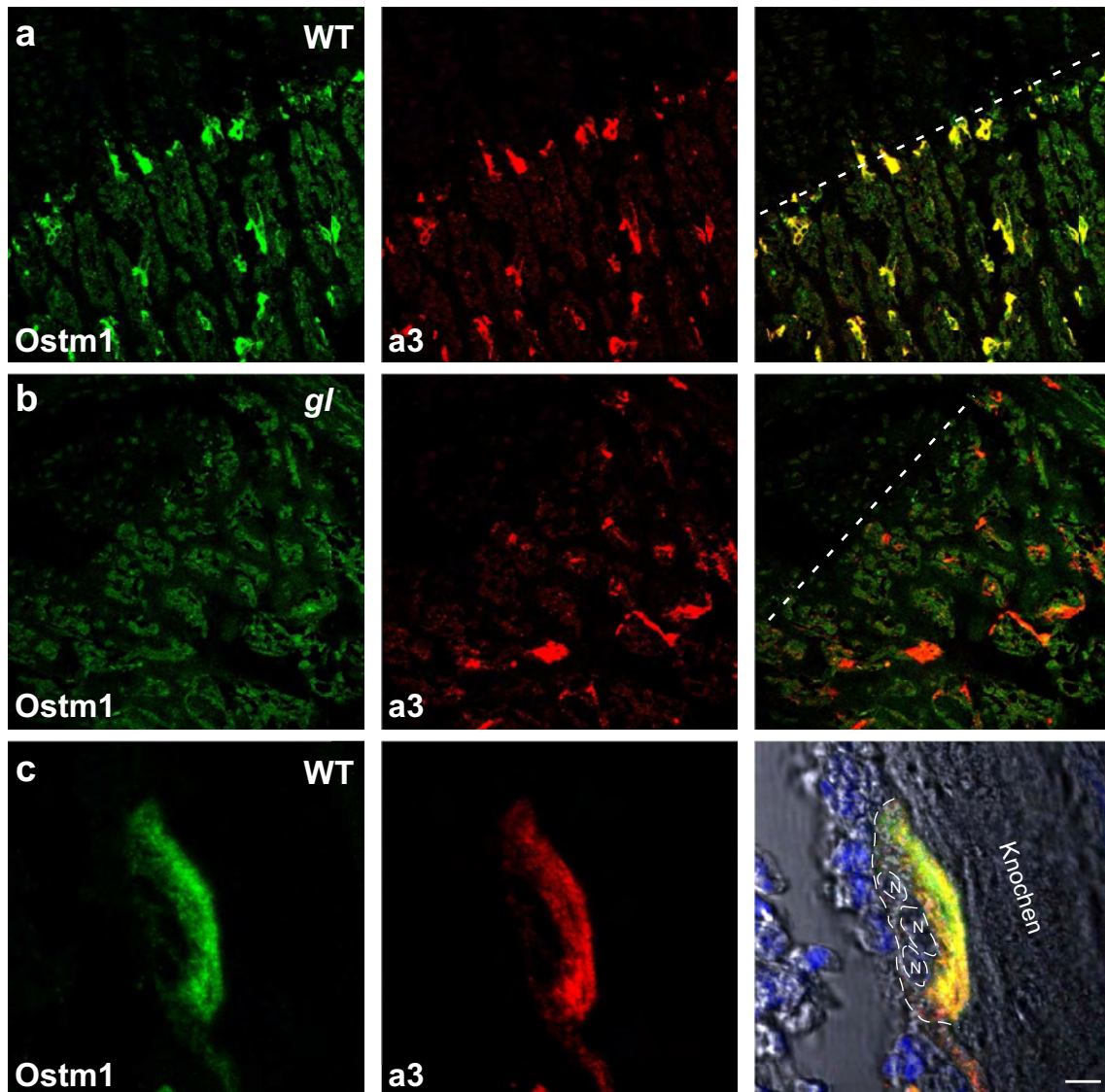
**Abbildung 3.6: Ostm1 is lysosomal lokalisiert.** Fibroblasten von Wildtyp- (a) und *gl*-Mäusen (b) mit Antikörpern gegen den C-Terminus von Ostm1 (*gl*-C2, grün) und Lamp1 (rot) gefärbt. In der rechten Spalte ist eine Überlagerung beider Färbungen dargestellt. Der Ausschnitt zeigt eine stärkere Vergrößerung. Maßstab: 8,5  $\mu\text{m}$  , Ausschnitt 1,7  $\mu\text{m}$  .

somen ergab eine nahezu vollständige Überlagerung (gelb) (Abb. 3.6 a). Das Fehlen der punktierten Färbung von Ostm1 in *gl*-Fibroblasten belegte, dass es sich um ein Ostm1-spezifisches Signal handelte (Abb. 3.6 b).

*Grey-lethal* Mäuse leiden an einer schweren Osteopetrose. In den für die Knochenresorption verantwortlichen Osteoklasten findet man spät endosomale/lysosomale Proteine wie die  $\text{H}^+$ -ATPase und CIC-7 zusätzlich in der sogenannten *ruffled border*, einer spezialisierten, säuresezernierenden Membran, lokalisiert. Um zu überprüfen, ob auch Ostm1 in dieser dem Knochen zugewandten Membran vorkommt, wurden Paraffinschnitte von zuvor dekalzifizierten Knochen mit Antikörpern gegen den C-Terminus von Ostm1 und die  $\alpha 3$ -Untereinheit der  $\text{H}^+$ -ATPase inkubiert und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

Für Ostm1 zeigte sich ein starkes Signal in Zellen entlang der Trabekel der primären und sekundären Spongiosa (Abb. 3.7 a). Dieses Signal war spezifisch, da es in Knochen von *grey-lethal* Mäusen nicht detektierbar war (Abb. 3.7 b). Die Gegenfärbung mit Antikörpern gegen die  $\alpha 3$ -Untereinheit der  $\text{H}^+$ -ATPase zeigte eine Lokalisation in den gleichen





**Abbildung 3.7: *Ostm1* ist in der ruffled border von Osteoklasten exprimiert.** Immunhistochemische Färbung auf Paraffinschnitten von dekalzifizierten Knochen. **a,b)** Abgebildet ist ein Ausschnitt der Epiphysenfuge einer Tibia. Links oben befindet sich der Blasenknorpel der Epiphyse. Färbung mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von *Ostm1* (*gl*-C2, grün) zeigt Expression in Zellen entlang der Trabekel in der primären Spongiosa, die mit der Lokalisation der in Osteoklasten exprimierten  $\alpha 3$ -Untereinheit der  $H^+$ -ATPase (rot) übereinstimmt (**a**). In *gl*-Knochen (**b**) fehlt das Signal von *Ostm1*, nicht jedoch der  $\alpha 3$ -Untereinheit. **c)** Eine stärkere Vergrößerung zeigt, dass *Ostm1* (grün) und die  $\alpha 3$ -Untereinheit der  $H^+$ -ATPase (rot) in multinukleären Zellen in einer dem Knochen zugewandten Region kolokalisieren. Kerne (N) und RNA erscheinen durch TOTO blau eingefärbt. Der Maßstab entspricht 30  $\mu m$  in **a,b** beziehungsweise 4,5  $\mu m$  in **c**.

Zellen. In einer stärkeren Vergrößerung zeigte sich, dass Ostm1 in multinukleären Zellen in einer dem Knochen zugewandten Region lokalisierte (Abb. 3.7 c). In dieser Region konnte eine deutliche Kolokalisation mit der  $\alpha 3$ -Untereinheit der  $H^+$ -ATPase beobachtet werden (Abb. 3.7 c), wodurch sie als *ruffled border* von Osteoklasten identifiziert werden konnte.

Ostm1 konnte somit spezifisch in Lysosomen, in denen es mit Lamp1 kolokalisierte, sowie der *ruffled border* von Osteoklasten, in der es mit der  $\alpha 3$ -Untereinheit der  $H^+$ -ATPase kolokalisierte, nachgewiesen werden.

