

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Ostm1 eine neue β -Untereinheit von CIC-7 identifiziert werden. Ostm1 wurde als hoch glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein mit spät endosomaler/lysosomaler Lokalisation charakterisiert. Durch Koimmunpräzipitationsstudien konnte gezeigt werden, dass CIC-7 und Ostm1 *in vivo* interagieren. Es gelang weiterhin eine gegenseitig Abhängigkeit der Protein-, nicht aber der RNA-Stabilität von CIC-7 und Ostm1 zu beschreiben. Durch die Reduktion der CIC-7 Proteinmenge auf weniger als 10% in Ostm1 defizienten *grey-lethal* Mäusen konnte erstmals ein funktioneller Mechanismus als Ursache der von Mutationen in *OSTM1* verursachten Osteopetrose aufgezeigt werden. Darüber hinaus wurde erstmalig gezeigt, dass *grey-lethal* Mäuse neben der Osteopetrose an einer Neurodegeneration ähnlich der Neuronalen Ceroid-Lipofuscinose leiden.

4.1 Ostm1 – ein lysosomales Typ-I-Transmembranprotein

Die spontane Mausmutante *grey-lethal* ist seit 1936 als Osteopetrosemodell bekannt [GRUNEBERG 1936]. Dem Labor von Jean Vacher gelang es 2003 das *grey-lethal* (*gl*) Gen als Osteopetroselokus zu identifizieren. In einer ersten Charakterisierung beschrieben sie das durch *gl* kodierte Protein Ostm1 als Typ-I-Transmembranprotein (Aminoterminus luminal) mit spaltbarem Signalpeptid und einer Transmembrandomäne. Weiterhin zeigten sie mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen von Osteoklasten eine zytoplasmatische Lokalisation [CHALHOUB et al. 2003].

Unabhängig hiervon wurde kurze Zeit später im Labor von Marilyn Farquhar ein sequenzidentisches Protein unter dem Namen *GAIP interacting protein N terminus* (GIPN) kloniert [FISCHER et al. 2003]. Nach einer Sequenzanalyse wurde für GIPN eine Transmembrantopologie vom Typ-II mit zytoplasmatischem N-Terminus vorhergesagt. RGS-GAIP ist ein Mitglied der A-Unterfamilie der RGS-Proteine (Regulator der G-Protein Signalkaskade) und fungiert als GTPase-aktivierendes Protein für $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten. Die

Interaktion zwischen GIPN und RGS-GAIP erfolgt über eine N-terminale leucinreiche Region (Aminosäuren 1-116) in GIPN und ein cysteinereiches Motiv im zytoplasmatischen N-Terminus von RGS-GAIP, wie durch Koimmunpräzipitation von *in vitro*-translatiertem GIPN und GAIP sowie im Yeast-two-hybrid-System gezeigt wurde. Weiterhin wurde eine E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität von GIPN beschrieben. Eine vor dem zweiten hydrophoben Abschnitt gelegenes RING-Finger-ähnliches Motiv (Aminosäuren 116-287) wurde hierbei als funktioneller Bereich identifiziert.

Die Orientierung der Termini zum Lumen oder zum Zytoplasma hin hat einen großen Einfluss auf die mögliche Aktivität und die Bindung an andere Proteine. Bevor auf die Interaktion mit CIC-7 näher eingegangen wird, soll zunächst dieser in der Literatur aufgetretene Widerspruch zweifelsfrei gelöst werden.

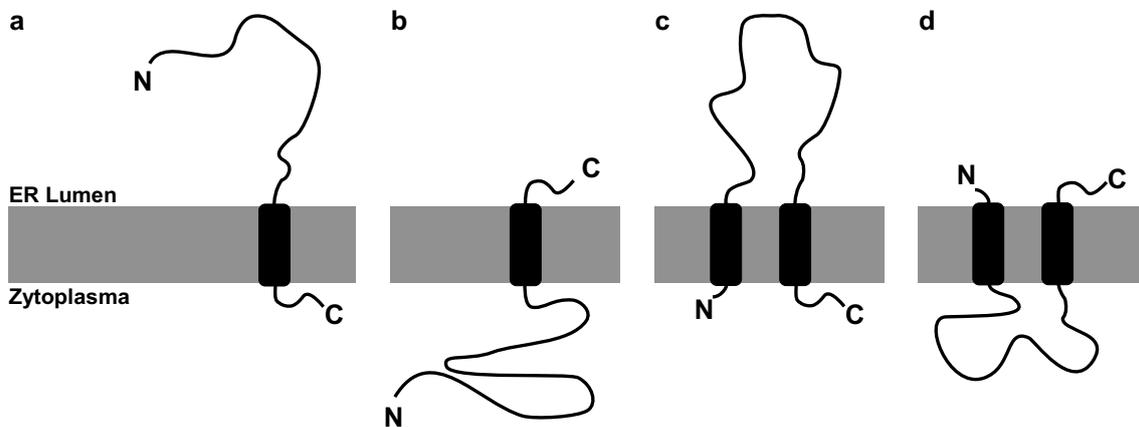


Abbildung 4.1: Mögliche Membrantopologien von Ostm1. a) Von Chalhoub et al. vorgeschlagene Topologie als Typ-I-Transmembranprotein bei dem der erste hydrophobe Abschnitt als spaltbares Signalpeptid dient und der zweite als einzige Transmembrandomäne fungiert. Der Aminoterminus ist zum Lumen, der Carboxyterminus zum Zytoplasma orientiert. b) Von Fischer et al. postulierte Topologie eines Typ-2-Transmembranproteins. Der zweite hydrophobe Abschnitt fungiert als internes Stop-Transfer-Signal. Der lange Aminoterminus mit putativer RING-Finger-Domäne und E3-Ubiquitinligaseaktivität zeigen zum Zytoplasma, der kurze Carboxyterminus zum Lumen. c) Topologie mit zwei Transmembrandomänen, wobei beide Termini zum Zytoplasma zeigen und ein großer Loop zum Lumen. d) Topologie mit zwei Transmembrandomänen, wobei die Termini luminal liegen. Ein großer Loop, der das von Fischer et al. postulierte RING-Finger-Motiv tragen würde, zeigt zum Zytoplasma. Im Unterschied zu (a) fungiert der erste hydrophobe Abschnitt nicht als abgespaltenes Signalpeptid, sondern als vollwertige Transmembrandomäne.

4.1.1 Transmembrantopologie

Sowohl Chalhoub et al. als auch Fischer et al. stützen ihre Charakterisierung der Membrantopologie von Ostm1 ausschließlich auf eine *in silico* Analyse nach dem Kyte-Doolittle Algorithmus [KYTE und DOOLITTLE 1982]. Neben den beiden von Chalhoub

und Farquhar vorgeschlagenen, sind für Ostm1 prinzipiell zwei weitere Topologien denkbar (siehe Abbildung 4.1). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ostm1 ein spaltbares Signalpeptid sowie eine hoch glycosylierten Aminoterminus besitzt. Dem zweiten hydrophoben Abschnitt von Ostm1 konnte desweiteren die Funktion als Transmembrandomäne zugeschrieben werden. Mit diesen Ergebnissen konnte die von Chalhoub et al. postulierte Typ-I-Transmembrantopologie bestätigt werden (Abb. 4.1a).

Diese Topologie ist jedoch nicht mit der im Labor von Marilyn Farquhar beschriebenen Funktion als E3 Ubiquitinligase vereinbar. Während luminale RING-Finger-Domänen beschrieben sind [BORDALLO et al. 1998], ist bisher weder ein luminaler Ubiquitinierungsapparat noch eine luminale E3-Ubiquitinligase bekannt. Um die *in vitro* gezeigten Eigenschaften auch in *in vivo* zu besitzen, muss der N-Terminus von GIPN mit der Binde-domäne und der enzymatisch aktiven RING-Finger-Domäne im zytoplasmatischen Raum liegen. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein kleiner Prozentsatz des *in vivo* exprimierten Ostm1 eine andere, als die hier gezeigte, Transmembrantopologie aufweist, ist eine Funktion von Ostm1 als E3-Ubiquitin-Ligase *in vivo* somit nicht zu erwarten. Sowohl Interaktion als auch E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität wurden von Fischer et al. *in vitro* ohne eine Membraninsertion gezeigt, was die beobachtete Abweichung von der *in vivo*-Situation erklären kann.

