

1 Einleitung

1.1 Elektrische Erregbarkeit und Ionenkanäle

Das Konzept, dass elektrische Ströme mit zellulärer Aktivität verknüpft sein können, wurde zunächst für erregbare Gewebe akzeptiert. Bereits im 19. Jahrhundert untersuchten Fritsch und Hitzig die Möglichkeit, durch elektrische Reizung des motorischen Cortex Bewegungen hervorzurufen (Fritsch und Hitzig, 1870). Um die gleiche Zeit entwickelte Einthoven das Elektrokardiogramm. Die zellulären Mechanismen, die hinter den von Herz, Muskeln oder Gehirn ableitbaren Potentialen standen, wurden jedoch erst Jahrzehnte später verstanden. Einen wesentlichen Schritt stellten Untersuchungen am Riesenaxon des Tintenfisches von Hodgkin und Huxley dar. Sie konnten in diesem System die Rolle von Natrium- und Kaliumströmen bei der Entstehung des Aktionspotentials aufdecken und somit einen entscheidenden Hinweis auf die Existenz von Ionenkanälen liefern (Hodgkin et al., 1949). Durch die Entwicklung der Patch Clamp- und Voltage Clamp-Techniken durch Sakman und Neher konnten elektrophysiologische Messungen auf beliebige Einzelzellen oder Teile ihrer Zellmembran ausgedehnt werden (Neher und Sakmann, 1976). Die Folge war nicht nur, dass durch Messungen von Einzelkanälen nun unmittelbar das Verhalten von Ionenkanälen studiert werden konnte, sondern auch die Erkenntnis, dass Ionenkanäle auch in Zellen nicht erregbarer Gewebe wichtige physiologische Funktionen ausüben. Ihr Vorkommen ist dabei nicht auf die Plasmamembran beschränkt, sondern es konnte eine wachsende Zahl von Kanalproteinen in intrazellulären Kompartimenten entdeckt werden (Szewczyk, 1998). Auf die genaue elektrophysiologische Charakterisierung der Ströme folgte schließlich die Identifikation einer großen Zahl der für sie verantwortlichen Kanalproteine und der zugehörigen Gene. Dies wiederum bildete die Basis für die Entdeckung, dass Veränderungen der Funktion von Ionenkanälen durch Mutationen erbliche Erkrankungen hervorrufen können, die auch als Ionenkanalkrankheiten („Channelopathies“) bezeichnet werden (Übersicht in: (Ashcroft, 2000)).

Ionenkanäle sind Membranproteine, die die Diffusion von Ionen durch die Lipiddoppelschicht entlang ihres elektrochemischen Gradienten ermöglichen und regulieren. Der Gradient entsteht aufgrund eines primär aktiven Transports von Protonen, Natrium-, Kalium- oder Kalziumionen durch ATPasen, wie beispielsweise der Natrium-/Kalium-ATPase der Zellmembran. Die Regulation des Ionenstroms erfolgt durch das Öffnen oder Schließen des Kanals (Gating), das von der Spannung oder von Liganden beeinflusst werden kann, so dass man Spannungs- und Liganden-gesteuerte Kanäle unterscheidet. Die meisten Ionenkanäle haben unterschiedli-

che Leitfähigkeiten für verschiedene Ionensorten. Diese Selektivität ist am größten bezüglich der Ladung der Ionen. Es werden daher Kationen- und Anionenkanäle unterschieden, die sich wiederum entsprechend dem am besten permeierenden Ion in Natrium-, Kalium-, Kalzium-Kanäle, bzw. Chloridkanäle unterteilen lassen. Ich möchte hier einen kurzen Überblick über die Kationenkanäle geben, bevor ich mich näher mit den verschiedenen Proteinfamilien befasse, die vermuteter- oder erwiesenermaßen Chloridionen leiten. Besondere Betonung soll hierbei auf der Rolle dieser Proteine für die Entstehung verschiedener ausgewählter Erkrankungen sowohl im Menschen als auch im Tiermodell liegen. Das Kapitel schließt mit einer kurzen Einführung in die Biologie des Knochengewebes und in die Symptome und Ursachen der Marmorknochenkrankheit (Osteopetrose).

1.2 Kationenkanäle

Seit der Klonierung des ersten Kationenkanals im Jahre 1984 konnte eine immense Zahl von weiteren Mitgliedern dieser Genfamilie aus verschiedenen Spezies isoliert werden (Noda et al., 1984). Mehr als 60 Vertreter sind bis jetzt allein von der Kaliumkanal-Familie bekannt (Snyders, 1999). Diese Vielzahl von Proteinen läßt sich in 2 Hauptfamilien einordnen: liganden- und spannungsgesteuerte Kationenkanäle.