#### **3.1.5 CIC-7 ist essentiell für die lysosomale Lokalisation von Ostm1**

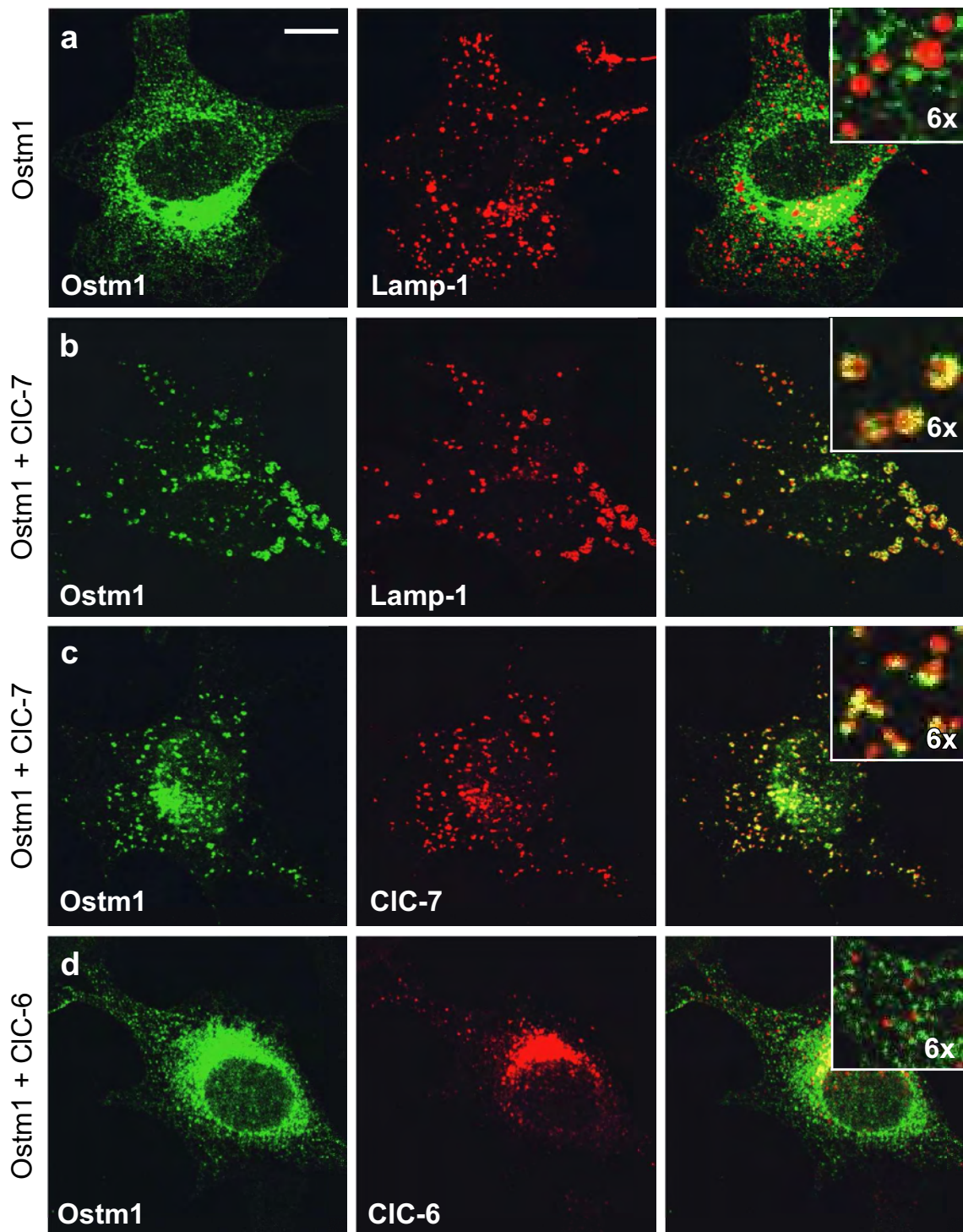
CIC-7 und Ostm1 kolokalisieren in Lysosomen. Durch transiente Transfektion von Ostm1 in CIC-7-Knockout Fibroblasten sollte ein etwaiger Einfluss von CIC-7 auf die Lokalisation von Ostm1 untersucht werden. Hierzu wurde Ostm1 entweder alleine oder gemeinsam mit CIC-7 oder anderen CLC-Proteinen in CIC-7-Knockout Fibroblasten transfiziert.

Einzel exprimiertes Ostm1 erschien netzförmig, retikulär verteilt. Es konnte keine deutliche Kolokalisation mit Lamp1 beobachtet werden (Abb. 3.8 a). Nach Koexpression mit CIC-7 konnte die von endogenem Ostm1 bekannte, punktförmige Verteilung von Ostm1 sowie eine weitgehende Kolokalisation mit Lamp-1 (Abb. 3.8 b) und CIC-7 (Abb. 3.8 c, 3.9 a) beobachtet werden. Dieser Effekt war unabhängig vom Zelltyp und konnte sowohl in Fibroblasten (Abb. 3.8) wie auch in Hela-Zellen (Abb. 3.9) gezeigt werden. Er war spezifisch für CIC-7, da nach Kotransfektion mit den CLC-Proteinen CIC-6 (Abb. 3.8 d), CIC-5 (Abb. 3.9 b) oder CIC-3 (Abb. 3.9 c) sowie dem Membranprotein CD4 (Abb. 3.9 d) keine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden konnte. Die Effizienz, mit der CIC-7 die Lokalisation von Ostm1 beeinflusst hing dabei von der Expressionsstärke beider Proteine ab. Im Überexpressionssystem wurde ein optimales Ergebnis erzielt, wenn die Ostm1- und CIC-7-Plasmide in einem Verhältnis von 1:200 bei der Transfektion eingesetzt wurden.

#### **3.1.6 Analyse der Reifung und Prozessierung von Ostm1**

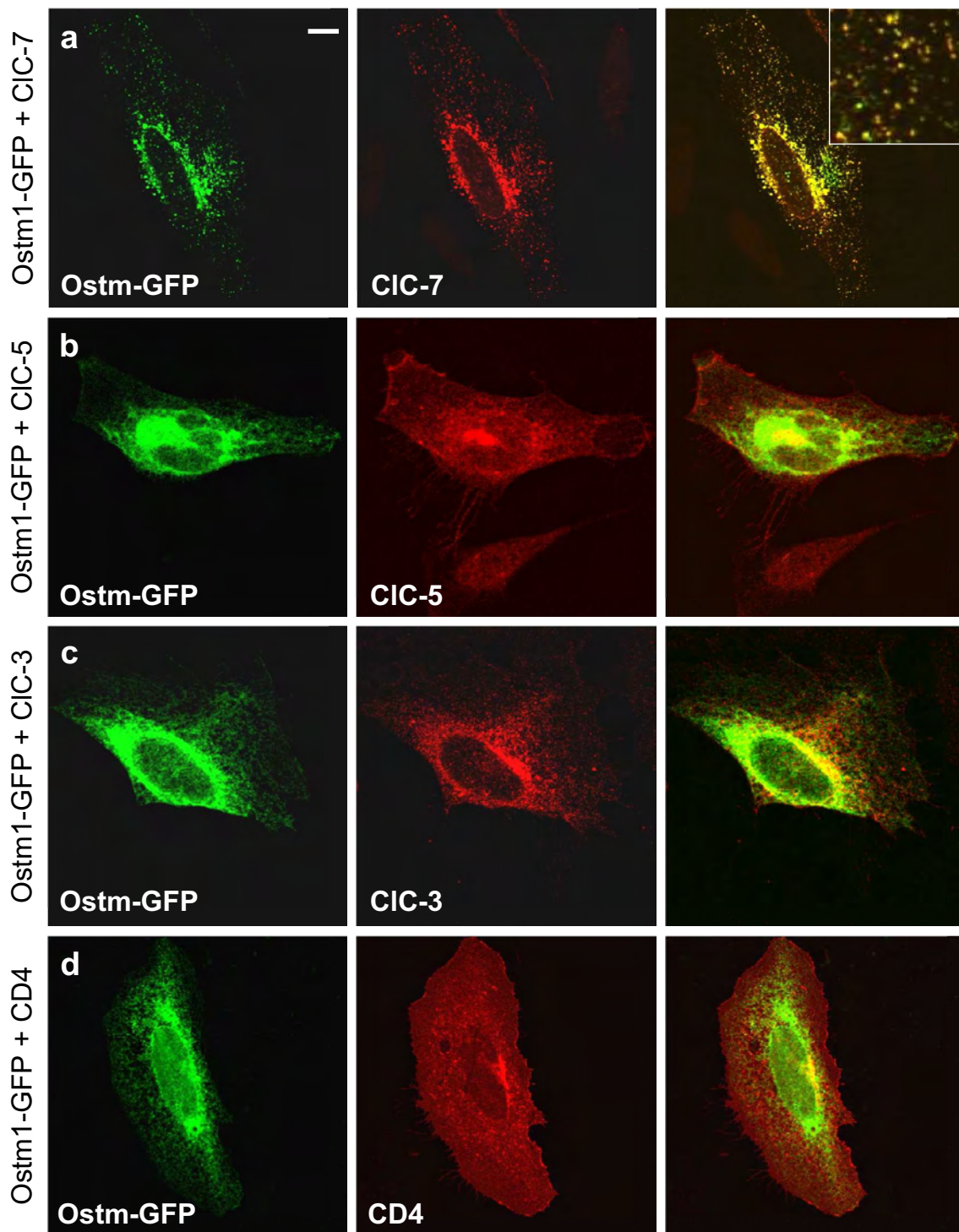
Da CIC-7 die Lokalisation von Ostm1 beeinflusste, wurde Ostm1 im folgenden in *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Mäuse untersucht.

Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von Ostm1 auf

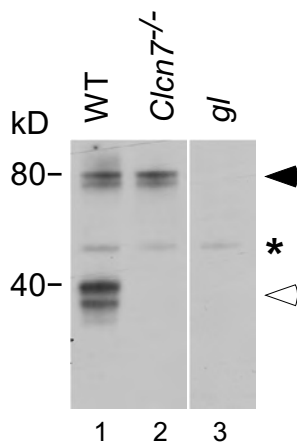


**Abbildung 3.8: Koexpression von CIC-7 führt zu lysosomaler Lokalisation von exprimiertem Ostm1 in Fibroblasten.** Ostm1-transfizierte CIC-7-Knockout Mausefibroblasten wurden mit Antikörpern gegen Ostm1 und Lamp1 beziehungsweise CIC-7 oder CIC-6 gefärbt. **a)** Überexprimiertes Ostm1 zeigt eine retikuläre und perinukleäre Verteilung. **b, c),** Nach Koexpression mit CIC-7 kolokalisiert Ostm1 in vesikulären Strukturen mit Lamp-1 (**b**) und CIC-7 (**c**). **d)** Nach Koexpression von CIC-6 ist kein Effekt auf Ostm1 zu beobachten. Der Maßstab in **a** entspricht 10  $\mu\text{m}$  beziehungsweise 1,7  $\mu\text{m}$  für die Ausschnitte.





**Abbildung 3.9: Koexpression von CIC-7 führt zu lysosomaler Lokalisation von exprimiertem Ostm1-GFP in HeLa-Zellen.** Ein Ostm1-GFP Fusionsprotein sowie CIC-7, -5, -3 oder CD4 exprimierende HeLa-Zellen wurden gegen CIC-7, -5, -3 oder CD4 gefärbt. **a)** Überexprimiertes Ostm1-GFP kolokalisiert mit koexprimiertem CIC-7 in vesikulären Strukturen. **b-d)** Koexpression von CIC-5 (**b**), CIC-3 (**c**) oder CD4 (**d**) hat keinen Einfluss auf die retikuläre Lokalisation von Ostm1 und es kann keine deutliche Kolokalisation der koexprimierten Proteine beobachtet werden. Der Maßstab in **a** entspricht 10  $\mu\text{m}$  beziehungsweise 1,7  $\mu\text{m}$  für den Ausschnitt.



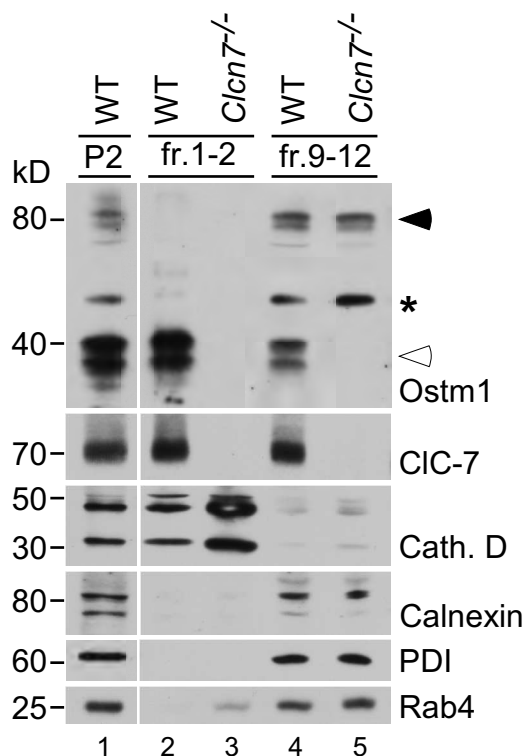
**Abbildung 3.10: Die kleine Ostm1-Form fehlt im CIC-7 Knockout.** Lysate aus Gehirnen von WT, CIC-7-Knockout und *gl*-Mäusen nach Western Blot und Detektion mit einem gl-C2 Antikörper gegen Ostm1. In CIC-7 Knockout-Lysaten (Spur 2) konnte die kleine Form nicht nachgewiesen werden (offene Pfeilspitze). Die große Form (gefüllte Pfeilspitze) erscheint unverändert. \*, unspezifisches Signal.

Lysaten aus Gehirn von WT, *Clcn7<sup>-/-</sup>* und *gl*-Mäusen zeigte einen ausschließlichen Verlust der 35-45kD Doppelbande in CIC-7 Knockout-Mäusen (Abbildung 3.10, Spur 2).

Durch subzelluläre Fraktionierung von Zellorganellen sollte die subzelluläre Verteilung von Ostm1, insbesondere in Bezug auf mögliche Unterschiede der großen und kleinen Form, näher untersucht werden. Die zur Anwendung gekommene Fraktionierung beruht auf einer Auftrennung der Probe nach der Sedimentationsgeschwindigkeit in einem kontinuierlichen Percollgradienten.

Hierbei lassen sich schnell sedimentierende Vesikel (Lysosomen, späte Endosomen) von langsamer sedimentierenden Kompartimenten (ER, frühen Endosomen, Membranbruchstücke, Mitochondrien) trennen. Nach Auftrennung in 12 Fraktionen wurden diese zunächst entsprechend der Verteilung von etablierten Markerproteinen untersucht. Die ER-Proteine Calnexin und Protein-Disulfidisomerase (PDI), ebenso wie das früh-endosomale Rab4, fanden sich in den Fraktionen mit langsam sedimentierenden Vesikeln. Das lysosomale Enzym Cathepsin D wird im Lysosom prozessiert und erlangt erst dadurch seine Aktivität. Die prozessierte Form fand sich ausschließlich in den Fraktionen mit schnell sedimentierenden Vesikeln angereichert. Aufgrund dieser Verteilung von Markerproteinen wurden die Fraktionen 1–2, die schnell sedimentierende Vesikel enthielten, als lysosomal kategorisiert. Die Fraktionen 9–12, die langsam sedimentierende Vesikel enthielten, wurden entsprechend als ER/endosomal bezeichnet (Abb. 3.11).

CIC-7 war etwas stärker in der den lysosomalen Fraktion angereichert, fand sich jedoch auch in den ER/endosomal Fraktionen. Bemerkenswert war nun die differentielle Anreicherung der kleinen und großen Form von Ostm1. Die kleine Form war etwas stärker als CIC-7 in der lysosomalen Fraktion angereichert, jedoch auch in der ER/Endosomenfraktion nachweisbar. In Lysaten aus *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Mäusen war sie wie schon

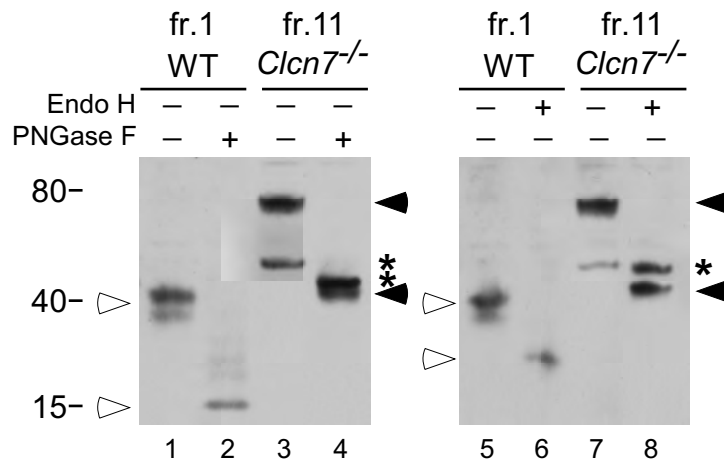


**Abbildung 3.11: Subzelluläre Fraktionierung zeigt Unterschiede in der Lokalisation beider Formen von Ostm1.** Membranfraktionen (P2) aus WT und *Clcn7<sup>-/-</sup>* Gehirnen wurden auf einem Percollgradienten und über Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation aufgetrennt und die vereinigten unteren Fraktionen 1+2 sowie die oberen Fraktionen 9–12 über SDS-Page aufgetrennt. Es folgte Western Blot und Analyse mit Antikörpern wie angegeben. Cath. D, Cathepsin D; PDI, Protein-Disulfidiso­merase. \*, unspezifisches Signal. Spur 1 zeigt das eingesetzte Material vor Auftrennung über den Percollgradienten. Die kleine Form von Ostm1 (offene Pfeilspitze) fehlt wie bereits gezeigt in Proben aus *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Mäusen (Spuren 3,5). Sie erscheint in den Fraktionen 1+2 (Spur 2) von WT Gehirn gegenüber den Fraktionen 9–12 (Spur 4) angereichert. Die große Form (geschlossene Pfeilspitze) fehlt in den Fraktionen 1+2 (Spur 2+3) und ist nur in den Fraktionen 9–12 (Spur 4+5) nachweisbar. CIC-7 ist wie beschrieben in den Fraktionen 1+2 (Spur 2) leicht gegenüber den Fraktionen 9–12 angereichert und fehlt in *Clcn7<sup>-/-</sup>* Proben. Cathepsin D erscheint in den Fraktionen 1+2 von WT und *Clcn7<sup>-/-</sup>* angereichert (Spur 2+3) und ist in den Fraktionen 9–12 praktisch nicht nachweisbar. Calnexin, PDI und Rab4 sind abgesehen von einem schwachen Rab4 Signal in Fraktion 2 nur in den Fraktionen 9–12 (Spur 4+5) nachweisbar.

beschrieben (Abb. 3.10) nicht detektierbar. Die große Form war hingegen ausschließlich in der ER/Endosomenfraktion detektierbar.