4.1.2 Lokalisierung

Bisher wurde für Ostm1 eine Lokalisation auf intrazellulären Membranen [CHALHOUB et al. 2003] beziehungsweise der Plasmamembran [FISCHER et al. 2003] beschrieben. Diese Beschreibung ist äußerst grob und erneut widersprüchlich. Da für die Beschreibung der zellulären Funktion sowie zur Untersuchung eines möglichen Zusammenspiels mit CIC-7 die genaue Kenntnis der Lokalisation jedoch unablässig ist, wurde diese genauer untersucht. Die Verwendung von Ostm1-defizienten Proben aus *gl*-Mäusen erlaubte hierbei eine Kontrolle der Spezifität der Ergebnisse.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen von kultivierten Zellen und Geweben mit Ostm1-spezifischen Antikörpern konnte eine vesikuläre Verteilung gezeigt werden. Diese Verteilung war mit der des spät endosomalen/lysosomalen Proteins Lamp1 [LEWIS et al. 1985, ESKELINEN et al. 2003] deckungsgleich. Die spät endosomale/lysosomale Lokalisation konnte mittels einer weiteren, unabhängigen Methode bestätigt werden. Subzelluläre Fraktionierung zeigte eine gemeinsame Anreicherung der kleinen Form von Ostm1 mit β -Hexosaminidase, einem lysosomalen Enzym [MILLER et al. 1993], sowie mit der reifen

Form der lysosomalen Protease Cathepsin D.

In Knochen konnte durch Kolo-kalisation mit der $\alpha 3$ -Untereinheit der H^+ -ATPase eine Lokalisation in der *ruffled border* von Osteoklasten gezeigt werden. Auch wenn die *ruffled border* dem Extrazellulär-raum zugewandt ist, zeigt sie in vielerlei Hinsicht Ähnlichkeit zu Lysosomen. Eine Reihe typischer lysosomaler Marker, wie Rab7, die H^+ -ATPase und Lamp-2, sind in der *ruffled border* angereichert [BARON et al. 1985, PALOKANGAS et al. 1997]. Außerdem enthält die Resorptions-lakune proteolytische Enzyme und weist einen sauren pH auf, so dass sie auch als „extrazelluläres Lysosom“ bezeichnet wird.

In allen untersuchten Geweben und Organen war die Lokalisation identisch mit der von CIC-7 und somit eine Grundvoraussetzung für eine mögliche Interaktion gegeben.

4.1.3 Prozessierung

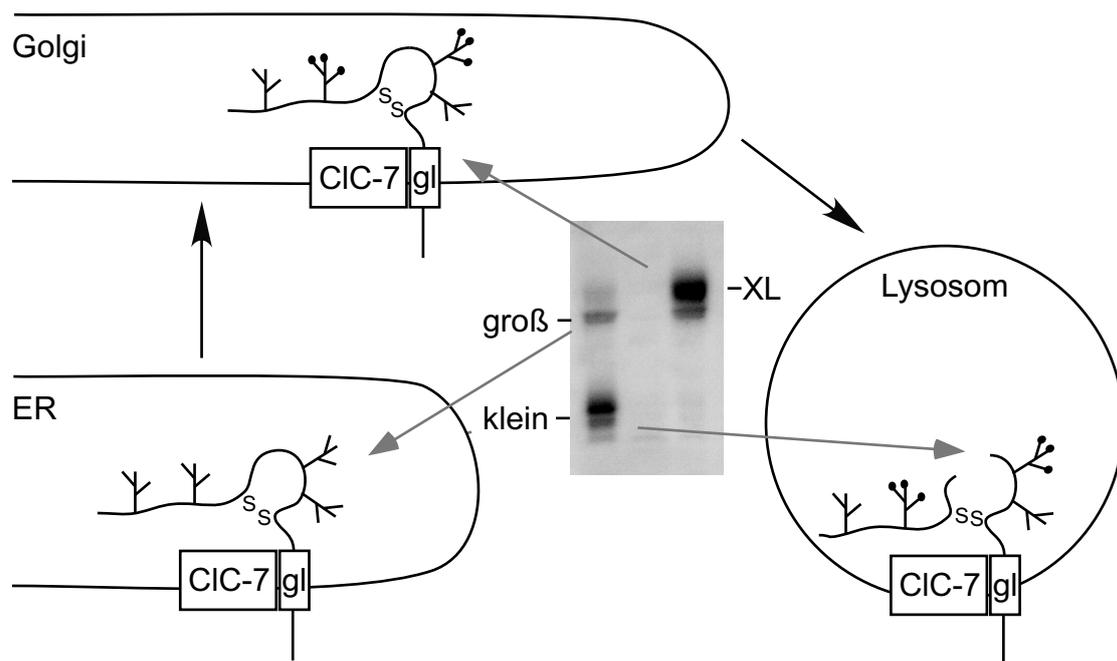


Abbildung 4.2: Prozessierung von Ostm1. Im ER wird Ostm1 glycosyliert und zwischen einigen der Cysteinresten werden Disulphidbrücken ausgebildet. Nach Interaktion mit CIC-7 kann Ostm1 das ER in Richtung Golgi-Komplex verlassen. Hier wird ein Teil der Kohlenhydratketten vom hoch-Mannose-Typ weiter zum komplexen-Typ prozessiert, das Molekulargewicht nimmt zu. Dieser Schritt verläuft vergleichsweise schnell, da diese Form im Gleichgewichtszustand der Zelle kaum nachweisbar ist. Der CIC-7/Ostm1 Komplex wird weiter in das Lysosom transportiert. Auf dem Weg zum oder im Lysosom wird der Aminoterminus von Ostm1 proteolytisch gespalten. Die Fragmente verbleiben jedoch über Disulphidbrücken miteinander verbunden.

Ostm1 ist nicht nur lysosomal lokalisiert, sondern wird auf dem Weg dorthin glycosyliert und prozessiert (Abb. 4.2). Nach erfolgter Glycosylierung der meisten oder aller der 10 putativen N-Glycosylierungsstellen und Knüpfung von Disulphidbrücken benötigt *Ostm1* ClC-7, um das ER verlassen zu können. Im Golgi-Apparat erfolgt eine Prozessierung der Kohlenhydratketten vom hoch-Mannose Typ zum komplexen-Typ [KORNFELD und KORNFELD 1985]. Offensichtlich werden im Fall von *Ostm1* nicht alle Kohlenhydratketten in diese EndoH-insensitive [DUNPHY und ROTHMAN 1985, KORNFELD und KORNFELD 1985, HIRSCHBERG und SNIDER 1987] Form überführt. Dies konnte bereits bei anderen Proteinen beobachtet werden [KUNDRA und KORNFELD 1999]. Ob dies auf eine gezielte Prozessierung einzelner Kohlenhydratketten oder auf eine einfache, konformationsbedingte Unzugänglichkeit der Kohlenhydratketten zurückzuführen ist, blieb unklar. Das Auftreten von Doppelbanden wies darauf hin, dass es schon im ER zu einer inhomogenen Glycosylierung kommt.

Auf dem Weg in späte Endosomen/Lysosomen wird *Ostm1* schließlich von Cysteineproteasen gespalten. Eine spezifische Spaltstelle konnte nicht identifiziert werden, da Proteasen dieser Gruppe keine ausgeprägte Sequenzspezifität aufweisen oder diese nicht bekannt ist [ROBERTS 2005]. Es bleibt daher unklar, ob es sich bei der Spaltung um einen spezifischen Prozess, oder um die unspezifische Spaltung einer gegenüber dem proteolytischen Lumen des Kompartiments exponierten Region handelt.

Das zu erwartende Molekulargewicht von *Ostm1* beträgt nach Abspaltung des Signalpeptides etwa 33 kD. Das scheinbare Molekulargewicht der deglycosylierten großen Form liegt mit etwa 40 kD etwas darüber, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in dem verwendeten Gelsystem die beobachteten Molekulargewichte von *Ostm1* über den tatsächlichen liegen. Nimmt man eine ähnliche Masse für alle Kohlenhydratketten (etwa 5 kD) an, so kann aus den beobachteten Gewichtsverlusten nach Deglycosylierung mit PNGaseF und EndoH, sowie nach Spaltung, folgendes sehr grobes Modell gebildet werden: Die proteolytische Spaltung erfolgt in etwa in der Mitte von *Ostm1*, im Bereich um Aminosäure 190. Von den putativ acht verwendeten Glycosylierungsstellen liegen drei im aminoterminalen und fünf im C-terminalen Fragment. Von den fünf im C-terminalen Fragment liegenden Kohlenhydratketten sind drei dem hoch-Mannose-Typ und zwei dem komplexen-Typ zuzuschreiben.