1.2.1 Ligandengesteuerte Kationenkanäle

Acetylcholin, Glutamat und Serotonin sind die wichtigsten Liganden, deren Rezeptoren Kationenkanäle sind. Da sie zumeist Na^+ oder Ca^{2+} leiten, hat ihre Öffnung eine Depolarisation zur Folge. Eine Re- oder Hyperpolarisation könnte durch einen Kaliumkanal hervorgerufen werden. In der Tat gibt es ATP- und Acetylcholin-abhängige Kaliumströme, $I_{K,ATP}$ und $I_{K,Ach}$. Die porenbildenden Untereinheiten der für diese Ströme verantwortlichen Proteinkomplexe sind jedoch einwärtsgerichtete Kaliumkanal-Proteine (s.u.), die durch G-Proteine oder den Sulfonamid-Rezeptor reguliert werden. Sie zählen daher nicht im engeren Sinne zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen.

Das momentan akzeptierte Topologiemodell der Untereinheiten der ligandengesteuerten Kationenkanäle geht von 4 Transmembran-Domänen (TM1 - TM4) und von extrazellulär gelegenen Amino- und Carboxy-Termini aus (siehe Abbildung 1.1). Die funktionelle Einheit besteht aus fünf solcher Untereinheiten, von denen mehrere Isoformen existieren. Das Verhalten des Pentamers wird durch die in ihm enthaltenen Untereinheiten bestimmt. Beispielsweise sind AMPA-Rezeptoren ohne die GluR B-Untereinheit sowohl für Na^+ als auch für Ca^{2+} durchlässig, während die Präsenz von GluR B die Ca^{2+} -Leitfähigkeit vollständig unterdrückt (Hollmann et al., 1991).

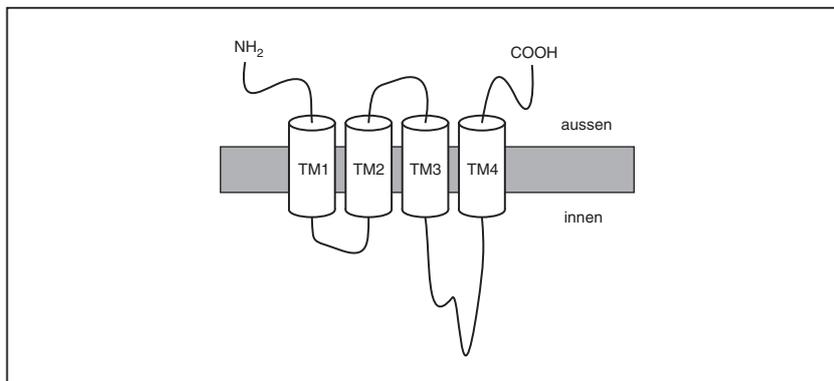


Abbildung 1.1: Das allgemein akzeptierte Topologiemodell der Ligandengesteuerten Ionenkanäle geht von 4 Transmembrandomänen aus.

1.2.2 Spannungsgesteuerte Kationenkanäle

Das zentrale strukturelle Motiv der spannungsgesteuerten Kationenkanäle wird von den einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen („Inward Rectifiers“, Abkürzung: Kir) beispielhaft vorgeführt. Zwischen zwei Transmembrandomänen liegt der sogenannte „P-Loop“, der hydrophob ist und unmittelbar an der Bildung der Pore beteiligt ist. Abgekürzt lässt sich die Struktur als „2Tm-1P“ beschreiben. Vier solcher Untereinheiten sind nötig, um einen Kanal zu bilden. Sie sind so angeordnet, dass der „P-Loop“ jeweils in die Mitte der von diesen Untereinheiten gemeinsam gebildeten Pore zeigt. Die Gleichrichterfunktion wird durch die Blockade dieser Kanäle durch cytoplasmatische Mg^{2+} -Ionen oder Polyamine bei Depolarisation und nicht durch eine Regulation der Pore durch Konformationsänderungen des Proteins selbst hervorgerufen (Snyders, 1999). Eine weitere Variante stellt das Kanalprotein TWIK dar. Es besteht aus zwei miteinander verknüpften 2Tm-1P-Untereinheiten und hat daher die Topologie 4Tm-2P.

Damit eine Spannungsänderung in eine Konformationsänderung münden kann, die ein aktives Öffnen der Kanal-Pore ermöglicht, müssen Ladungen im Protein vorhanden oder zumindest mit ihm assoziiert sein. Der Shaker-Kaliumkanal aus *Drosophila melanogaster* und seine Verwandten beinhalten zu diesem Zweck neben dem von den einwärtsgleichrichtenden Kanälen bekannten 2Tm-1P-Motiv vier weitere Transmembrandomänen. Ihre Struktur ist daher 6Tm-1P und die Transmembrandomänen werden S1 bis S6 bezeichnet, wobei S4 der sogenannte Spannungssensor ist (Kamb et al., 1987) (Papazian et al., 1991). Eine Reihe positiv geladener Aminosäuren in der Alpha-helix von S4 führen dazu, dass sie sich bei Depolarisation ein Stück in der Lipiddoppelschicht nach extrazellulär bewegt. Diese Ladungsbewegung äußert sich makroskopisch als ein auch bei blockierter Pore messbarer Strom. Eine Besonderheit des Shaker-Kanals ist der Mechanismus der schnellen Inaktivierung. Ein am Aminoterminus wie an einer Kette intrazellulär gelegener und geladener „Ball“ bindet nach einer kurzen offenen Phase des Kanals an eine im Protein selbst befindliche Bindungsstelle und verschließt so die