Durch die subzelluläre Fraktionierung war es möglich Material zu gewinnen, das entweder nur die kleine (lysosomale Fraktion aus WT-Mäusen) oder nur die große (ER/Endosomenfraktion aus *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Mäusen) Form von Ostm1 enthielt. Diese Proben wurden im folgenden für weitergehende Deglycosylierungsversuche verwendet. Während PNGaseF sämtliche N-gekoppelten Zucker abspaltet, sind nur die hoch-Mannose Formen sensitiv gegenüber einer Spaltung durch Endoglycosidase H (EndoH). Nach Modifikation im Golgi-Apparat sind N-gekoppelte Kohlenhydrate hingegen resistent gegen eine Spaltung durch EndoH.

Wie erwartet reduzierte eine Inkubation mit PNGaseF das scheinbare Molekulargewicht beider Formen (Abb. 3.12). Das scheinbare Molekulargewicht der großen Form wurde sowohl durch Inkubation mit PNGaseF als auch EndoH-Behandlung von 80 kD auf etwa 40 kD reduziert. Die kleine Form wies hingegen nach Inkubation mit PNGaseF eine Reduktion auf etwa 15 kD auf, wohingegen die Inkubation mit EndoH nur zu ei-

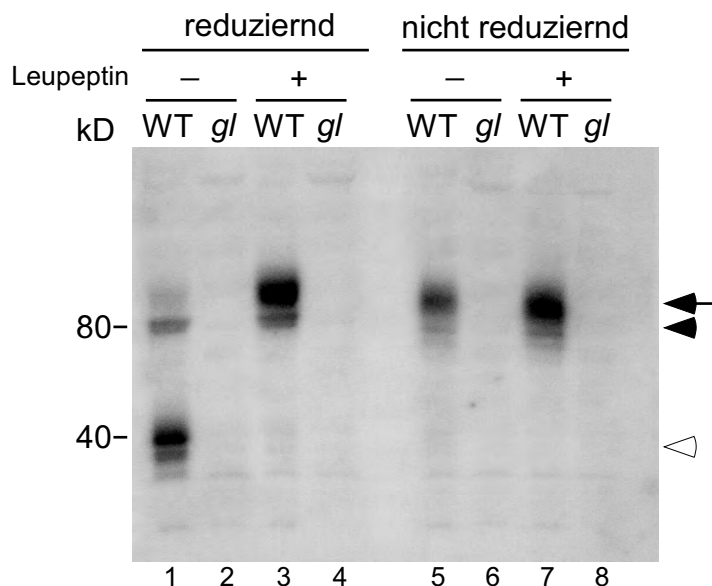


**Abbildung 3.12: Die kleine Ostm1 Form ist teilweise EndoH resistent.** Deglycosylierung von WT lysosomalen und *Clcn7*<sup>-/-</sup> ER/endosomalen Fraktionen mit PNGaseF und EndoH. Inkubation mit PNGaseF reduziert das scheinbare Molekulargewicht der kleinen Form von etwa 40 kD auf 15 kD (Spur 1, 2 offene Pfeilspitze), während Inkubation mit EndoH nur eine Reduktion auf etwa 25 kD zur Folge hat. Das scheinbare Molekulargewicht der großen Form wird sowohl durch PNGaseF (Spur 4), als auch durch EndoH (Spur 8) von 80 kD auf etwa 40 kD reduziert. \*, unspezifisches Signal des verwendeten gl-C2 Antikörpers.

ner Reduktion des scheinbaren Molekulargewichts auf etwa 25 kD führte. Offensichtlich waren alle Kohlenhydratseitenketten der großen Form sensitiv gegenüber einer Spaltung durch EndoH, während einige Seitenketten der kleinen Form eine Resistenz aufwiesen. Die teilweise EndoH-Resistenz der kleinen Form wies somit darauf hin, dass nur die kleine, nicht aber die große Form das ER verlassen hatte. Ostm1 ist zudem heterogen glycosyliert, da einige der Kohlenhydrate auch nach Verlassen des Golgi-Apparates noch eine hoch-Mannose Konfiguration aufwiesen.

Im deglycosylierten Zustand entsprach das scheinbare Molekulargewicht der großen Form mit 40 kD in etwa dem für ein 338 Aminosäuren langes Protein erwarteten Molekulargewicht. Die kleine Form war mit 15 kD erheblich kleiner. Um zu überprüfen, ob diese kleine Form ein proteolytisches Spaltprodukt der großen Form darstellt, wurde die Proteaseaktivität in Zellkultur inhibiert.

Nach Inkubation von Fibroblasten mit den Proteaseinhibitoren Leupeptin und E64 für 24 Stunden konnte eine neue 90 kD Ostm1-Form (hier XL genannt) mit leicht höherem offensichtlichem Molekulargewicht als die ER-Form nachgewiesen werden. Die Menge der kleinen Form nahm im gleichen Maße ab, wie die der XL-Form zunahm. Unter nichtreduzierenden Bedingungen war sowohl mit als auch ohne Proteaseinhibitor nur die große 80 kD sowie die 90 kD XL-Form nachweisbar (siehe Abb. 3.13). Für die verwendeten Inhibitoren Leupeptin, E64 sowie sein Derivat Ca074Me, die eine Abnahme der



**Abbildung 3.13: Lysosomale Spaltung von Ostm1.** Western Blot mit einem gl-C3 Antikörper gegen den C-Terminus von Ostm1 auf Lysaten von Mausfibroblasten. In unbehandelten Lysaten ist das normale Laufverhalten von Ostm1 mit einer großen Form (gefüllte Pfeilspitze) und einer kleinen Form (offene Spitze) zu erkennen (Spur 1). Nach Behandlung mit dem Proteaseinhibitor Leupeptin (30µM für 36 Stunden) fehlt die kleine Form wohingegen eine zusätzliche Form mit einem scheinbare Molekulargewicht von etwa 85 kD (Pfeil) erscheint (Spur3). Nach nicht reduzierender SDS-Page Auftrennung von unbehandelten Zellysaten (Spur 5) sowie Lysaten von mit Leupeptin inkubierten Zellen (Spur 7) ist ebenfalls die größere 85 kD Form bei gleichzeitigem Verlust der 35–45 kD Form zu erkennen.

kleinen Form zur Folge hatten, ist vor allem eine Wirkung auf Cathepsine beschrieben [SCHOMBURG et al. 2000, BARTHELMES et al. 2007].

Offensichtlich wird der luminaire Abschnitt von Ostm1 auf dem Weg zum oder im Lysosom proteolytisch gespalten (siehe Abb. 3.13). Dies deutete darauf hin, dass die kleine 35–45 kD Form durch Spaltung der XL 90 kD Form entsteht. Das anscheinende Molekulargewicht der Ostm1-Formen legt eine Spaltung in etwa in der Mitte nahe. Die Spaltfragmente von Ostm1 sind vermutlich auch nach der Spaltung über Disulfidbrücken zwischen einigen der Cysteine im Aminoterminus verbunden.

Die gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass CIC-7 für die lysosomale Lokalisation von Ostm1 benötigt wird, und dass der luminaire Teil von Ostm1 auf dem Weg zu, oder in, Lysosomen proteolytisch gespalten wird.