Bisher war es nicht möglich, der Spaltung eine physiologische Relevanz zuzuschreiben. Eine mögliche Funktion könnte eine Sekretion des abgespaltenen N-Terminus dar-

stellen. Dieses freie Glycopeptid könnte als Botenstoff zur Aktivierung von Signalkaskaden in umliegenden Zellen beitragen, wie dies etwa für Wnt-Proteine beschrieben ist [HAUSMANN et al. 2007]. So könnte beispielsweise die Sekretion des N-Terminus bei aktiver Knochenresorption zu einer Aktivierung von Osteoblasten führen [COHEN 2006]. Da der N-Terminus jedoch über Disulfidbrücken an den membranständigen C-Terminus gebunden ist, müssten hierfür in der Resorptionslakune ausreichend reduzierende Bedingungen vorherrschen, um eine Spaltung der Bindung zu ermöglichen. Zudem würde das Fragment zunächst nur in die Resorptionslakune sezerniert, was eine initiale Wirkung auf Osteoklasten beschränken würde. Nach Transzytose des Fragmentes oder Migration des Osteoklasten ist jedoch auch eine Wirkung auf weitere Zelltypen, etwa Osteoblasten möglich.

4.2 Ostm1 als β -Untereinheit von CIC-7

Durch Koimmunpräzipitation von endogenen sowie überexprimierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass CIC-7 und Ostm1 physisch miteinander interagieren. Diese Interaktion ist spezifisch, da keine Interaktion mit verwandten Proteinen der CLC-Familie gezeigt werden konnte. Die Bindung erfolgt bereits im ER, da sie sowohl für die große, im ER lokalisierte Form, wie auch für die kleine Form, die den Golgi-Apparat bereits passiert hat, gezeigt werden konnte. Indirekt konnte diese frühe Bindung zudem durch die CIC-7-Abhängigkeit des ER-Golgi Transports von Ostm1 gezeigt werden.

Erste Versuche, die Interaktionsdomäne zwischen Ostm1 und CIC-7 zu charakterisieren, deuten auf eine Interaktion im Transmembranbereich oder auf ein komplexes Bindungsinterface unter Beteiligung mehrerer Proteinbereiche hin. Ob es sich um eine direkte oder indirekte Bindung handelt, und in welcher Stöchiometrie beide Partner zueinander im Komplex stehen, lässt sich anhand der durchgeführten Experimente nicht endgültig beantworten. Die Daten legen jedoch eine direkte Bindung von einem oder wenigen Ostm1 Proteinen pro CIC-7-Untereinheit nahe.

4.2.1 Bindung an CIC-7 ist Voraussetzung für die lysosomale Zielsteuerung von Ostm1

Die Interaktion von Ostm1 und CIC-7 ist für die zelluläre Lokalisation und Funktion beider Proteine entscheidend. Der Mechanismus, über den CIC-7 in Lysosomen transpor-

tiert wird, bleibt weiterhin unklar, ist jedoch nicht von *Ostm1* abhängig. *CIC-7* erreicht auch in *Ostm1*-defizienten *grey-lethal* Zellen und Geweben das Lysosom. *Ostm1* hingegen erreicht ohne *CIC-7* das Lysosom nicht. Dies konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen von *Ostm1*-defizienten Zellen sowie von *Ostm1* überexprimierenden Zellen gezeigt werden. Durch die Beobachtung, dass *Ostm1* in Abwesenheit von *CIC-7* nicht proteolytisch gespalten wird, und dass seine Zuckerketten keine EndoH-Resistenz aufweisen und somit nicht im Golgi-Apparat modifiziert wurden, konnte die Abhängigkeit für die Zielsteuerung weiter untermauert werden. Während *CIC-7* eine Reihe von Sequenzmotiven aufweist, für die eine Beteiligung an der Zielsteuerung von Proteinen in Lysosomen bekannt ist [OFFE 2005], konnte in *Ostm1* kein solches Motiv identifiziert werden. Es ist daher anzunehmen, dass *CIC-7* eigenständig von Transportfaktoren, wie zum Beispiel den AP-Adaptorkomplexen [ROBINSON und BONIFACINO 2001] in Lysosomen transportiert wird, während *Ostm1* bereits im ER an *CIC-7* bindet und im Komplex in die Lysosomen folgt.

Ohne Bindung an *CIC-7* verbleibt *Ostm1* im ER. Es sind eine Reihe von Sequenzmotiven bekannt, die eine Retention von Proteinen im ER vermitteln [TEASDALE und JACKSON 1996, MICHELSEN et al. 2005]. Der C-Terminus von *Ostm1* weist in der Tat entsprechende Motive auf. Eine solche ER-Retention könnte über die Sequenzabschnitte *KKRK* (Aminosäuren 314-317) und *KRLK* (Aminosäuren 322-325) vermittelt werden. Versuche ihre Bedeutung für die Retention zu zeigen werden zur Zeit durchgeführt. Es wäre denkbar, dass ein solches ER-Retentionsmotiv in *Ostm1* durch eine Bindung mit *CIC-7* maskiert wird. Hierdurch könnte sichergestellt werden, dass nur vollständig gefaltetes und mit *CIC-7* komplexiertes *Ostm1* das ER verlässt. Ein solcher Mechanismus, in dem der ER-Export einer Untereinheit von der Assoziation mit einer anderen Untereinheit abhängt, ist weit verbreitet, so etwa bei dem K_{ATP} -Komplex [ZERANGUE et al. 1999] und der Na/K-ATPase [BÉGUIN et al. 2000]. Entfällt diese Bindung, verbleibt *Ostm1* im ER. Dass es dennoch nicht zu einer Akkumulation der großen Form von *Ostm1* kam, deutet darauf hin, dass freies, nicht mit *CIC-7* assoziiertes *Ostm1* schnell aus dem ER entfernt und vermutlich am Proteasom abgebaut wird [ELLGAARD und HELENIUS 2003].

Es konnte gezeigt werden, dass die Gesamtproteinmenge von *Ostm1* in Abwesenheit von *CIC-7* stark reduziert ist. Entscheidender aber dürfte sein, dass das verbleibende Protein nicht prozessiert wird und seinen Bestimmungsort, das Lysosom, nicht erreicht.

4.2.2 Ostm1 ist essentiell für die Stabilität des CIC-7 Proteins

Obwohl CIC-7 in Abwesenheit von Ostm1 Lysosomen erreicht, ist das Niveau von CIC-7 in Ostm1-defizienten Zellen und Geweben stark reduziert. In *grey-lethal* Neuronen konnte das sonst lysosomal lokalisierte CIC-7 [KASPER et al. 2005] nicht nachgewiesen werden, und in *grey-lethal* Osteoklasten war das CIC-7 Signal in der *ruffled border* stark reduziert. Auch in Fibroblasten und Hepatozyten konnte CIC-7 zwar in Lysosomen von *gl*-Zellen nachgewiesen werden, die Signale der Immunfluoreszenzfärbung erschienen jedoch erheblich schwächer als in Kontrollzellen. Eine Umverteilung, etwa auf retikuläre Strukturen, konnte nicht beobachtet werden. Neben diesem Effekt auf zellulärer Ebene konnte die Reduktion auf unter 10% des Wildtypniveaus durch quantitative Western Blots für alle untersuchten Gewebe beobachtet werden. Anhand von subzellulärer Fraktionierung wurde gezeigt, dass das verbleibende CIC-7 weiterhin in der lysosomalen Fraktion angereichert ist.

Im Gegensatz zu seiner β -Untereinheit Ostm1 wird CIC-7 demnach nicht schon im ER abgebaut. Das Lysosom ist ein proteolytisches Kompartiment mit saurem pH und einer Vielzahl an Proteasen. Um gegen eine Degradation in diesem Milieu geschützt zu sein, sind viele lysosomale Proteine hoch glycosyliert. So ist das gesamte Lysosom innen durch eine Kohlenhydratschicht ausgekleidet [NEISS 1984], die im wesentlichen durch die vorherrschenden lysosomalen Glycoproteine Lamp-1 und Lamp-2 gebildet wird [KORNFELD und MELLMAN 1989, FUKUDA 1991]. Abspaltung N-gekoppelter Oligosaccharide von lysosomalen Proteinen durch Inkubation von lebenden Zellen mit EndoH führte zu schnellem Abbau von Lamp-1 und Lamp-2 [KUNDRA und KORNFELD 1999]. Interessanterweise ist CIC-7 der einzige nicht glycosylierte Vertreter seiner Familie. Es ließe sich nun postulieren, dass CIC-7 durch die hoch glycosylierte β -Untereinheit Ostm1 vor den lysosomalen Proteasen geschützt wird. Durch den Verlust von Ostm1 würden die luminalen Sequenzabschnitte von CIC-7 exponiert und könnten schnell durch lysosomale Enzyme degradiert werden [FUKUDA 1991, ESKELINEN et al. 2003].

