

## 6 Danksagung

Nach mehr als fünf Jahren in der Arbeitsgruppe bin ich so vielen gegenüber zu Dank verpflichtet, dass ich am besten chronologisch vorgehe.

Zuerst möchte ich mich natürlich bei Thomas dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, an diesem Projekt zu arbeiten. Seine unerschöpfliche Begeisterung für molekulare physiologische Zusammenhänge war und ist immer noch sehr motivierend. Ohne seine stetige Unterstützung wären auch meine Eskapaden in medizinischen Gefilden nicht denkbar gewesen.

Ich hoffe Herrn Prof. F. Hucho, der mich vor zu weiten Ausflügen in die Medizin gewarnt hatte, mit dieser Arbeit überzeugen zu können, dass diese Abwege für viele Anregungen, speziell bei der Arbeit am Tiermodell einer humanen Erkrankung gut waren. Für seine Unterstützung vom ersten Tag des Studiums bis nun zur Promotion bin ich ihm sehr dankbar.

Verspätet aber dennoch möchte ich mich bei Michael Bösl für die Einführung in die transgene Technologie bedanken.

Silke, die durch ihre Pionierarbeit an CIC-7 den Weg für mein Promotionsprojekt ebnete, möchte ich für die (nachdem der erste Schock überwunden war) gute Zusammenarbeit danken.

Als goldrichtig bewies sich Dagmars Entscheidung, an CIC-7 forschen zu wollen. Ihre immense zellbiologische Expertise war genau das fehlende Bindeglied für das CIC-7-Projekt, das sonst wahrscheinlich eher im Schneckentempo vorangeschritten wäre. Ganz nebenbei habe ich dabei sehr viel gelernt. Für die weitere Arbeit an den zahnlosen Genossen wünsche ich ihr viel Erfolg.

Ohne Gudruns Unterstützung wäre ich in den letzten beiden Jahren wohl völlig aufgeschmissen gewesen. Ihre ruhige Sachkenntnis und ihr Interesse hat mich immer sehr gefreut. Wie tristlos wird es sein, wenn ich nun wieder an die Bench zurückkehre und alles alleine machen muss! Aber behaarte Schweineohren haben auch ihren Reiz, das kann ich verstehen.

Der ständige Austausch mit Nils, sei es über Fragen der Nierenfunktion oder der besten MP3 aus den verschiedensten Stilrichtungen, hat mir immer viel Spass gemacht.

Ohne Valentin wäre ich nie auf die Idee gekommen, dieses praktische  $\LaTeX$  für meine Diss zu verwenden. Die Adresse vstein@zmnh.uni-hamburg.de verhinderte mehr als einmal, dass ich meinen Computer mit einem Vorschlaghammer bearbeitete.

Herrn Prof. Delling herzlichen Dank für die nette Zusammenarbeit mit einem histologischen Laien wie mir. Ich hoffe, dass wir diese noch weiter fortsetzen können.

Last but not least möchte ich mich bei Christian Kubisch für die konzeptionelle Un-

terstützung und das kritische Lesen meiner Dissertation bedanken. Es wäre mir ohne ihn weit weniger gelungen, bei der rasanten Entwicklung des Projekts den Überblick zu behalten und brauchbare Ideen zu entwickeln.

Allen anderen Mitgliedern der AG Jentsch möchte ich für die nette Zusammenarbeit ebenfalls meinen Dank aussprechen.

## 7 Kooperationen

Die vorliegende Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit folgenden Personen und Einrichtungen durchgeführt:

1. Bestimmung von Blut- und Urinparametern: Prof. Wagener, Abteilung für Klinische Chemie, Universität Hamburg.
2. Methacrylatschnitte von Knochengewebe und Micro-CT: Prof. G. Delling, Abteilung für Osteopathologie, Pathologisches Institut, Universität Hamburg.
3. Elektronenmikroskopie und Semidünnschnitte: Dr. M. Schweizer, ZMNH, Universität Hamburg.
4. *in situ* Hybridisierung: Dr. S. Fehr, ZMNH, Universität Hamburg.
5. Osteoklastenkultur und Pit-Assay: Dr. D. Kasper, ZMNH, Universität Hamburg.
6. Endozytoseexperimente: N. Piwon, ZMNH, Universität Hamburg.
7. Immunhistologie, Genotypisierung und Paraffinschnitte: Gudrun Weets, ZMNH, Universität Hamburg.
8. Patientenerhebung und Gewinnung von Fibroblastenkulturen: Dr. A. Schulz, Universitätskinderklinik, Universität Ulm.
9. Injektion von ES-Zellen und Transfer von Blastozysten: A. Härri, Firma BRL, Füllinsdorf, Schweiz.



## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden nach Rücksprache mit dem Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie in folgender Publikation veröffentlicht:

Uwe Kornak, Dagmar Kasper, Michael R. Bösl, Edelgard Kaiser, Michaela Schweizer, Ansgar Schulz, Wilhelm Friedrich, Günter Delling and Thomas J. Jentsch (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104: 205-215



## 9 Lebenslauf

Ich, Uwe Kornak, wurde am 07.05.1969 in Hilden geboren. In Ratingen-Hösel besuchte ich die Grundschule von 1975 bis 1979 und wechselte dann auf das Theodor-Heuss-Gymnasium in Ratingen, das ich 1988 mit dem Abitur abschloss.

Von 1988 bis zum Beginn meines Biochemiestudiums an der Freien Universität Berlin im Frühjahr 1990 leistete ich Zivildienst in der Helen-Keller-Schule für Geistigbehinderte in Ratingen. 1991 begann ich ein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin und führte das Biochemiestudium als externer Student weiter. 1993 bestand ich das Vordiplom und 1994 die ärztliche Vorprüfung, gefolgt vom 1. Staatsexamen im Jahre 1995. In folgenden Forschungseinrichtungen führte ich freie wissenschaftliche Mitarbeit durch: Stoffwechselforschung der Hoechst AG, Dr. G. Müller; Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Mexico, Prof. M. Calcagno; MPI für Psychiatrie, Prof. Y. A. Barde; Institut für Neuropsychopharmakologie, FU Berlin, Dr. Wolffgramm.

Ebenfalls 1995 absolvierte ich die Diplomprüfung im Fach Biochemie und begann 1996 meine Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. T.J. Jentsch. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. F. Hucho betreut und beschäftigte sich mit der Aufklärung der genomischen Struktur und des Promoters des Gens *Clcn7*. Die Targeting-Vektoren zum Ausschalten des Gens wurden auf dieser Basis konstruiert (Gesamtnote: Mit Auszeichnung).

Seit November 1996 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. T.J. Jentsch tätig. Von 1997 an führte ich das Medizinstudium an der Universität Hamburg weiter. Im Frühjahr 2000 absolvierte ich das 2. Staatsexamen in diesem Fach.



# 10 Zusammenfassung

ClC-7 ist ein Chloridkanalprotein von bisher unbekannter Funktion. Zwei alternative Gentergeting-Strategien für die Ausschaltung von ClC-7 wurden angewandt, die zu den Linien C7A und C7B führten. In Knockout-Tieren von Linie C7A war kein ClC-7-Protein mehr nachweisbar. Durch Targeting-Vektor C7B hingegen wurde das *lacZ*-Gen von E. Coli als Reportergen im Leserahmen in Exon 7 des Gens *Clcn7* eingefügt. Auf diese Weise wurde unter Kontrolle des Promoters von *Clcn7* ein Fusionsprotein gebildet, das aus einem N-terminalen Fragment von ClC-7 und der vom *lacZ*-Gen kodierten  $\beta$ -Galaktosidase bestand. Die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase konnte für die Untersuchung der Gewebeverteilung von ClC-7 im Embryo eingesetzt werden. Es ergab sich ein breites Verteilungsmuster mit besonders hoher Expression in Osteoklasten, Dorsalganglien, Trigemininalganglion, Rückenmark, Gehirn und Auge. Diese Befunde wurden durch eine *in situ* Hybridisierung an Embryonenschnitten bestätigt.

Der Phänotyp der *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Tiere beider Linien unterschied sich nicht. Die Heterozygotie führte zu keinerlei pathologischen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Der Anteil von Knockout-Tieren aus Verpaarungen zweier heterozygoter Tiere war auf 15% reduziert, was für eine erhöhte postnatale Sterblichkeit sprach. Die überlebenden Knockout-Mäuse blieben ab dem Ende der ersten Lebenswoche im Wachstum zurück, und zeigten verkürzte, röntgenologisch abnorm dichte Röhrenknochen. Der Zahndurchbruch blieb aus. In der Histologie des Knochengewebes zeigten sich Charakteristika einer Marmorknochenkrankheit (Osteopetrose). Eine trotz vorhandener Osteoklasten entstehende Akkumulation von Knochenmaterial wies darauf hin, dass diese Zellen Knochen nicht resorbieren konnten. Aufgrund des Verschlusses der Markhöhle der Knochen entstand eine extramedulläre Blutbildung, die eine bei *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Mäusen auftretende Anämie und Milzvergrößerung erlärte. Die Lebenserwartung der Knockout-Tiere lag bei maximal 45 Tagen.