Pore. In Säugern konnte eine große Zahl von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen isoliert werden, die dem erwähnten 6Tm-1P-Bauplan entsprechen. Sie gruppieren sich in fünf Familien: Kv1 bis Kv4, KCNQ und HERG (Übersicht in: (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Eine weitere Variante stellen die TOK-Kanäle dar, deren Untereinheiten aus einem mit einem 2Tm-1P-Segment verknüpften 6Tm-1P-Segment bestehen (Ketchum et al., 1995). In allen spannungsgesteuerten Kationenkanälen bilden 4 Untereinheiten den funktionsfähigen Kanal. Die 6Tm-1P-Bauweise findet sich jedoch nicht nur in Kaliumkanälen, sondern ebenfalls in den spannungsgesteuerten Natrium- und Kalziumkanälen. Allerdings sind hier die vier den Kanal bildenden 6Tm-1P-Elemente in einer einzigen Polypeptidkette enthalten, so dass diese Proteine eine beträchtliche Größe erreichen.

Auch wenn viele α -Untereinheiten spannungsgesteuerter Kationenkanäle bei heterologer Expression alleine Ströme hervorrufen, so weichen ihre Eigenschaften oft von denen physiologischer Ströme erheblich ab. Der Grund hierfür liegt in einer Vielzahl von weiteren Untereinheiten, meist β bzw. γ genannt, die die Kanalfunktion beeinflussen können. Beispielsweise gibt es eine β -Untereinheit von Kv-Kaliumkanälen (Kv β 1.1), die einen Inaktivierungs-Ball trägt – ähnlich dem N-terminalen Ball des Shaker-Kanals – und damit für eine schnelle Inaktivierung von Ball-losen α -Untereinheiten sorgen kann (Accili et al., 1997). Andere β -Untereinheiten wiederum vergrößern und verändern den beobachteten Strom, wie im Falle von KCNE1 (MinK), einer Untereinheit von KCNQ1 (Romey et al., 1997).

1.2.3 Durch Mutationen in Kationenkanälen hervorgerufene Erkrankungen

Die vielfältigen physiologischen Funktionen von Kationenkanälen sollen anhand von einigen Krankheiten illustriert werden, die von Mutationen in verschiedenen strukturellen Klassen dieser Kanäle hervorgerufen werden. Es wurden Erkrankungen ausgewählt, die zumindest in ähnlicher Form auch von Anionenkanälen hervorgerufen werden können, um das funktionelle Zusammenspiel der beiden Kanalklassen in verschiedenen physiologischen Systemen etwas zu beleuchten.

1.2.3.1 ROMK und das Bartter-Syndrom

ROMK ist ein einwärtsgerichteter Kaliumkanal, dessen systematischer Name Kir1.1 lautet. Er ist verantwortlich für das Kalium-Recycling an der apikalen Membran der Zellen des aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife in der Niere. Ist er durch Mutationen funktionslos, resultiert das Bartter-Syndrom, das sich durch eine hypokaliämische Alkalose und einen renalen Salzverlust auszeichnet (Simon et al., 1996). Das über $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter aufgenommene Kalium kann die Zelle nicht mehr über die apikale Zellmembran verlassen, während Chlorid- und Natriumionen noch durch einen basolateralen Chloridkanal, auf den später eingegangen wird, bzw. die Na^+/K^+ -ATPase aus der Zelle entfernt werden können. Der Prozess der Salz-Resorption kommt daher in diesem wichtigen Teil des Nephrons zum Erliegen, was in einem starken Elektrolytverlust resultiert. Die erhöhte Natriumkonzentration