Die Bestätigung dieser Möglichkeit erscheint schwierig. Da CIC-7 und somit auch Ostm1 höchstwahrscheinlich nur in geringer Kopienzahl pro Lysosom vertreten sind [GILCHRIST et al. 2006, TAKAMORI et al. 2006] und EndoH sensitive Glycoproteine wie Lamp-1 und Lamp-2 den bei weitem größten Anteil ausmachen, erscheint es schwierig, einen spezifischen Effekt der Deglycosylierung von Ostm1 durch *in vivo*-Deglycosylierung zu zeigen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Generierung einer glycosylierungsdefizienten Ostm1-Mutante. Da die Glycosylierung in der Regel je-

doch bereits bei der Faltung des Proteins eine wichtige Rolle spielt, müsste hier mit fehlgefaltetem und über die ER-Qualitätskontrolle abgebautem Ostm1 gerechnet werden [RUDDOCK und MOLINARI 2006]. Zudem ist die Proteinmenge von CIC-7 in kultivierten *gl*-Fibroblasten nur auf grob 20-50% reduziert, und eine Aufhebung dieser Reduktion durch transiente Expression von Ostm1 konnte bisher nicht gezeigt werden.

4.2.3 Einfluss von Mutationen in CIC-7 und Ostm1 auf den Komplex

Bisher konnten eine Vielzahl krankheitsverursachender Mutationen in CIC-7 [WAGUESPACK et al. 2003, FRATTINI et al. 2003, WAGUESPACK et al. 2007] und in Ostm1 [CHALHOUB et al. 2003, RAMÍREZ et al. 2004, PANGRAZIO et al. 2006, SOURATY et al. 2007] identifiziert werden. Wie hier gezeigt wurde, ist die Bindung beider Proteine essentiell für ihre Stabilität und einwandfreie Funktion. Es ist daher davon auszugehen, dass eine Mutation, die die Bindung stört, zu einem Funktionsverlust führt. Die Identifikation solcher Mutationen bietet die Möglichkeit, sowohl die Interaktion beider Proteine, als auch die molekularen Prozesse, die zur Krankheit führen, besser zu verstehen.

Alle bisher in *OSTMI* gefundenen Mutationen führen zu einem verfrühten Translationsstopp vor der Transmembrandomäne. Jens Fuhrmann konnte durch Nachahmung dieser Mutationen im heterologen Expressionssystem zeigen, dass verkürzte Formen von Ostm1 sezerniert werden und somit ihr eigentliches Ziel, das Lysosom, nicht erreichen. Mutationen im hoch konservierten C-Terminus von Ostm1 oder solche, die die Interaktion mit CIC-7 stören, hätten einen Ansatzpunkt für weitere, gezielte Analysen geboten. Auch nach Untersuchung weiterer an Osteopetrose leidender Patienten konnten keine neuen Mutationen im *OSTMI*-Gen aufgedeckt werden.

Eine Untersuchung des Einflusses krankheitsverursachender Mutationen in CIC-7 auf die Bindung mit Ostm1 wird zur Zeit durchgeführt.

4.2.4 Vergleich mit Untereinheiten anderer Kanäle

Die meisten Ionenkanäle und Transporter sind multimere Komplexe, die aus einer oder mehreren die Pore formenden α -Untereinheiten, sowie in vielen Fällen akzessorischen β -Untereinheiten aufgebaut sind. Auf der Grundlage von einigen bekannten Funktionsweisen von Ionenkanal- β -Untereinheiten, wie hier kurz aufgeführt, soll die Funktion der

CIC-7/Ostm1 Interaktion betrachtet und bewertet werden.

Die KCNE Genfamilie kodiert für β -Untereinheiten der KCNQ K^+ -Kanäle. Sie besitzen eine Transmembrandomäne und können mit von KCNQ1-4 gebildeten Homo- oder Heterotetrameren spezifisch interagieren und funktionelle Kanäle bilden. [CAI et al. 2006]. Die β -Untereinheit KCNE modifiziert die physikalischen Eigenschaften des KCNQ-Tetramers maßgeblich [SCHROEDER et al. 2000], wobei ein C-terminaler Abschnitt der KCNQ- α -Untereinheit die Spezifität der Bindung an KCNE- β -Untereinheiten vermittelt [SCHWAKE et al. 2003].

Bei den β -Untereinheiten weiterer spannungsabhängiger Kaliumkanäle (K_V) handelt es sich um zytoplasmatische Proteine. Durch konservierte Domänen in den einzelnen Untereinheiten wird sichergestellt, dass jede $K_V\beta$ -Untereinheit nur mit bestimmten $K_V\alpha$ -Untereinheiten interagiert [NAKAHIRA et al. 1996]. Neben einem möglichen Einfluss auf die Inaktivierungskinetik des Kanals scheinen die $K_V\beta$ -Untereinheiten vor allem eine Rolle für die Oberflächenexpression zu spielen. So binden sie bereits kotranslational an die α -Untereinheit und unterstützen deren N-Glycosylierung. Sie sorgen desweiteren für eine Stabilisierung des Komplexes und somit für eine gesteigerte Oberflächenexpression [SHI et al. 1996].

Die β -Untereinheiten spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (Ca_V) sind zytoplasmatische Proteine, die an eine intrazelluläre Linkerregion der porenformenden $Ca_V\alpha1$ Untereinheit binden. Ihr Haupteffekt auf die Ca^{2+} -Kanalfunktion ist eine Erhöhung der Stromamplitude sowie eine Hyperpolarisierung der Spannungsabhängigkeit, die bereits eine Öffnung des Kanals bei geringerer Depolarisation des Membranpotentials erlaubt [DOLPHIN 2003].

Welcher Mechanismus der Erhöhung der Stromamplitude zugrunde liegt ist weiterhin unklar, wobei eine erhöhte Oberflächenexpression für wahrscheinlich gehalten wird. Diese ist möglicherweise auf eine Maskierung eines unbekanntes ER-Retentionssignals in einem intrazellulären Abschnitt der $Ca_V\alpha1$ -Untereinheit durch die $Ca_V\beta$ -Untereinheit zurückzuführen [BRICE et al. 1997, BICHET et al. 2000].

Der ATP-sensitive Kaliumkanal K_{ATP} ist ein aus vier ionenleitenden Kir6.2 α -Untereinheiten und vier SUR1 (Sulfonylurea Rezeptor 1) β -Untereinheiten aufgebautes Oktamer. K_{ATP} Kanäle sind in vielen Geweben exprimiert, wo sie von intrazellulärem ATP inhibiert werden und so das Membranpotential an den metabolischen Zustand koppeln. So sind sie beispielsweise wichtig für die Regulation der Insulinsekretion von pankreatischen β -Zellen [DUNNE und PETERSEN 1986, NICHOLS 2006]. Die SUR1 β -Untereinheiten sind essentiell für die Plasmamembranexpression. Nach Bindung mas-

kiert sie ein ER-Retentionssignal im C-Terminus von Kir6.2. Hierdurch wird sichergestellt, dass nur vollständig assemblierte Kanalkomplexe die Plasmamembran erreichen [ZERANGUE et al. 1999].

Eine Besonderheit stellt die Bindung der β -Untereinheiten SCNB2 und SCNB4 an Natriumkanäle dar. Hier führt die Ausbildung von Disulphidbrücken zwischen α - und β -Untereinheiten zu einem kovalent verknüpften, permanenten Komplex [YU et al. 2003].

Aus dieser Übersicht wird ersichtlich, dass sowohl zytoplasmatische, als auch Transmembranproteine eine β -Untereinheit für Ionenkanäle bilden können. Meist handelt es sich um eine Genfamilie, innerhalb derer konservierte Sequenzabschnitte eine Spezifität in der Zusammenstellung der Komplexe aus verschiedenen Untereinheiten gewährleisten. Die beschriebene Funktionsweise der β -Untereinheit lässt sich grob in zwei Bereiche gliedern: (I) Regulation der Expression und (II) Regulation der Kanaleigenschaften. (I) Die Regulation der Expression umfasst Vorgänge wie die kotranslationale Stabilisierung, Förderung des ER-Exportes durch Maskierung von Retentionssignalen, Vermittlung zusätzlicher Bindung an Adapterkomplexe oder eine Regulation der Internalisierung und des Abbaus. (II) Die Regulation der Eigenschaften kann über einen direkten Einfluss auf die Pore der α -Untereinheit oder über das Vermitteln weiterer Modifikationsmöglichkeiten durch Phosphorylierung, Ligandenbindung oder Bindung weiterer regulatorischer Proteine erfolgen.

Ob die hier identifizierte β -Untereinheit *Ostm1* die physikalischen Transporteigenschaften von *ClC-7* modifiziert, verbleibt Gegenstand der Untersuchung, da es bisher nicht möglich war *ClC-7* elektrophysiologisch zu charakterisieren. *Ostm1* scheint zudem keinen unmittelbaren Einfluss auf die Expression und Zielsteuerung von *ClC-7*, wie er hier für einige andere β -Untereinheiten exemplarisch beschrieben wurde, zu haben. Umgekehrt ist die α -Untereinheit *ClC-7* für die Zielsteuerung der β -Untereinheit *Ostm1* essentiell.