## 3.2 Untersuchung der Interaktion von CIC-7 und Ostm1

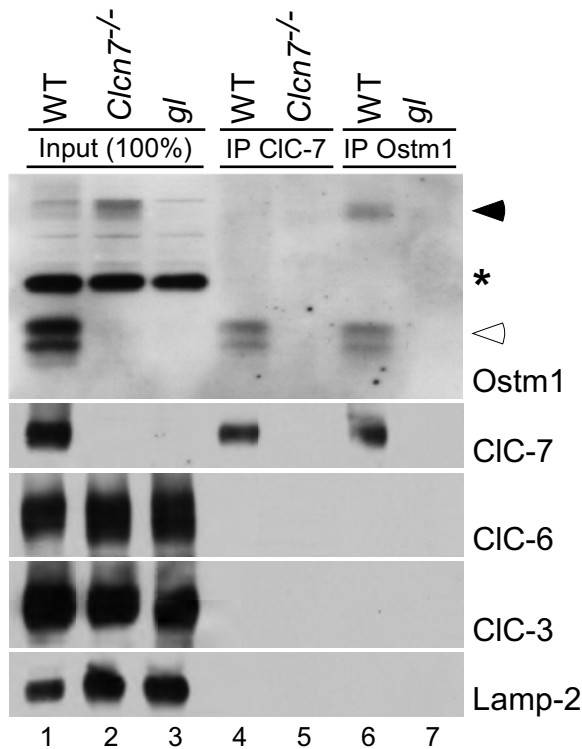
Um zu klären, ob die bisher gezeigte Abhängigkeit der Lokalisation von Ostm1 von CIC-7 auf einer physischen Interaktion beruht, wurden Koimmunopräzipitationsexperimente aus



### 3.2 Untersuchung der Interaktion von CIC-7 und Ostm1

Gehirnlysate durchgeführt. Wie Abbildung 3.14 zeigt, wurde CIC-7 effizient mit Ostm1 kopräzipitiert. Ebenso konnte nach Präzipitation mit Antikörpern gegen CIC-7 die kleine Form von Ostm1 im Präzipitat nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der Spezifität dieser Interaktion wurde untersucht, ob andere CLC-Proteine, die in einem ähnlichen Kompartiment vorkommen (CIC-3, CIC-6) oder Membranproteine des gleichen Kompartimentes (Lamp2) ebenfalls kopräzipitiert wurden. Dies war nicht der Fall, wie an den deutlichen Signalen im Lysat, aber fehlenden Signalen nach Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -CIC-7- beziehungsweise  $\alpha$ -Ostm1-Antikörpern zu erkennen ist. Eine Kopräzipitation der großen Form von Ostm1 mit CIC-7 aus nativem Gewebe konnte nicht klar nachgewiesen werden. Eine interessante Nebenbeobachtung dieses Experiments war, dass CIC-7 in Lysaten aus Gehirnen von *gl*-Mäusen praktisch nicht nachweisbar war. Dies soll in Abschnitt 3.2.1 näher untersucht werden.

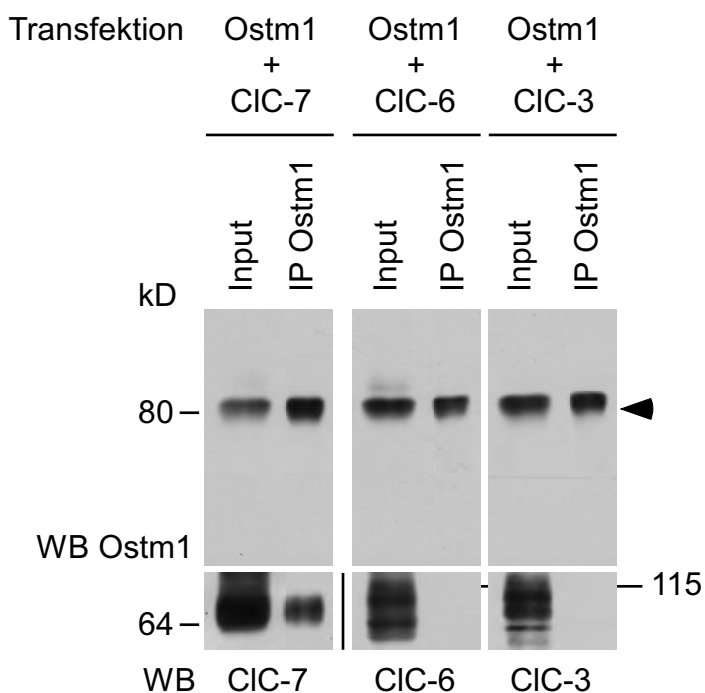
Aufgrund der lysosomalen Lokalisation von Ostm1 war zu erwarten, dass mit Antikörpern gegen CIC-7 die kleine, lysosomale Form aus Gehirnlysaten präzipitierte. Da die Spaltung jedoch erst auf dem Weg zu oder in Lysosomen stattfindet und CIC-7 für die Zielsteuerung von Ostm1 in Lysosomen benötigt wird, wurde auch eine Interaktion mit der ungespaltenen Form von Ostm1 untersucht.



**Abbildung 3.14: CIC-7 und Ostm1 interagieren *in vivo*.** Western Blot von Membranpräparationen aus Gehirn von WT, *Clcn7<sup>-/-</sup>* und *gl* Mäusen (Spur 1–3) oder Immunpräzipitaten solcher (Spur 4–7) gefolgt von Immundetektion wie angegeben. Die Spuren 4+5 zeigen das Eluat nach Immunpräzipitation gegen CIC-7 aus WT respektive *Clcn7<sup>-/-</sup>* Präparationen. Die Spuren 6+7 zeigen das Eluat nach Immunpräzipitation gegen den C-Terminus von Ostm1 aus WT respektive *gl* Präparationen. Es wurden äquivalente Mengen des Lysates (Input, Spur 1–3) sowie der Präzipitate (Spur 4–7) geladen. Immunpräzipitation gegen CIC-7 (Spur 4) führte zu einer Präzipitation von CIC-7 sowie der kleinen Form von Ostm1. Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Ostm1 (Spur 6) führte zu einer Präzipitation beider Ostm1-Formen sowie CIC-7. Die Proteine CIC-6, CIC-3 sowie Lamp-2 konnten im Lysat (Spuren 1–3), nicht aber in den Präzipitaten (Spuren 4–7) nachgewiesen werden. \*, unspezifisches Signal.

In Lysaten aus transient mit CIC-7 und Ostm1 kodierender cDNA transfizierten HEK293 Zellen ließ sich nur die 80 kD Form von Ostm1 nachweisen (3.15). Koimmunpräzipitation zeigte, dass CIC-7 auch mit dieser großen Form interagiert (Abb. 3.15). Auch im Überexpressionssystem ist die Interaktion spezifisch. Eine Präzipitation von koexprimiertem CIC-3 oder CIC-6 konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden.

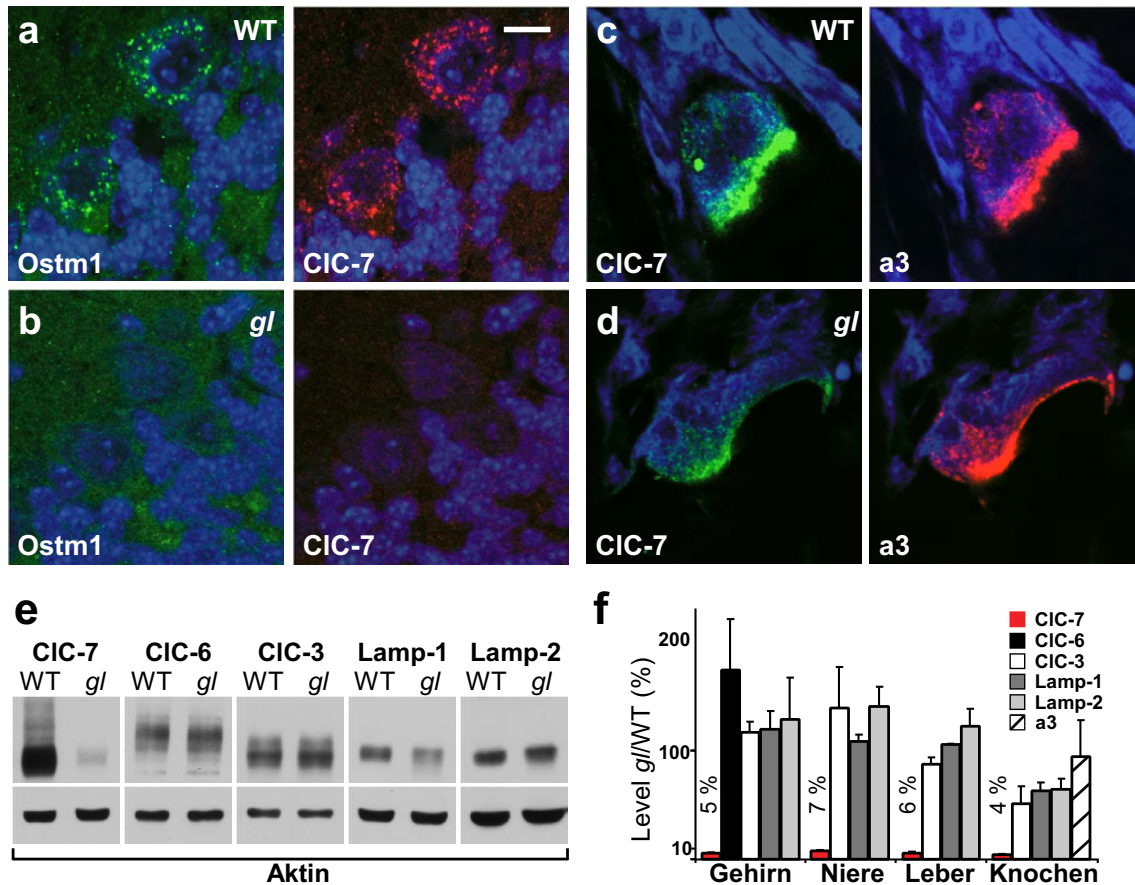
Im Überexpressionssystem konnte ausschließlich die 80 kD Form nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine blockierte lysosomale Sortierung, etwa aufgrund von Aggregatbildung nach starker Überexpression oder ausbleibende proteolytische Spaltung zurückzuführen sein.