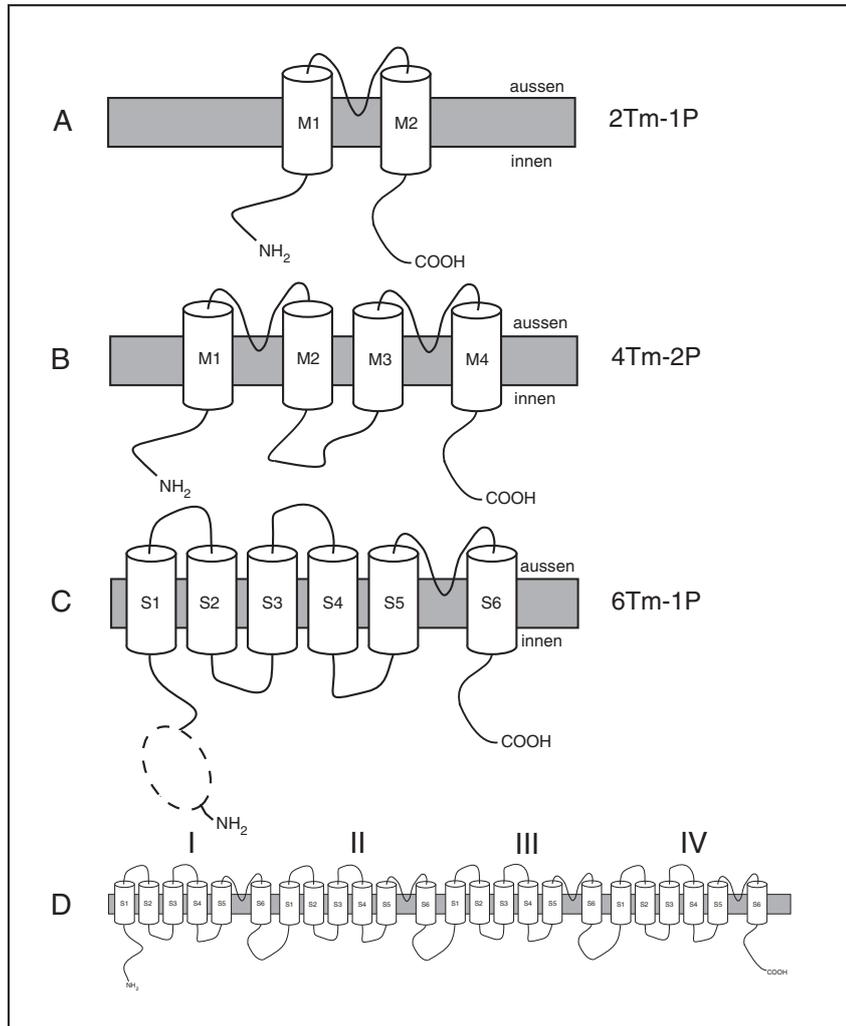


Abbildung 1.2: Topologie, Aufbau und Funktion der verschiedenen Klassen von spannungsgesteuerten Kationenkanälen. (A) Die Kanalfamilie der Einwärtsgleichrichter besteht nur aus dem für alle Kaliumkanäle zentralen 2Tm-1P-Motiv. (B) TWIK-Kanäle zeigen eine Verdoppelung des 2Tm-1P-Motivs. (C) Die 6Tm-1P-Bauweise ist typisch für Kaliumkanäle des Shaker-Typs, sowie für Natrium- und Kalziumkanäle. (D) Natrium- und Kalziumkanäle bestehen aus 4 miteinander verbundenen 6Tm-1P-Einheiten.

on im distalen Tubulus wiederum führt zu einem Verlust an K^+ . Na^+ wird hier über den epithelialen Natriumkanal (eNaC) in die Tubuluszellen aufgenommen und zur Wahrung der Elektroneutralität im Gegenzug K^+ in das Tubuluslumen sezerniert.

1.2.3.2 Hyperkaliämische Periodische Paralyse, erbliche Paramyotomie und SCN4A

Die Hyperkaliämische Periodische Paralyse äußert sich in einer vor allem nach stärkerer Muskelbeanspruchung auftretender Muskellähmung, die einige Stunden andauern kann. Muskelsteifigkeit bei Kälte und bei Beanspruchung sind die Symptome bei erblicher Paramyotomie. Beide Erkrankungen werden durch verschiedene Mutationen im Muskel-Natriumkanal SCN4A hervorgerufen. Der Pathomechanismus beruht auf einer inkompletten Inaktivierung des Natriumstromes durch die mutierten Kanal-Untereinheiten. Eine leichte Depolarisation, etwa durch einen erhöhten Kaliumspiegel, erzeugt dann einen ständigen, geringen Natriumstrom, der die normalen Kanäle daran hindert, wieder voll aktivierbar zu sein, was bis zur Lähmung gehen kann. Gleichzeitig führt die andauernde Depolarisation zu einer fehlenden Relaxation der Muskeln, d. h. zur Muskelsteifigkeit (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Eine andere Form der Muskelsteifigkeit wird durch Mutationen im spannungsabhängigen Chloridkanal CLC-1 verursacht (siehe 1.3.5.1).