Ostm1 kann dennoch als essentielle β -Untereinheit von *ClC-7* bezeichnet werden, da es dessen Stabilität und Funktionalität im Zielkompartiment, dem Lysosom, sicherstellt. Weitere regulatorische Funktionen können nicht ausgeschlossen werden.

4.2.5 Vergleich mit *ClC-K/Barttin*

Die zu 90% homologen Chloridkanäle *ClC-Ka* und *ClC-Kb* sind in der basolateralen Membran von Nierentubuli und den kaliumsezenierenden Epithelien des Innenohres exprimiert. Mit *Barttin* konnte 2001 die erste β -Untereinheit von *CLC*-Proteinen identifiziert

werden [ESTÉVEZ et al. 2001]. Sowohl CIC-Ka, als auch CIC-Kb benötigen Barttin für den effizienten Transport an die Plasmamembran. Möglicherweise wird die Oberflächenexpression der Kanäle durch ein PY-Motiv oder ein tyrosinbasiertes Endozytosemotiv in Barttin reguliert [ESTÉVEZ et al. 2001]. An der Plasmamembran verändert Barttin die Ca^{2+} -Sensitivität [WALDEGGER et al. 2002] der CIC-K Kanäle. Zudem ist eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit sowie der Offenwahrscheinlichkeit der CIC-K Kanäle durch Barttin beschrieben worden [SCHOLL et al. 2006].

Tajima et al. postulieren, dass Barttin über den Transmembranbereich mit CIC-K Kanälen interagiert. Die Studie zeigt, dass die Transmembranhelices B und J, die am seitlichen Membraninterface des CIC-K2-Dimers liegen, sowie die beiden Transmembrandomänen von Barttin möglicherweise an einer Bindung beteiligt sind [TAJIMA et al. 2007]. Sie schließt ein außerhalb des Transmembranbereich liegendes Bindungsinterface jedoch nicht zweifelsfrei aus.

Barttin und Ostm1 weisen keine signifikante Sequenzhomologie auf. Auch die Transmembrantopologie weist deutliche Unterschiede auf. Barttin zeichnet sich durch zwei Transmembrandomänen sowie zytoplasmatische N- und C-Termini aus [BIRKENHÄGER et al. 2001, ESTÉVEZ et al. 2001]. Auch wenn ein Verlust bei beiden β -Untereinheiten zu einer stark reduzierten Expression ihrer α -Untereinheit am Funktionsort führt ist der zugrunde liegende Mechanismus verschieden. Barttin beeinflusst die Oberflächenexpression von CIC-K durch eine Beeinflussung des Transportes auf die Plasmamembran beziehungsweise eine Regulation der Internalisation. Ostm1 beeinflusst hingegen die Stabilität von CIC-7 im Lysosom. Während für Barttin eine aktive Regulierung der Expression der α -Untereinheit denkbar ist, erscheint dies für Ostm1 eher unwahrscheinlich.

Sollte sich bestätigen, dass sowohl Barttin, als auch Ostm1 über die Transmembrandomänen mit ihrer α -Untereinheit interagieren, so könnte dies ein konserviertes Schema für CLC-Proteine und ihre β -Untereinheiten darstellen, auch wenn beide β -Untereinheiten keine Homologie aufweisen. Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob β -Untereinheiten eine obligatorische Komponente im CLC-Transportkomplex sind, oder ob es sich bei CIC-K und CIC-7 um Ausnahmen handelt.

4.3 Funktionen des CIC-7/Ostm1-Komplexes

4.3.1 Einfluss von CIC-7/Ostm1 auf den lysosomalen pH

Die Zugehörigkeit zu der CLC-Familie legt nahe, dass es sich auch bei dem CIC-7/Ostm1-Komplex um einen Chloridkanal oder Transporter handelt. Die Lokalisation in Lysosomen legt einen Einfluss auf die lysosomale Chloridkonzentration und den lysosomalen pH nahe.

Zellen mit Defekten in CIC-7 oder Ostm1 zeigten lysosomales Speichermaterial, das wahrscheinlich auf eine beeinträchtigte Funktion von Lysosomen zurückzuführen ist. Für CIC-5 konnte eine Rolle bei der Ansäuerung von Endosomen [GÜNTHER et al. 2003] und für CIC-3 eine ähnliche Rolle in synaptischen Vesikeln [STOBRAWA et al. 2001] und Endosomen [HARA-CHIKUMA et al. 2005] gezeigt werden. Für CIC-7 Knock-out Mäuse wurde ein Ansäuerungsdefekt der Resorptionslakune von Osteoklasten beschrieben [KORNAK et al. 2001]. Erstaunlicherweise konnte jedoch weder in CIC-7 [KASPER et al. 2005], CIC-6 [POËT et al. 2006] noch in Ostm1 [diese Arbeit] defizienten Zellen eine Veränderung des lysosomalen pH gemessen werden.

Die Bestimmung des pH durch einen über mehrere Stunden endozytierten Farbstoff beschränkt sich auf den Gleichgewichtszustand. Dies bedeutet, dass CIC-7/Ostm1 durchaus die Hauptchloridleitfähigkeit im Lysosom darstellen kann, bei dessen Verlust die verbleibenden, kleinen Leitfähigkeiten jedoch ausreichen, um das von der H⁺-ATPase aufgebaute Potential langsam auszugleichen. Der Gleichgewichts-pH wäre damit, wie hier gemessen, unverändert, während die Ansäuerungsrate und der pH im naszierenden Lysosom vom WT-Niveau abweichen könnten. Diese Abweichung könnte insbesondere auf die Prozessierung von Proteasen einen entscheidenden Einfluss haben, der die Akkumulation von Speichermaterial erklären könnte.

Wie oben diskutiert, ist anzunehmen, dass es sich bei CIC-7 um einen Cl⁻/H⁺-Antiporter handelt. Dies erscheint auf den ersten Blick kontraproduktiv, da der für die Azidifizierung benötigte ATP Verbrauch größer ist. Ein Cl⁻/H⁺-Antiporter wäre jedoch in der Lage im Gleichgewichtszustand kontinuierlich Cl⁻ im Lumen zu akkumulieren, während ein Cl⁻-Kanal diesen Vorgang nur parallel zur aktiven Azidifizierung des Lysosoms unterstützen könnte. Unterstützt wird dies durch neue Ergebnisse, die zeigten, dass atClCa, ein Anionen-H⁺-Antiporter aus *Arabidopsis thaliana*, einen pH-Gradienten ausnutzt, um Nitrat in der Pflanzenvakuole zu akkumulieren [ANGELI et al. 2006]. Während für Endosomen eine CIC-3 abhängige Akkumulation von Cl⁻ beschrieben wurde

[SONAWANE et al. 2002, HARA-CHIKUMA et al. 2005] ist wenig über Konzentration und Funktion von lysosomalem Chlorid bekannt. Die Möglichkeit, dass nicht ein Anstieg des pH, sondern ein Abfall der luminalen Chloridkonzentration die Ursache für die lysosomale Dysfunktion bilden könnte, deutet eine bisher wenig beachtete Bedeutung von vesikulärem Chlorid an. So ist beispielsweise die Aktivität von Cathepsin C von Cl^- abhängig [CIGIC und PAIN 1999] und ein endosomaler Calciumkanal wird durch hohes luminales Cl^- inhibiert [SAITO et al. 2007].

4.3.2 Einfluss von *CIC-7/Ostm1* auf die Fellfarbe

Die *CIC-7* Knockout und die *grey-lethal* Maus können sowohl graues, als auch schwarzes Fell haben. Dieser Phänotyp wurde bisher praktisch nicht untersucht, zeigt jedoch interessante Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen auf.

Das zur Pigmentierung von Haut und Haaren eingelagerte Melanin wird in spezialisierten Kompartimenten, den Melanosomen, synthetisiert [SLOMINSKI et al. 2004]. Melanosomen sind spezialisierte Lysosomen der Melanozyten [ORLOW 1995] und können einen sauren pH von unter 5 aufweisen [BHATNAGAR et al. 1993]. Nach der Synthese wird das Melanin von den Melanozyten auf die Keratinozyten übertragen. Nach welchem Prinzip dieser Transfer funktioniert, ist weitestgehend unklar. Mögliche Mechanismen sind eine Melanosomenexozytose, gefolgt von einer Endozytose des Melanins durch die Keratinozyte. Ebenso wird eine Fusion von Melanozyte und Keratinozyte oder eine Phagozytose von Vesikeln beziehungsweise melanozytischen Dendriten durch die Keratinozyte diskutiert [BOSSCHE et al. 2006].