**Abbildung 3.15: CIC-7 interagiert mit der großen Ostm1-Form.** HEK293 Zellen wurden mit DNA für Ostm1 sowie CIC-7, CIC-6 beziehungsweise CIC-3 transfiziert. Lysate und Eluate nach Immunpräzipitation gegen den C-Terminus von Ostm1 wurde per SDS-Page aufgetrennt und nach Western Blot mit Antikörpern gegen Ostm1, CIC-7, CIC-6 sowie CIC-3 detektiert. Es wurden äquivalente Mengen des Lysates (Input) sowie der Präzipitate geladen. Die große Form von Ostm1 (gefüllte Pfeilspitze) ist in allen Lysaten und Präzipitaten ähnlich stark nachweisbar. Die kleine Form ist in Ostm1 überexprimierenden HEK293 Zellen nicht detektierbar. CIC-7 ist sowohl im Lysat, wie auch im Eluat nach Präzipitation mit Ostm1-Antikörpern nachweisbar. CIC-6 und CIC-3 sind vergleichbar stark exprimiert und im Lysat, nicht aber nach Präzipitation mit Ostm1-Antikörpern nachweisbar.

### 3.2.1 Ostm1 ist essentiell für die Stabilität des CIC-7 Proteins

Es war auffällig, dass CIC-7 in Lysaten aus *gl*-Mäusen nur sehr schwach mittels Western Blot nachzuweisen war. Um dies genauer zu untersuchen wurden mittels Western Blot die CIC-7-Menge in Gehirn, Niere Leber und Knochen von WT- und *gl*-Mäusen quantitativ untersucht. Auch hier wurden als Kontrolle CIC-6 und -3 sowie die beiden



**Abbildung 3.16: Reduzierte CIC-7-Proteinmenge in *grey-lethal* Zellen.** **a, b** Immunfluoreszenz von Purkinjezellen des Cerebellums. **a**) in Wildtypzellen kolokalisiert Ostm1 (grün) mit CIC-7 (rot) in späten Endosomen / Lysosomen. **b**) In *grey-lethal* Neuronen war weder Ostm1 noch CIC-7 nachweisbar. **c, d**) Immunfluoreszenzfärbung von Osteoklasten *in situ*. **c**) CIC-7 (grün) kolokalisierte mit der a3-Untereinheit der H<sup>+</sup>-ATPase (rot) in der *ruffled border* von Wildtyposteoklasten. **d**) In *grey-lethal* Osteoklasten ist das CIC-7 (grün) Signal drastisch reduziert. In **a-d** sind Nucleinsäuren mit TOTO in blau angefärbt. Maßstab 10 µm. **e**) Western Blots zeigten eine Reduktion von CIC-7, aber nicht CIC-6, CIC-3, Lamp-1 oder Lamp-2 in Gehirnlisaten aus *grey-lethal* Tieren. **f**) Quantifizierung von Western Blots aus verschiedenen Geweben zeigten eine Reduktion von CIC-7 in *grey-lethal* Mäusen, während andere endosomale / lysosomale Proteine unverändert waren. Die Osteopetrose könnte für die leichte Reduktion der Kontrollproteine in *grey-lethal* Knochen verantwortlich gewesen sein. Alter: p11-33, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. n=3-9 Mauspaare (Ausnahme CIC-3 in Knochen n=2).

lysosomalen Membranproteine Lamp-1 und Lamp-2 gewählt. Bei der Untersuchung des Knochens wurde zusätzlich die Menge der  $\alpha 3$ -Untereinheit der vakuolären  $H^+$ -ATPase, die wie CIC-7 in der *ruffled border* von Osteoklasten exprimiert ist, analysiert. Nach Western Blot und Immundetektion wurden die Signale densitometrisch ausgewertet. Um Präparations- und Ladefehler zu minimieren wurde auf Aktin normalisiert.

Abbildung 3.16 e zeigt exemplarisch die über einen Western Blot nachgewiesene Menge der verschiedenen Proteine in Gehirnllysaten von WT und *gl*-Tieren. Die Quantifizierung solcher Western Blots (Abb. 3.16 f) ergab, dass CIC-7 in allen untersuchten Geweben auf unter 10% des WT-Niveaus reduziert ist. Die Menge der übrigen untersuchten Proteine in Gehirn, Niere und Leber schwankte dagegen um das Wildtypniveau. In Knochen schienen sie um 20-50% reduziert zu sein. Dieser Effekt könnte auf die grundlegende Veränderung des Knochens aufgrund der schweren Osteopetrose zurückzuführen sein.

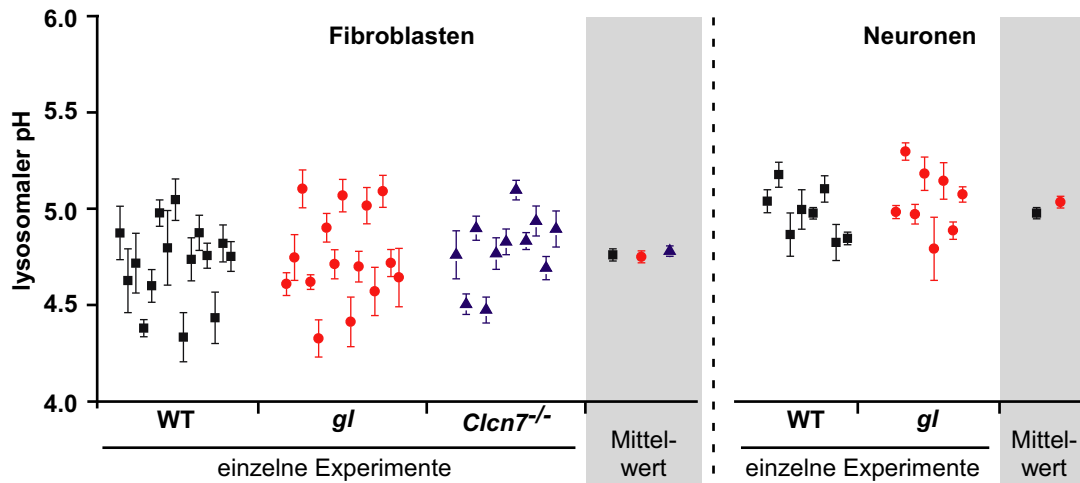
Der Verlust von CIC-7 in *Ostm1* defizientem Gewebe konnte auch auf zellulärer Ebene bestätigt werden. Immunhistochemische Färbungen von Purkinjezellen des Cerebellums (Abb. 3.16 a,b) sowie Osteoklasten (Abb. 3.16 c,d) zeigten eine deutliche Abnahme oder gar einen Verlust CIC-7 positiver Strukturen in *gl*-Zellen. Die Lokalisation des verbleibenden CIC-7 wurde jedoch in Osteoklasten, wie auch in Fibroblasten (Daten nicht gezeigt) durch den Verlust von *Ostm1* nicht verändert.

Die quantitative Analyse der Expressionslevel mit Hilfe der von Lena Wartosch (AG Jentsch) durchgeführten Real-Time-PCR-Methode ergab keinen Unterschied im mRNA-Niveau von *Ostm1* und CIC-7 zwischen WT-, *Clcn7<sup>-/-</sup>*- und *gl*-Mäusen in verschiedenen untersuchten Geweben (Tabelle 3.1). Dies zeigte, dass der Verlust von CIC-7 sowie der kleinen Form von *Ostm1* in der jeweils andere Mausmutante auf Protein- und nicht auf mRNA Ebene erfolgt.