1.3 Anionenkanäle

Chlorid ist im Säugetier-Organismus mit rund 115mM das Anion mit der höchsten extrazellulären Konzentration. Anionenströme werden daher hauptsächlich von Chlorid getragen, so dass Anionenkanäle funktionell als Chloridkanäle zu betrachten sind, auch wenn sie prinzipiell auch andere Anionen passieren lassen. Da Chlorid intrazellulär lediglich in einer Konzentration von 4–40mM vorhanden ist, liegt das Gleichgewichtspotential bei -90 bis -30mV, also in der Nähe des Ruhepotentials der meisten Zellen, das meist um -60mV beträgt. In Ruhe kommt es daher kaum zu Chloridströmen über die Zellmembran, bei Depolarisation jedoch führt ein Einstrom von Chlorid zu einer Repolarisation der Zelle. Unter Umständen wird der Chloridspiegel in bestimmten Zellen aber so weit erhöht, dass es nach Öffnung von Chloridkanälen zu einer Depolarisation kommen kann. Die Regulation des Chloridgehaltes erfolgt einerseits über Na^+/Cl^- - oder $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Cotransporter, die die intrazelluläre Chloridkonzentration erhöhen, und K^+/Cl^- -Cotransporter, die dem entgegenwirken. $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher transportieren Chlorid in beide Richtungen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Mehreren Proteinen werden Chloridkanal-Eigenschaften zugeschrieben, ohne dass dies bisher mit letzter Sicherheit bewiesen werden konnte. Zu diesen „putativen“ Chloridkanälen zählen die CLIC-Proteine. Sicher als Chloridkanäle einzuordnen sind: 1. ligandengesteuerte Chloridkanäle, 2. der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) und 3. viele Mitglieder der CLC-Familie von spannungsgesteuerten Chloridkanälen.

1.3.1 Die CLIC-Proteinfamilie

In Säugetieren sind sechs CLIC-Proteine bekannt, so benannt, weil es sich um „Chloride Intracellular Channels“ handeln soll. Laut Hydropathie-Analyse der Aminosäuresequenz besitzen sie eine oder evtl. zwei Transmembrandomänen. Das erste Mitglied dieser Familie, wegen sei-

nes Molekulargewichts in der SDS-Elektrophorese p64 genannt, wurde aus Mikrosomen von Rinder-Nieren isoliert (Landry et al., 1993). Die Proteine CLIC1-4 und Parorchin sind kleiner und weisen lediglich Ähnlichkeit zur C-terminalen Hälfte von p64 auf, in der sich auch die putativen Transmembrandomänen befinden. Ein gegen p64 gerichteter Antikörper erkannte ein 62 kDa Protein in Proteinextrakten von aus Hühnerknochen isolierten Osteoklasten und ergab ein immunhistochemisches Signal in der Säure-sezernierenden Ruffled Membrane dieser Zellen (Schlesinger et al., 1997). Bisher sind keine Sequenz-Informationen zu diesem Protein erhältlich. CLIC1 (vorher NCC27 benannt) ist ubiquitär exprimiert und wurde immunhistochemisch im Zellkern und im Bürstensaum des proximalen Tubulus der Niere detektiert (Valenzuela et al., 1997)(Tulk und Edwards, 1998). Über CLIC2 ist bisher wenig mehr als die DNA-Sequenz bekannt (Heiss und Poustka, 1997). CLIC3 wurde als Interaktionspartner der Proteinkinase Erk7 kloniert und im Zellkern lokalisiert (Qian et al., 1999). Von CLIC4 (p64H1) wurde eine hohe Expression in Gehirn und Niere in vesikulären Strukturen berichtet (Chuang et al., 1999) (Edwards, 1999). Kürzlich wurde ein fünftes p64-Homolog kloniert, Parchorin (Nishizawa et al., 2000).

Auch wenn für CLIC1, -3, und -4 gezeigt wurde, dass ihre Präsenz zu vergrößerten Chloridströmen führt, steht der Beweis, dass sie selbst als Chloridkanäle fungieren, noch aus. Dieser Beweis wäre durch die Untersuchung von Punktmutationen in CLIC-Proteinen zu führen, die die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle verändern müssten. In einer neueren Untersuchung wird aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zur Glutathion Transferase sogar eine enzymatische Funktion dieser Proteine postuliert (Dulhunty et al., 2001).

1.3.2 Der „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)

Mukoviszidose (Zystische Fibrose) ist eine der häufigsten rezessiven Erbkrankheiten in der europäischen Bevölkerung. Durch positionelle Klonierung konnte CFTR in Familien mit Mukoviszidose als Ursache der Erkrankung identifiziert werden (Riordan et al., 1989). Das Protein besitzt 12 Transmembrandomänen, eine regulatorische Domäne, die phosphoryliert werden kann, und 2 Nukleotid-bindende Domänen, in denen ATP gebunden und hydrolysiert werden kann. Seine Struktur identifiziert CFTR als Mitglied der Familie der ABC-Transporter.

Obwohl Expression von CFTR zu deutlichen cAMP-stimulierten Chloridströmen führte, war zunächst umstritten, ob das Protein selbst ein Chloridkanal ist, oder nur andere Chloridkanäle reguliert. Durch Mutationen, die die Poren-Eigenschaften veränderten, konnte schließlich die Funktion als Chloridkanal bewiesen werden (Anderson et al., 1991). Gleichwohl wird auch die Regulation von Natriumkanälen durch CFTR diskutiert (Ismailov et al., 1996). Häufigste krankheitsverursachende Mutation ist die Deletion von Phenylalanin 508, die zu einer intrazellulären Retention und zum schnellen Abbau des Proteins führt (Lukacs et al., 1993).