Melanin wird üblicherweise auf der Basis der Farbe und Löslichkeit in zwei große Gruppen unterteilt: das schwarze bis braune, unlösliche Eumelanin und das alkalilösliche Pheomelanin, das braun ist. Beide Gruppen sind jedoch recht heterogen in Bezug auf ihre Eigenschaften und Zusammensetzung. In einem Melanosom wird jeweils nur ein Pigmenttyp synthetisiert. Eumelanosomen sind große, elipsoide Organellen mit geordneter Proteinmatrix, während Pheomelanosomen runde Vesikel mit einer lockeren Ansammlung kleiner Granulä bilden [SLOMINSKI et al. 2004]. Die gleiche Melanozyte kann einen Melanosomentyp nach dem anderen bilden und somit beide Melaninformen in das Haar einlagern. Auf diese Weise wird die gebänderte *agouti*-Färbung erreicht [GALBRAITH 1964, SLOMINSKI et al. 2004].

Das Agoutiprotein wirkt während des Haarwachstums innerhalb des Haarfollikels und schaltet zwischen Eumelanin- und Pheomelaninsynthese um. In der Maus kodiert das

Agoutiprotein für ein 131-Aminosäuren langes Protein mit Signalpeptid. Das Transkript ist in den Papillarzellen und anderen Zellen der Haut, nicht aber in Melanozyten exprimiert. Rezessive *agouti*-Mutationen führen zu gänzlich schwarzem Fell, während dominante Mutationen zu einer gelben Fellfarbe führen [SLOMINSKI et al. 2004].

Der Pigmentierungsphänotyp der *grey-lethal* Maus wird einem Pheomelaninverlust zugeschrieben [BENNETT und LAMOREUX 2003]. Dies erklärt, dass schwarze *gl*-Mäuse, deren Haare ausschließlich Eumelanin aufweisen, weiterhin schwarz sind. Braunen *agouti*-Mäusen, deren Haare sowohl mit Eumelanin als auch mit Pheomelanin pigmentiert sind, fehlt bei CIC-7- oder Ostm1-Defizienz das braune Pheomelanin, so dass sie grau erscheinen. Für den Pheomelaninverlust lassen sich aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Funktion des CIC-7/Ostm1-Komplexes zwei molekulare Grundlagen postulieren. Zum einen kann es sich um einen Defekt im Transport des Pheomelanins von der Melanozyte zu der Keratinozyte handeln. Hier wäre eine Funktion des durch CIC-7/Ostm1 beeinflussten melanosomalen pHs oder Chlorids auf Prozesse wie Transport oder Exocytose des Pheomelanosoms oder Endozytose-/Phagozytoseprozesse in der Keratinozyte denkbar, da, wie beschrieben, ähnliche Prozesse von CLC-Proteinen abhängen. Es ist allerdings nur schwer vorstellbar, wie es hierbei zu einem selektiven Verlust des Pheomelanintransportes kommt, während die gleichen Prozesse für Eumelanin weiterhin ablaufen.

Alternativ kann ein direkter Einfluss auf die Synthese von Pheomelanin postuliert werden. Die Eu- und Pheomelaninsynthese beruht auf der Umsetzung von Tyrosin zu dem gemeinsamen Zwischenprodukt Dopaquinon durch die Aktivität der Tyrosinase [MARLES et al. 2003]. Eine hohe Aktivität der Tyrosinase scheint dabei zu einer Eumelaninsynthese zu führen, während geringe Tyrosinaseaktivität sowohl Eu- als auch Pheomelaninsynthese erlaubt [BURCHILL et al. 1989, HUNT et al. 1995]. Der wesentliche Regulationsmechanismus für die Umschaltung von Eu- zu Pheomelaninsynthese beruht möglicherweise auf der Inhibierung der Gluthationreduktase, die zur Pheomelaninsynthese benötigtes Glutathion bereitstellt. Die Gluthationreduktase wird durch Dopaquinon, dem Produkt der Tyrosinase, inhibiert (siehe Abb. 4.3). Eine hohe Tyrosinase Aktivität und somit eine hohe Eumelanogenese führt somit zu einer Inhibierung der Pheomelanogenese [ØYEHAUG et al. 2002]. Die Aktivität der Tyrosinase ist pH-abhängig, wobei strittig ist, ob ihr Optimum bei neutralem [HEARING und EKEL 1976, TOWNSEND et al. 1984, SAEKI und OIKAWA 1985] oder saurem [DEVI et al. 1987] pH liegt. Bei neutralem pH scheint die Tyrosinase jedoch durch physiologische Tyrosinkonzentrationen allosterisch inhibiert zu werden. Die hierzu vorliegenden Daten sind wenig überzeugend, deuten

aber an, dass eine Regulation der Tyrosinase und der Pheomelaninsynthese über den pH [ANCANS et al. 2001] und damit in Abhängigkeit von CIC-7/Ostm1 möglich sein könnte.

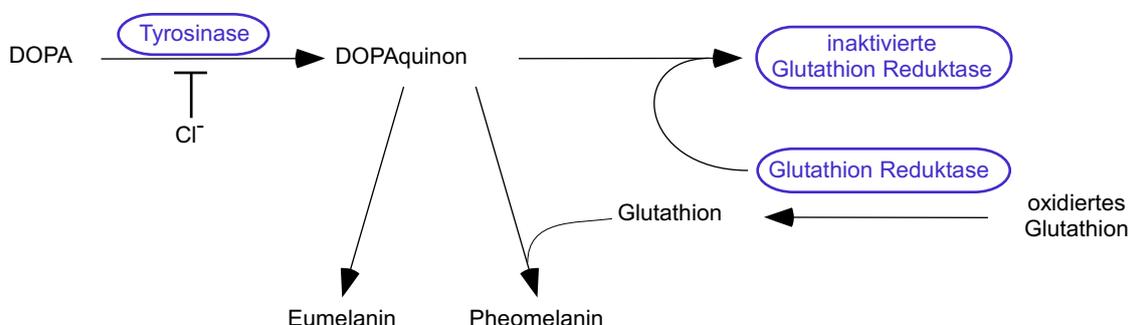


Abbildung 4.3: Inhibition der Pheomelaninsynthese

DOPAquinon ist ein gemeinsames Zwischenprodukt der Eu- und Pheomelaninsynthese. Die Pheomelaninsynthese wird durch Einbau von Thiolen, im wesentlichen reduziertes Glutathion, welches durch die Glutathion Reduktase bereitgestellt wird, initiiert. Die Glutathion Reduktase wird durch hohe Konzentrationen DOPAquinon inaktiviert. Die DOPAquinon-Konzentration wird durch die Aktivität der Tyrosinase bestimmt. Chlorid reduziert durch teilweise Inhibition der Tyrosinaseaktivität die DOPAquinon-Konzentration und ermöglicht damit die Pheomelaninsynthese. Modifiziert nach [ØYEHAUG et al. 2002].

Interessanterweise wird die Tyrosinase möglicherweise auch durch Chlorid inhibiert [HAN et al. 2007, PARK et al. 2005]. Die Gruppe von Omholt postulierte auf Grundlage einer Modellierung der Melaninsynthese, dass bereits kleine Veränderungen der Tyrosinaseaktivität ausreichen können, um zwischen Eu- und Pheomelanogenese zu wechseln. Dies ist mit einer unvollständigen Inhibition durch Chlorid im physiologischen Bereich kompatibel [HAN et al. 2007]. Hierauf basierend ließe sich ein interessantes Modell der Regulierung der Pheomelanogenese durch den CIC-7/Ostm1-Chloridtransporter-Komplex postulieren (Abb. 4.4 a). Die nötige Regulierung des CIC-7/Ostm1-Komplexes könnte hierbei innerhalb des Agouti-Protein-abhängigen Signalweges erfolgen. In schwarzen Wildtypmäusen ist CIC-7/Ostm1 möglicherweise über einen *agouti*-abhängigen Mechanismus inhibiert wodurch keine CIC-7/Ostm1 vermittelte Akkumulation von Cl⁻ in den Melanosomen erfolgt. Die Aktivität der Tyrosinase ist aufgrund der niedrigen Chloridkonzentration hoch, wodurch die Pheomelaninsynthese blockiert ist. Es wird nur schwarzes Eumelanin produziert (Abb. 4.4 b). In CIC-7 Knock-out oder *grey-lethal* Mäusen fehlt der CIC-7/Ostm1 Komplex. Ein möglicher Einfluß des CIC-7/Ostm1 Komplexes auf den lysosomalen pH wird hier außer Acht gelassen. Auch