Gleichzeitig trat eine massive Neurodegeneration auf, die in der Retina zu einem Verlust der Photorezeptoren und im Gehirn zu einer fortschreitenden Astroglie führte. Beide degenerativen Prozesse scheinen nicht sekundäre Folge der Osteopetrose zu sein. Im Gegensatz zu den von der Degeneration betroffenen retinalen Zellen konnte in Neuronen des Gehirns die intrazelluläre Ablagerung eines Lipofuszin-artigen Speichermaterials nachgewiesen werden.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation in den weitgehend normal differenzierten Osteoklasten ergab, dass sich ClC-7 in der Ruffled Border Membran dieser Zellen befand. Diese stark gefaltete Membran ist für die Säuresekretion verantwortlich, die für die resorptive Aktivität der Osteoklasten Voraussetzung ist. Die Analyse kultivierter Osteoklasten zeigte, dass

*Clcn7*<sup>-/-</sup>-Zellen nicht in der Lage waren, die extrazelluläre Resorptionslakune anzusäuern. Im proximalen Tubulus der Niere wurde darüber hinaus durch Kolo-kalisation mit intrazellulären Markern und endozytiertem, fluoreszenzmarkiertem Protein eine subzelluläre Lokalisation von ClC-7 in späten Endosomen und Lysosomen festgestellt.

Da der Phänotyp der *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Tiere dem Bild der menschlichen infantilen malignen Osteopetrose sehr ähnelte, wurde das Gen *CLCN7* in 12 Fällen dieser Erkrankung auf Mutationen durchsucht. Ein Patient war compound-heterozygot für eine Missense-Mutation und eine Stopmutation. In Proteinlysaten von kultivierten Fibroblasten des Patienten war ClC-7 nicht detektierbar.

Nach den bisherigen Erkenntnissen handelt es sich bei ClC-7 um ein in späten Endosomen, Lysosomen und in der Ruffled Border Membran befindliches Chloridkanalprotein. Wahrscheinlich ist ClC-7 für den Transport von Cl<sup>-</sup> entlang des durch die H<sup>+</sup>-ATPase erzeugten Protonengradienten verantwortlich, was die elektroneutrale Ansäuerung der betreffenden Kompartimente ermöglicht. Ohne intakte Ansäuerung verlieren einerseits die Osteoklasten ihre Resorptionsfähigkeit, andererseits kommt es vermutlich aufgrund eines defekten lysosomalen Abbaus zu intrazellulären Ablagerungen und zur Schädigung von neuronalen Zellen in Retina und Gehirn.

## 11 Abstract

ClC-7 is a ubiquitously expressed chloride channel whose function was unknown so far. Mice deficient for ClC-7 were generated using two different gene targeting strategies. Whereas targeting construct C7A abolished expression of ClC-7 completely, the *lacZ* gene was fused in frame into exon 7 of *Clcn7* as a reporter gene in construct C7B. Using the reporter gene to assess the expression pattern of ClC-7, we detected strong signals in osteoclasts, dorsal root ganglia, trigeminal ganglion, retina, spinal cord and brain beside a ubiquitous basal expression level. These findings were corroborated by *in situ* hybridization. *Clcn7*<sup>-/-</sup> mice of both knockout-strains show the same severe osteopetrosis (marble bone disease) that becomes apparent shortly after birth, leading to an increased early postnatal lethality. Life expectancy of the surviving animals was reduced to maximal 45 days. Those mice were anemic and much smaller than wildtype mice.

Additionally, there was progressive neurodegeneration in the retina and the brain. It could be excluded that this degeneration was secondary to osteopetrotic changes in *Clcn7*<sup>-/-</sup> mice. An accumulation of a lipofuscine-like material was detected in cerebral neurons, whereas no such material could be seen in the retina.

Although osteoclasts are present in normal numbers, they fail to resorb bone because they cannot acidify the extracellular resorption lacuna. In osteoclasts, ClC-7 is highly expressed in the ruffled membrane that is formed by the fusion of H<sup>+</sup>-ATPase containing vesicles and that secretes protons into the lacuna. In the proximal tubule of the kidney ClC-7 probably resides in late endosomes and lysosomes.

The murine phenotype closely resembles human infantile malignant osteopetrosis. Therefore, in 12 patients suffering from this disease a screening for mutations in the human gene, *CLCN7*, was performed. One patient was compound heterozygous for a nonsense and a missense mutation. These mutations lead to a complete loss of the ClC-7 protein from cultured fibroblasts of the patient.

It is concluded that ClC-7 provides the chloride conductance required for an efficient proton pumping by the H<sup>+</sup>-ATPase of the osteoclast ruffled membrane. The insufficient acidification in *Clcn7*<sup>-/-</sup> mice therefore prevents bone resorption. A similar acidification defect in lysosomal compartments may cause neuronal storage because of decreased degradation.