Die wichtigste physiologische Aufgabe von CFTR ist der cAMP-regulierte transepitheliale Chloridtransport in Geweben wie Lunge, Schweißdrüsen, Speicheldrüsen, Darm und Pankreas. Wie genau der Ausfall dieser Funktion bei Mukoviszidose zu den Lungensymptomen führt,

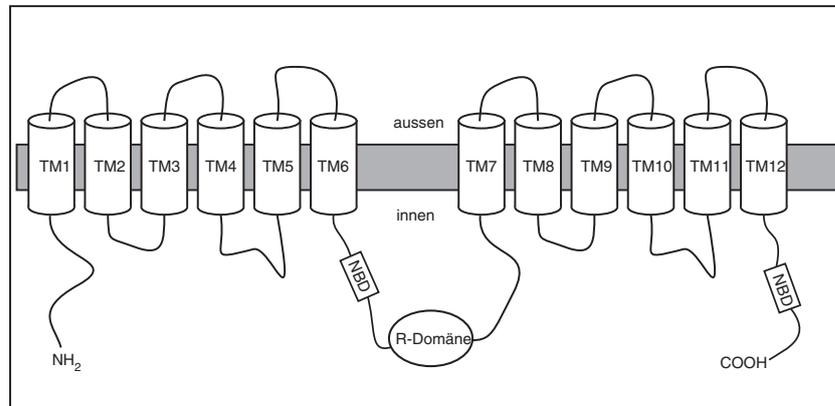


Abbildung 1.3: Das Topologiemodell von CFTR geht von 12 Transmembrandomänen aus. Zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 liegen sowohl eine Nukleotid-bindende Domäne (NBD) als auch eine regulatorische Domäne (R-Domäne), die durch Proteinkinase A phosphoryliert werden kann. Eine zweite Nukleotid-bindende Domäne befindet sich am C-Terminus.

wird kontrovers diskutiert. Einerseits ist der vom respiratorischen Epithel produzierte Schleim zu zäh, was sich auf eine zu geringe Chlorid-Sekretionsleistung zurückführen lässt. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der Schleim eine erhöhte Salzkonzentration aufweist, die auf eine verminderte Chlorid-Resorptionsleistung zurückführbar ist. Diese Erhöhung des Salzgehaltes schwächt nachweislich die Abwehr von Infektionen, so dass die Zähigkeit des Schleims sekundär durch eine erhöhte Infektionsrate erklärbar wäre. Am Ende steht in beiden Fällen eine verringerte Reinigungsfunktion der Lunge, wodurch chronische Infektionen entstehen und die Lunge allmählich zerstören.

1.3.3 Ligandengesteuerte Chloridkanäle

Glycin- und GABA_A-Rezeptoren bilden die Familie der ligandengesteuerten Chloridkanäle in Säugetieren. Aus Invertebraten konnten zusätzlich Glutamat- und Serotonin-gesteuerte Chloridkanäle von homologer Struktur isoliert werden (Ranganathan et al., 2000) (Cully et al., 1994). Sie gleichen in ihrer Struktur den vorher erwähnten ligandengesteuerten Kationenkanälen: fünf Untereinheiten mit je 4 Transmembrandomänen (M1-M4) bilden den funktionellen Kanal. Die Liganden-Bindungsstelle befindet sich immer auf den α -Untereinheiten (Betz et al., 1999). M2 ist für die Bildung der Pore und des Selektivitätsfilters verantwortlich (siehe Abbildung 1.1).

Die wichtigste Aufgabe von ligandengesteuerten Chloridkanälen im Nervensystem von Vertebraten ist die Erzeugung von inhibitorischen postsynaptischen Potentialen. Werden beispielsweise die Glycin-Rezeptoren durch Einnahme des Giftes Strychnin blockiert, kommt es zu lebensbedrohlichen Krämpfen. In der „oscillator“Maus führt der Verlust der α 1-Untereinheit des

Glycin-Rezeptors zu progressiven neurologischen Symptomen und schließlich zum Tod im Alter von 3 Wochen (Buckwalter et al., 1994). Ein teilweiser Verlust der Glycin-Rezeptorfunktion führt im Menschen zur Hyperekplexie, einer abnorm erhöhten Schreckhaftigkeit, die mit Hinstürzen verbunden sein kann (Rajendra et al., 1994). GABA_A-Rezeptoren bilden den Ansatzpunkt für angstlösende und schlafinduzierende, sowie für anästhetische Pharmaka. Barbiturate, früher viel als Schlafmittel, heute dagegen mehr als Anästhetika verwandt, aktivieren diese Rezeptoren. Benzodiazepine hingegen erhöhen lediglich die GABA-Affinität und sind daher weniger toxisch (Rabow et al., 1995).