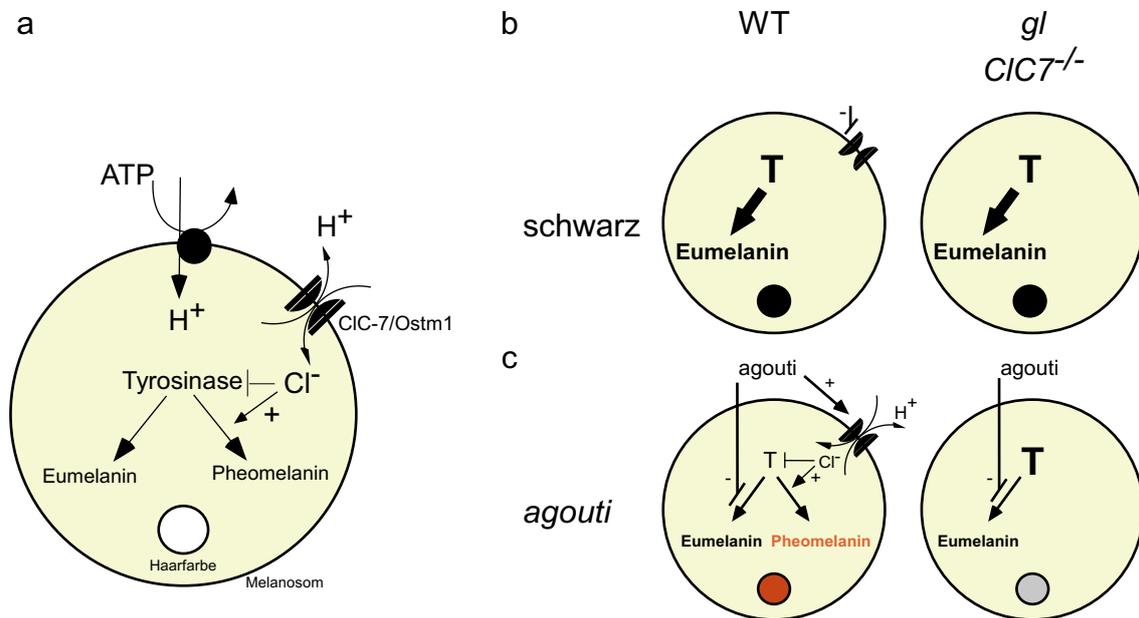


Abbildung 4.4: Modell zur Regulation der Melaninproduktion durch CIC-7/Ostm1

a) Schema eines Melanosoms. Die H⁺-ATPase sowie ein Cl⁻/H⁺-Antiporter (hier CIC-7/Ostm1) erlauben die Regulation von luminalem pH und Cl⁻. In einem Melanosom wird jeweils entweder Eumelanin oder Pheomelanin synthetisiert. Beide Synthesewege sind hier zwecks Vereinfachung in einem Melanosom schematisch nebeneinander dargestellt. Die Haarfarbe ergibt sich aus der sequentiellen Ablagerung des Melanins aus Eu- und Pheomelanosomen in den Haaren. Die Aktivität der Tyrosinase (T) bestimmt ob und wie viel des jeweiligen Melanins synthetisiert wird. Luminales Cl⁻ reduziert die Tyrosinaseaktivität. b) In schwarzen Wildtypmäusen werden nur Eumelanosomen gebildet. CIC-7/Ostm1 ist nicht aktiv und die luminaire Chloridkonzentration niedrig. Die Tyrosinaseaktivität (T) ist hoch was eine starke Eumelaninsynthese und schwarzes Fell zur Folge hat. Da CIC-7/Ostm1 nicht aktiv ist, zeigt sich in *Cln7^{-/-}*- oder *gl*-Melanosomen kein Phänotyp. c) In *agouti*-Wildtypmäusen wird über die *agouti*-Signalkaskade die Bildung von Eumelanin reduziert und die Bildung von Pheomelanosomen induziert. CIC-7/Ostm1 ist aktiviert wodurch die luminaire Chloridkonzentration ansteigt. Die Tyrosinaseaktivität (T) wird durch Chlorid reduziert. In Pheomelanosomen erlaubt die reduzierte Tyrosinaseaktivität die Synthese von Pheomelanin. Die Einlagerung von wenig Eumelanin und Pheomelanin führt zu einer braun Fellfarbe. In *Cln7^{-/-}*- oder *gl*-Mäusen kann die Chloridkonzentration nicht erhöht werden. Die Pheomelaninsynthese bleibt dadurch inaktiviert. Das Fell erscheint aufgrund der fehlenden Pheomelanineinlagerung und der im *agouti*-Hintergrund reduzierten Eumelaninbildung grau.

die defizienten Mäuse haben schwarzes Fell, da der Komplex in Wildtypmäusen keine regulatorische Funktion für den Prozess hat und so weiterhin Eumelanin produziert wird (Abb. 4.4 b). In *agouti*-Wildtypmäusen wird die Produktion von Eumelanin durch einen Agoutiprotein-abhängigen Prozess reduziert. Gleichzeitig wird der ClC-7/Ostm1-Komplex so reguliert, dass es zu einer verstärkten Akkumulation von Cl⁻ in dem Melanosom kommt. Die Tyrosinase wird durch den Chloridanstieg teilweise inhibiert, was zu einer Aktivierung der Pheomelaninsynthese führt. Die Haare enthalten beide Melanintypen und erscheinen rötlich-braun (Abb. 4.4 c). Fehlt der ClC-7/Ostm1-Komplex in ClC-7 Knockout oder *gl*-Mäusen, kommt es weiterhin zu einer Reduktion der Eumelaninproduktion durch das Agoutiprotein. Da es jedoch nicht zu einem ClC-7/Ostm1-vermittelten Cl⁻-Anstieg und folgender Reduzierung der Tyrosinaseaktivität kommt, kann kein Pheomelanin synthetisiert werden. In den Haaren fehlt das rötliche Pheomelanin, so dass sie grau erscheinen (Abb. 4.4 c).

Dieses Modell beschreibt einen Mechanismus, in dem ein CLC-Protein eine regulatorische Funktion über den Cl⁻-Transport ausübt und geht damit über die einfache Bereitstellung eines Ladungsausgleiches für die Ansäuerung hinaus. Die Daten, auf denen diese putative Funktion beruht, sind teilweise von unzureichender Qualität. Aus dem Modell können jedoch neue Versuchsansätze abgeleitet werden, um die Funktion ClC-7/Ostm1 als Cl⁻-Transportkomplex näher zu untersuchen.

4.3.3 Neuronale Defekte

Mit der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal ein schwerer Phänotyp im Zentralnervensystem der seit 1936 bekannten osteopetrotischen *grey-lethal* Maus gezeigt werden. Neuronen akkumulieren im perinukleären Bereich über die Zeit lysosomales Speicher-material, das Charakteristika neuronaler Ceroid-Lipofuscinosen trägt. Dies führt zu einer Degeneration von Neuronen, die in der CA3-Region des Hippocampus besonders stark ausgeprägt ist.

Lysosomale Speicherkrankheiten entstehen durch genetische Veränderung lysosomaler Prozesse und äußern sich in der unnatürlichen Akkumulation von ungespaltenen Lipoproteinen [BAHR und BENDISKE 2002]. Neuronale Ceroid Lipofuscinosen (NCL), allgemein auch Batten-Krankheit genannt, sind die häufigste neurodegenerative Erkrankung im Kindesalter [HALTIA 2003]. Sie bilden eine heterogene Gruppe erblicher, neurodegenerativer Krankheiten, die durch die Akkumulation von autofluoreszentem Speicher-material in Nerven und anderen Zellen gekennzeichnet sind.

Die verschiedenen, meist autosomal rezessiv vererbten Subtypen, weisen einen zeitlich variablen Ausbruch der Krankheit und einen vielfältigen, durch progressiven psychomotorischen Abbau, Blindheit, epileptische Krämpfe und vorzeitigen Tod gekennzeichneten klinischen Verlauf auf. Sie zeigen jedoch alle das gemeinsame histopathologische Charakteristikum des gespeicherten Materials. Der Ablagerungsprozess geht mit fortschreitendem, selektivem Verlust von Neuronen und Gliazellen und sekundärer Schädigung der weißen Substanz einher [HALTIA 2006]. Defekte in wenigstens 7 Genen konnten bisher als Ursache für die verschiedenen Formen der NCL beschrieben werden [SIINTOLA et al. 2006].

Neben CIC-6 [POËT et al. 2006] wurde auch in CIC-7-defizienten Mäusen [KASPER et al. 2005] für NCL charakteristisches Speichermaterial in Neuronen nachgewiesen. In CIC-3 defizienten Mäusen, die ebenfalls NCL-ähnliche Eigenschaften aufweisen sollen [YOSHIKAWA et al. 2002], kommt es hingegen nicht zu einer Akkumulation von Speichermaterial [KASPER et al. 2005].

Wie hier beschrieben akkumulieren *grey-lethal* Mäuse ebenfalls lysosomales Speichermaterial in Neuronen des zentralen Nervensystems und anderen Zellen, wie etwa den Zellen des proximalen Tubulus der Niere. Das Speichermaterial weist die gleichen Charakteristika auf, wie die schon zuvor in CIC-7 Knockout Mäusen beobachteten Ablagerungen [KASPER et al. 2005].