**Tabelle 3.1: CIC-7 und Ostm1 mRNA Level sind in *gl*- und *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Mäusen unverändert.** Quantitative Real-time-PCR-Analyse von CIC-7- und *Ostm1*-Transkripten in *gl*/WT und *Clcn7<sup>-/-</sup>*/WT Geschwistern. Angegeben ist das Verhältnis der Mausmutante zum dazugehörigen WT Tier.  $\pm$  Standardfehler; n: Anzahl der untersuchten Tiere. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

|                | CIC-7 mRNA level<br>( <i>gl</i> /WT) | <i>Ostm1</i> mRNA level<br>(CIC-7ko/WT) |
|----------------|--------------------------------------|---|
| <b>Gehirn</b>  | 1,10 $\pm$ 0,03 (n=4)                | 1,35 $\pm$ 0,04 (n=4)                   |
| <b>Niere</b>   | 0,97 $\pm$ 0,10 (n=4)                | 1,11 $\pm$ 0,08 (n=3)                   |
| <b>Leber</b>   | 0,85 $\pm$ 0,03 (n=4)                | 1,07 $\pm$ 0,03 (n=4)                   |
| <b>Knochen</b> | 1,09 $\pm$ 0,10 (n=4)                | 1,23 $\pm$ 0,37 (n=6)                   |

## 3.2.2 Untersuchung des lysosomalen pH



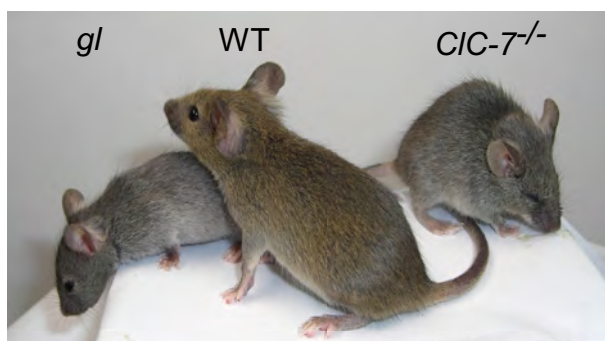
**Abbildung 3.17: Der lysosomale pH von *gl*- sowie *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Zellen erscheint unverändert.** Der lysosomale pH von WT, *gl* und *Clcn7<sup>-/-</sup>* Fibroblasten sowie WT und *gl* Neuronen wurde mittels endozytiertem *Oregon-Green-Dextran* ratiometrisch gemessen. Die Zellen wurden für zwei Stunden oder über Nacht mit *Oregon-Green-Dextran*, gefolgt von einem mindestens einstündigem *chase*, beladen. Der durchschnittliche pH von Lysosomen war  $4,76 \pm 0,03$  (Standardfehler) für WT,  $4,75 \pm 0,03$  für *gl*- und  $4,78 \pm 0,03$  für *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Fibroblasten (n=109 Sichtfelder mit ein oder zwei Zellen für WT, 125 (*gl*) und 108 (*Clcn7<sup>-/-</sup>*)). In kultivierten hippocampalen Neuronen war der durchschnittliche pH von WT- und *gl*-Lysosomen  $4,98 \pm 0,03$  beziehungsweise  $5,04 \pm 0,03$  (n=49 (WT), n=76 (*gl*)).

Wie andere vesikuläre CLC-Proteine könnte auch CIC-7 einen elektrischen Ladungs- ausgleich für die Protonenpumpe bereitstellen. In kultivierten Neuronen und Fibroblasten konnte jedoch kein pH-Unterschied zwischen Wildtyp- und *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Lysosomen festgestellt werden [KASPER et al. 2005]. Um zu überprüfen, ob *Ostm1* einen weiterreichenden Einfluss auf den lysosomalen pH hat, wurde dieser im Vergleich von WT, *Clcn7<sup>-/-</sup>* und *gl* bestimmt.

Der Dextran-gekoppelte pH-Indikator *Oregon-Green* wurde durch Endozytose, gefolgt von einem *chase* in indikatorfreiem Medium, in späte Endosomen und Lysosomen geladen. Durch Fixierung und Immundetektion gegen das lysosomale Protein Lamp-1 konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff in allen drei Zelllinien spät-endosomale/lysosomale Kompartimente erreichte. Aus den bei 440 nm und 490 nm Anregung gewonnenen Fluoreszenzbildern des ratiometrischen Farbstoffes wurde das Intensitätsverhältnis der vom Farbstoff angefärbten lysosomalen Strukturen ermittelt. Nach Inkubation mit dem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antipporter Monensin und dem K<sup>+</sup>-Antipporter Nigericin bei definierten pH konnte dem gemessenen Verhältnis von 440 nm/490 nm ein absoluter pH-Wert zugeordnet werden.

Abbildung 3.17 zeigt den so ermittelten lysosomalen pH Wert von kultivierten WT-, *gl*- und *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Fibroblasten sowie WT- und *gl*-Neuronen. Bei einem lysosomalen pH von etwa 4,8 in Fibroblasten und 5,0 in kultivierten, hippocampalen Neuronen konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Dies stimmte mit den Ergebnissen der vorhergehenden Untersuchung zu dem lysosomalen pH in *Clcn7<sup>-/-</sup>*-Zellen überein [KASPER et al. 2005].

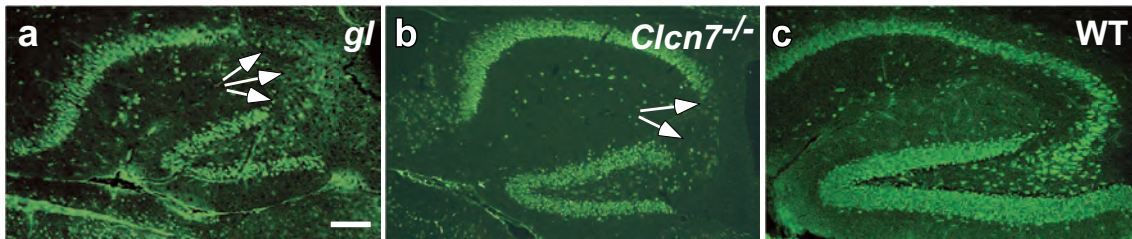
### 3.3 Vergleichende Analyse des Phänotyps der CIC-7-Knockout und *grey-lethal* Maus



**Abbildung 3.18: WT, CIC-7-Knockout und *gl*-Mäuse im Vergleich.** Im Gegensatz zu ihren *agouti* WT-Geschwistern haben *Clcn7<sup>-/-</sup>* und *gl* graues Fell. Alter, etwa 4 Wochen.

Die Phänotypen von CIC-7-Knockout und *gl*-Mäusen sind bestechend ähnlich. Sowohl *Clcn7<sup>-/-</sup>*- als auch *gl*-Mäuse [GRUNEBERG 1936] im *agouti* Hintergrund, die normalerweise ein braunes Fell aufweisen, zeigen eine graue Fellfarbe (3.18). In einem Hintergrund, der zu einer schwarzen Fellfarbe führt, sind sowohl *Clcn7<sup>-/-</sup>*- wie auch *gl*-Mäuse schwarz. Der Verlust von funktionellem CIC-7 und *Ostm1* führt wie beschrieben zu schwerwiegender Osteopetrose in Mäusen und Menschen [KORNAK et al. 2001, CHALHOUB et al. 2003].

Neuere Untersuchungen von CIC-7-Knockout Mäusen [KASPER et al. 2005] und konditionellen CIC-7-Knockout Mäusen (Lena Wartosch, persönliche Kommunikation) haben neben der Osteopetrose einen schweren neurodegenerativen Phänotyp gezeigt. Besonders schwer betroffen ist hierbei die CA3-Region des Hippocampus. Mäuse mit einem Defekt in der  $\alpha 3$ -Untereinheit der  $H^+$ -ATPase haben eine ebenso schwere Osteopetrose, jedoch keine Neurodegeneration [KASPER et al. 2005]. Auch für *grey-lethal* Mäuse war bisher keine Neurodegeneration beschrieben. Vergleichende Untersuchungen von *gl*-, *Clcn7<sup>-/-</sup>*- und WT-Mäusen sollten zeigen, ob *grey-lethal* Mäuse eine ähnliche Neurodegeneration aufweisen.