1.3.4 Spannungsgesteuerte Chloridkanäle der CLC-Familie

Das erste CLC-Protein wurde aus dem elektrischen Organ des Rochens *Torpedo marmorata* kloniert (Jentsch et al., 1990). Da das elektrische Organ seinem Aufbau nach dem Muskelgewebe ähnelt und im Skelettmuskel große Chloridströme bekannt waren, lag es nahe, in diesem Gewebe nach verwandten Proteinen zu suchen. Auf diese Weise wurde CLC-1 als erstes Homolog aus Säugetieren identifiziert (Steinmeyer et al., 1991b). Heute sind 9 Mitglieder der CLC-Familie in Säugetieren bekannt, die sich in 3 Unterfamilien gliedern lassen: der erste Zweig enthält CLC-1, -2, -Ka (bzw. -K1) und -Kb (bzw. -K2), der zweite CLC-3, -4, -5 und der letzte CLC-6 und -7 (siehe Abbildung 1.4). Verwandte Proteine konnten unter anderem in Bakterien, Hefe, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* nachgewiesen und zum Teil elektrophysiologisch charakterisiert werden (Hechenberger et al., 1996) (Schriever et al., 1999).

1.3.4.1 Aufbau und Funktion der CLC-Kanäle

Nach der Hydrophobizitäts-Analyse der Aminosäuresequenz von CLC-0 ergaben sich zunächst 13 potentielle membrandurchspannende Domänen (D1-D13). Eine benutzte Glykosylierungsstelle zwischen D8 und D9 zeigte an, dass dieser Loop extrazellulär liegen musste. Untersuchungen an CLC-2 ergaben, dass eine cytoplasmatische N-terminale Inaktivierungsdomäne trotz Transplantation an den C-Terminus funktionell bleibt (Gründer et al., 1992). C- und N-Terminus der CLC-Proteine sind also offensichtlich cytoplasmatisch gelegen, was eine gerade Anzahl von Transmembrandomänen voraussetzt. Ausgedehnte Untersuchungen der Struktur von CLC-1 mittels verschiedener Methoden bestätigten im Wesentlichen das zuvor bereits postulierte Modell, demzufolge D4 extrazellulär und D13 intrazellulär anzusiedeln sind (siehe Abbildung 1.5). Die kürzlich aufgeklärte dreidimensionale Struktur eines CLC-Proteins aus *E. Coli*, EriC (ecCLC), lieferte weitere Hinweise dafür, dass D4 extrazellulär liegen könnte (Middell et al., 2001).

D9 bis D12 bilden nach diesem Modell einen schwer zu untersuchenden „Block“, da die sie verbindenden Loops äußerst kurz sind (Schmidt-Rose und Jentsch, 1997b). Es wird angenommen, dass nicht jede der Domänen D9-D12 die Membran vollständig durchzieht. Damit wäre auch der Widerspruch zu lösen, dass bei den ohne D4 und D13 verbleibenden elf

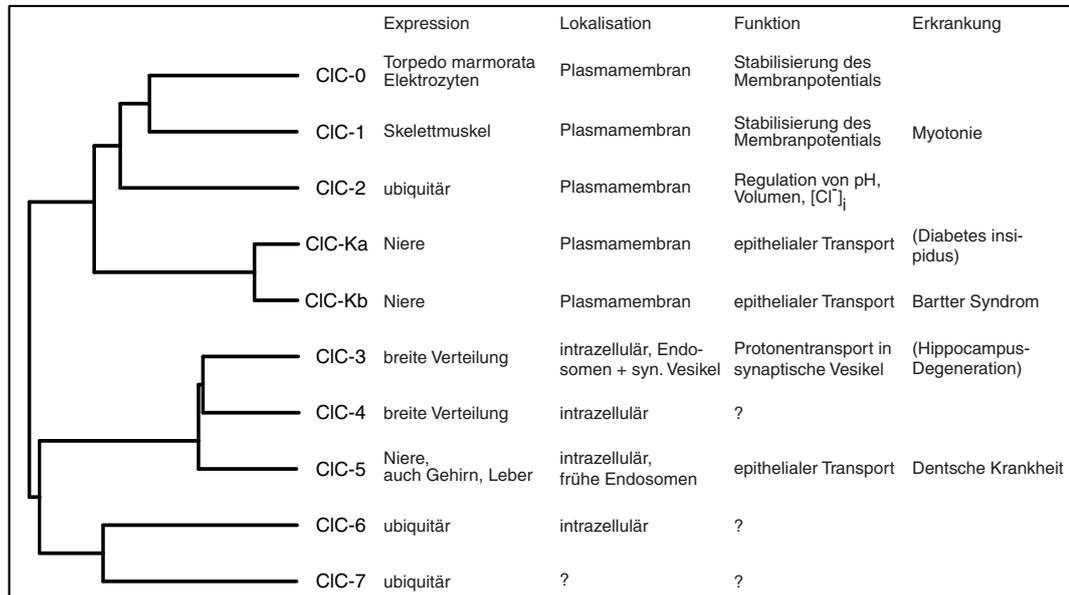


Abbildung 1.4: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse, Expressionsmuster, subzelluläre Lokalisation und Funktion der Kanäle ClC-1 bis -7 aus Säugetieren und dem ersten Mitglied der Proteinfamilie, ClC-0, aus *Torpedo marmorata*. In Klammern sind Erkrankungen aufgeführt, die bei Knockout-Mausmodellen zu beobachten sind. Der Diabetes insipidus tritt bei Knockout-Mäusen auf, denen das Protein ClC-K1 fehlt, das am ehesten dem humanen ClC-Ka entspricht.