Inzwischen wurden auch in Patienten, die an *OSTM1*-abhängiger ARO (autosomal rezessiver Osteopetrose) erkrankt sind, erstmals neurologische Symptome beschrieben [PANGRAZIO et al. 2006, SOURATY et al. 2007]. Die auffälligsten neurologischen Symptome sind eine starke cerebrale Atrophie, reduzierte Myelinisierung sowie eine Dystrophie der Retina. Diese Beobachtungen legten eine Klassifizierung als NCL nahe. Durch Elektroencephalographie, elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie Messung lysosomaler Enzyme wurde eine Einordnung als klassische NCL jedoch in Frage gestellt [PANGRAZIO et al. 2006].

Alle bisher bekannten *OSTM1*-ARO Patienten starben unabhängig von einer Knochenmarktransplantation sehr früh [PANGRAZIO et al. 2006, SOURATY et al. 2007, MARANDA et al. 2007]. Es ist schon länger bekannt, dass neurologische Defekte nicht durch eine Knochenmarktransplantation geheilt werden können [GERRITSEN et al. 1994a]. Eine Knochenmarktransplantation stellt somit für *OSTM1*-ARO Patienten ebensowenig eine vielversprechende Behandlung dar, wie für *CICN7*-ARO Patienten [FRATTINI et al. 2003, KASPER et al. 2005]. Die teilweise verbleibende

und schwer zu vorherzusagende CIC-7-Restaktivität erschwert jedoch eine Aussage über die Schwere der neuronalen Beeinträchtigung und somit das Treffen einer Behandlungsempfehlung.

4.3.4 *grey-lethal*, nur eine Kopie der CIC-7 Knockout Maus?

Durch die Dimerstruktur der CLC-Proteine ist zu erwarten, dass es selbst bei schwersten dominant-negativen Mutationen im heterozygoten Zustand kaum zu einer Reduktion der Funktion auf unter 25 % kommt. Dies ist verglichen mit den bei dominanten Mutationen in tetrameren K⁺-Kanälen zu erwartenden 6 % erstaunlich mild. Dieser moderate Effekt dominant-negativer Mutationen in CLC-Proteinen erklärt, dass dominante Osteopetrose allgemein weniger schwer ist, als die rezessiven Varianten, in denen beide Allele mutiert sind, und es so zu einem Totalverlust kommt [CLEIREN et al. 2001, KORNAK et al. 2001].

Die Beobachtung, dass bereits eine Reduktion der CIC-7 Funktion auf 25 % ausreicht, um einen osteopetrotischen Phänotyp zu verursachen, lässt den Schluss zu, dass der Phänotyp wie auch die Erkrankung beim Menschen vollständig durch die Reduktion von CIC-7 auf unter 10 % zu erklären ist. Dennoch stellt sich die Frage, ob *Ostm1* neben der Interaktion mit CIC-7 weitere Funktionen ausübt. Der schwere Osteopetrosephänotyp überdeckt möglicherweise schwächere Phänotypen, in denen sich die *grey-lethal* von der CIC-7 Knockout Maus unterscheiden könnte. Ebenso könnten Mutationen, die nicht zu einem Verlust von *Ostm1* oder einer Interaktion mit CIC-7, sondern nur zu einem Verlust etwa des konservierten C-Terminus von *Ostm1* führen, weitere Einblicke in die Funktion und Regulation von *Ostm1* ermöglichen. Sollte sich beispielsweise herausstellen, dass der N-terminus von *Ostm1* eine Signalpeptidfunktion auf Osteoblasten ausübt, so könnten Mutationen in diesem zu einem Verlust dieses Signalweges bei gleichbleibend normaler Knochenresorption kommen.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte mit der Identifikation einer essentiellen Interaktion zwischen *Ostm1* und CIC-7 das Verständnis der molekularen Grundlagen von Krankheiten, die auf Mutationen in *OSTM1* zurückzuführen sind, erweitert werden. Gleichzeitig haben die Ergebnisse neue Fragen und Lösungsansätze aufgezeigt.

CIC-7/*Ostm1* hat keinen Einfluß auf den lysosomalen pH im Gleichgewicht. Dies lässt einen Einfluss auf die Ansäuerungskinetik weiter in den Fokus rücken. Zudem wird

durch die Beobachtung, dass es sich bei CIC-4 und -5 um Cl^-/H^+ -Antiporter handelt [SCHEEL et al. 2005], neben dem pH die lysosomale Chloridkonzentration stärker in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Auch eine mögliche regulatorische Rolle von Chlorid unter Beteiligung von CIC-7/Ostm1 in der Melaninsynthese legt nahe, dass nicht nur der pH, sondern im gleichen Maße die Chloridkonzentration von Vesikeln eine herausragende Rolle spielen könnte.

Die nähere Untersuchung des Pigmentierungsphänotyps bietet zudem die Möglichkeit, die Melaninproduktion als weiteres Detektionssystem für vesikuläre Chlorid- und pH-Veränderungen zu nutzen. Hierfür wären jedoch eine Vielzahl grundlegender Experimente nötig, um das melanosomale System genauer zu charakterisieren, bevor Rückschlüsse auf die Funktionsweise von CIC-7/Ostm1 gezogen werden können. Daneben bietet die Melanozyte möglicherweise auch die Möglichkeit, einen Einfluss von CIC-7/Ostm1 auf die Motilität von Vesikeln, in diesem Fall Melanosomen, zu studieren. Ein in Melanozyten beobachteter Transport- oder Exocytosedefekt von Melanosomen in CIC-7 Knockout - Zellen könnte Rückschlüsse auf die Ursachen für die Unterentwicklung der *ruffled border* in Osteoklasten erlauben. Falls Melanosomen ein CIC-7/Ostm1-positives Kompartiment darstellen, das möglicherweise zur Exozytose fähig ist, könnte das Melanozytensystem nicht zuletzt die Möglichkeit einer Plasmamembranlokalisation von CIC-7 bieten. Dies würde CIC-7/Ostm1 erstmals einer elektrophysiologischen Charakterisierung zugänglich machen.

Die Identifizierung einer spezifischen β -Untereinheit von CIC-7 ermöglicht zudem die gezielte Suche nach einer ganz neuen Klasse von Inhibitoren für den Komplex. Bisher ist es nicht gelungen spezifische CLC-Inhibitoren zu identifizieren. Substanzen, die eine Bindung von CIC-7 und Ostm1 behindern, würden mit großer Wahrscheinlichkeit spezifisch die Aktivität CIC-7 inhibieren. Solche Substanzen könnten Ansätze für eine Therapie der Osteoporose bieten, bei der zuwenig Knochen produziert wird. Eine reduzierte CIC-7 Stabilität durch teilweise Blockierung der Interaktion mit Ostm1 könnte eine Reduzierung der Knochenresorption und damit ein Wiederherstellen normaler Knochendichte erlauben. Problematisch bleibt bei einem solchen Ansatz jedoch die ubiquitäre Verbreitung des CIC-7/Ostm1-Komplexes. Um ungewollte Nebeneffekte, wie Degeneration von Neuronen, auszuschließen müsste ein solcher Wirkstoff demnach sehr gewebespezifisch eingesetzt werden. Wie das klinische Bild von Patienten mit dominant-negativen Mutationen in CIC-7 (ADO-II) zeigt, besteht jedoch auch eine gewisse Möglichkeit, dass eine ubiquitäre, moderate Reduzierung der CIC-7-Aktivität keine oder nur schwache Auswirkungen

außerhalb von Osteoklasten mit sich bringt jedoch für eine Milderung einer Osteoporose ausreicht.

Schließlich bietet Ostm1 als neuer Baustein im CLC-7/Ostm1-Chloridtransportkomplex neue Ansatzmöglichkeiten, um nach möglichen regulatorischen und modulatorischen Effekten für den Komplex zu suchen. Insbesondere der kurze C-Terminus von Ostm1, der durch seine absolute Konserviertheit zwischen Maus und Mensch auffällt, stellt einen interessanten Ansatzpunkt für die Suche nach weiteren Bindungspartnern und regulatorischen Proteinen dar. Hefe-2-Hybrid sowie *GST-Pulldown* und Koimmunopräzipitationsexperimente mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der Bindungspartner versprechen bei einem solch kurzen Peptid gute, hochspezifische Ergebnisse.

Nicht zuletzt stellt sich mit der Identifikation von Ostm1 als zweiter β -Untereinheit eines CLC-Proteins natürlich die Frage, ob eine solche β -Untereinheit für CLC-Proteine obligatorisch ist. Zumindest scheint es für CLC-Proteine keine β -Untereinheit-Familie zu geben, wie dies für viele andere Ionenkanäle der Fall ist. Weitere Versuche zur Identifikation möglicher Untereinheiten der übrigen Mitglieder der CLC-Familie sind somit notwendig und vielversprechend.