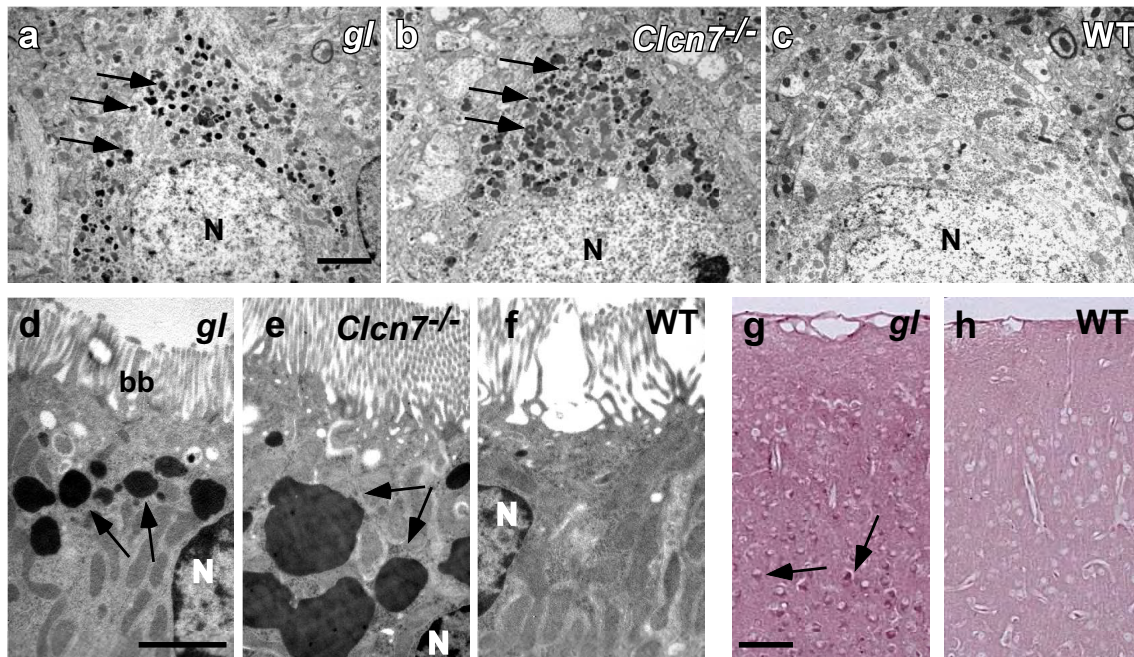
**Abbildung 3.19: Neurodegeneration im Hippocampus von *grey-lethal* Mäusen.** NeuN Färbung neuronaler Zellkörper in hippocampalen Schnitten von *gl* (p47), *Clcn7*-Knockout (p30) und WT (p47) Mäusen. **a)** In der CA3-Region des Hippocampus (Pfeile) von *grey-lethal* Mäusen war ein deutlicher Verlust von NeuN positiven Neuronen zu beobachten. **b)** Der gleiche regionenspezifische Zellverlust trat in *Clcn7* Knockout, aber nicht in WT Hippocampi auf **c)**. Maßstab 100  $\mu$ m.

Eine immunhistochemische NeuN (*neuron-specific nuclear antigen*)-Färbung auf Gehirnschnitten von *grey-lethal* Mäusen zeigte insbesondere in der CA3-Region des Hippocampus einen Verlust NeuN positiver Neuronen. An Tag p47, kurz bevor die Tiere starben, waren nahezu alle CA3-Pyramidenzellen abgestorben (Abb. 3.19 a). Der regionspezifische Verlust erinnerte stark an den bei *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachteten Verlust (Abb. 3.19 b).

Von Michaela Schweizer (Servicegruppe Morphologie, ZMNH Hamburg) angefertigte elektronenmikroskopische Aufnahmen brachten elektronendichte Strukturen in den Zellkörpern von hippocampalen und cortikalen Neuronen von p44 Tage alten *gl*-Mäusen zum Vorschein (Abb. 3.20 a). Vergleichbare Ablagerungen finden sich auch in 30 Tage alten *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 3.20 b). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Zellen des proximalen Tubulus. Zellen aus p41 alten *grey-lethal* Mäusen wiesen Ablagerungen aus elektronendichtem Material unterhalb des Bürstensaumes auf, wie es schon zuvor bei *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet wurde (Abb. 3.20 d-f). Ähnliches Speichermaterial konnte in einigen Fällen auch in Neuronen und proximalen Tubuluszellen von alten WT Mäusen beobachtet werden. Bei gleichem Alter war die Häufigkeit jedoch deutlich geringer.

Eine für lysosomale Speicherkrankheiten übliche Akkumulation von intrazellulären Kohlenhydraten kann mittels Perjodsäure-Schiff (*Periodic-acid-Schiff*, PAS)-Färbung nachgewiesen werden [GOEBEL und WISNIEWSKI 2004]. In 46 Tage alten Mäusen konnte eine Anreicherung PAS positiven Material in den Zellkörpern cortikaler Neuronen gezeigt werden (Abb. 3.20 g-h). Die gleichen Ablagerungen konnten in praktisch allen Gehirnregionen gezeigt werden und erinnerten stark an die beschriebenen PAS positiven Strukturen in *Clcn7*<sup>-/-</sup> Mäusen [KASPER et al. 2005].





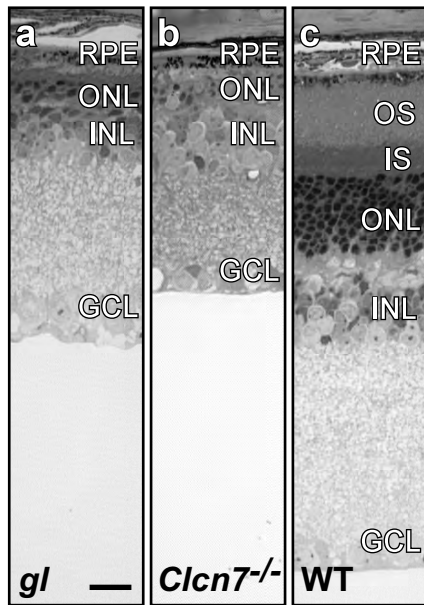
**Abbildung 3.20: Speichermaterial in *gl*- und *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Zellen.** a-c) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von cortikalen Neuronen. a) In Zellkörpern von 44 Tage alten *grey-lethal* Neuronen war eine starke Akkumulation von elektronendichtem Speichermaterial (Pfeile) zu erkennen. Wie bereits beschrieben [KASPER et al. 2005] wiesen Zellkörper von 30 Tage alten CIC-7-Knockout (b), aber nicht von 44 Tage alten Kontrollneuronen (c) ähnliche Aggregate auf. d-f) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen des proximalen Nierentubulus. d) Große elektronendichte Aggregate unterhalb der *brush border* (bb) von proximalen Tubuluszellen aus p41 *grey-lethal* Mäusen erinnerten an die beschriebenen Ablagerungen in 30 Tage alten CIC-7-Knockout Mäusen (e). f) Proximale Tubuluszellen auf p41 Kontrollmäusen wiesen keine vergleichbaren Ablagerungen auf. g-h) PAS-Färbung zeigte eine perinukleäre Ablagerung (Pfeile) von Kohlenhydraten im Cortex von 46 Tage alten *grey-lethal* Mäusen (g) die in gleich alten Kontrollmäusen (h) fehlte. Ein ähnliches Bild wurde schon vorher bei p30 alten CIC-7-Knockout Mäusen beobachtet [KASPER et al. 2005]. Maßstab (a-f) 2 µm, (g-h) 0,2 mm.

CIC-7-Knockout Mäuse weisen eine primäre Retinadegeneration auf [KORNAK et al. 2001]. Methylenblau gefärbte Semidünnschnitte von Augen aus *grey-lethal* Mäusen (p31) zeigten einen markanten Verlust der Photorezeptoren (Abb. 3.21 a), wie er auch in CIC-7-Knockout (Abb. 3.21 b) auftrat. Während die Photorezeptorschicht praktisch vollständig fehlt, konnte in der inneren Kernschicht nur ein Verlust einzelner Zellen beobachtet werden.

Es konnte kein über den des CIC-7-Knockout hinausgehender Phänotyp festgestellt werden. Auch die vorläufige Analyse von *Clcn7*<sup>-/-</sup>/*gl* Doppelknockout-Mäusen ergab keinen von den Einzelknockouts zu unterscheidenden Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Der beschriebene Phänotyp der *grey-lethal* Maus ist somit praktisch identisch mit dem der CIC-7-Knockout Maus. Neben der bekannten Osteopetrose konnte eine Neuro- und Re-



### 3.3 Vergleichende Analyse des Phänotyps der *CIC-7*-Knockout und *grey-lethal* Maus



**Abbildung 3.21: Retinadegeneration in *grey-lethal* und *CIC-7*-Knockout Mäusen.** a-c) Auf Methyleneblau gefärbten Semidünnschnitten der Retina ist eine deutliche Degeneration in p31 *grey-lethal* Mäusen (a), die der von p30 *CIC-7*-Knockout Mäusen (b) zu erkennen. Die Photorezeptorschicht sowie die innere Kernschicht sind stark reduziert. c) WT Kontrolle (p31). RPE, retinales Pigmentepithel; OS, äußere Photorezeptorschicht; IS, innere Photorezeptorschicht; ONL, äußere Kernschicht; INL, innere Kernschicht; GCL, Ganglienzellschicht. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ .

tinadegeneration sowie lysosomales Speichermaterial in Neuronen und Zellen des proximalen Tubulus gezeigt werden.