transmembranären Segmenten N- und C-Terminus nicht auf der gleichen Seite der Membran liegen können. Ein konkurrierendes Modell geht dagegen davon aus, dass D4 die Membran durchspannt (Fahlke, 2000). Dagegen spricht, dass sich im Vergleich der Hydrophobizitätsprofile in ClC-6 und -7 zwischen D3 und D5 keine potentielle Transmembrandomäne findet.

Ein weiteres Merkmal der CLC-Proteine sind zwei C-terminal gelegene CBS-Domänen (CBS1 und CBS2), so benannt nach ihrer Homologie zur Cystathionin- β -Synthase (Ponting, 1997). Wird das Protein ClC-1 in zwei Fragmenten in einem heterologen System exprimiert, wobei das größere Fragment vom Aminoterminus bis zu CBS1 reicht und das andere den Teil nach CBS1 bis zum Carboxyterminus, inklusive CBS2, reicht, so entstehen Chloridkanäle, die nahezu Wildtyp-Eigenschaften besitzen. Folglich können beide Fragmente, vermutlich über die CBS-Domänen, aneinander binden und so den Kanal funktionell rekonstituieren (Schmidt-Rose und Jentsch, 1997a). Es ist anzunehmen, dass diese intramolekulare Interaktion zur Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur führt, die evtl. funktionelle Bedeutung haben könnte. Ebenso könnten die CBS-Domänen eine Rolle bei der intermolekularen Interaktion von CLC-Proteinen untereinander oder mit anderen Proteinen, z.B. weiteren Untereinheiten, spielen. Die bisher diesbezüglich verfügbaren Daten sind widersprüchlich: Trotz Deletion eines Teils des C-Terminus von ClC-1 inklusive CBS2 konnten noch funktionelle Kanäle gebildet

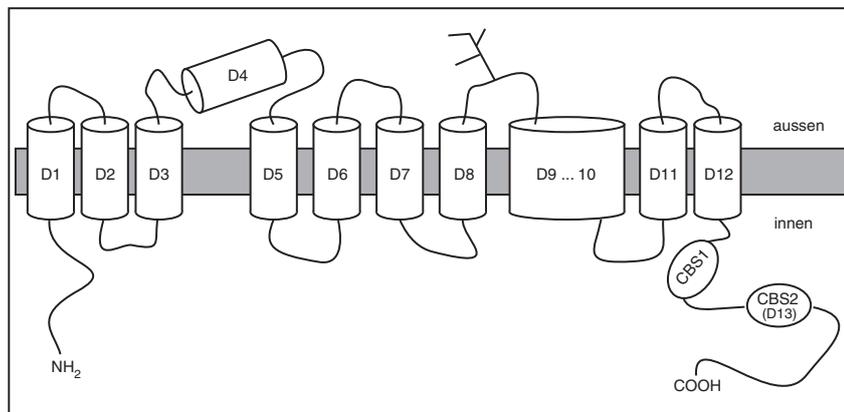


Abbildung 1.5: Toplogiemodell der CLC-Kanäle nach Schmidt-Rose (Schmidt-Rose und Jentsch, 1997b). Die angedeutete Glykosylierungsstelle zwischen D8 und D9 ist bis auf CLC-7 in allen CLC-Proteinen von Säugetieren vorhanden. Im C-Terminus finden sich zwei CBS-Domänen, die in ihrer Struktur der Cystathionin- β -Synthase ähneln.

werden (Hryciw et al., 1998), wogegen die am Anfang von CBS2 gelegene Mutation R704X in CLC-5 die Funktion zerstört (Lloyd et al., 1996).

Die elektrophysiologische Charakterisierung von durch CLC-0 hervorgerufenen Strömen führte zur Entwicklung der „Double Barrel“-Hypothese, nach der CLC-Kanäle zwei unabhängig öffnende und schließende Poren haben, die aber gleichzeitig einem langsameren, gemeinsamen Schließmechanismus unterliegen (Miller, 1982). Durch elektrophysiologische Methoden konnte jüngst gezeigt werden, dass CLC-Kanäle Homodimere sind, in denen jede Untereinheit eine eigene Pore bildet, die spannungsabhängig öffnet (Ludewig et al., 1996) (Weinreich und Jentsch, 2000). Hingegen ist der gemeinsame Schließmechanismus in CLC-0 vom Zusammenspiel beider Untereinheiten abhängig. Die beiden getrennten Poren konnten erstmalig ansatzweise in der Kristallstruktur eines CLC-Proteins aus *E. coli* sichtbar gemacht werden (Midell et al., 2001).

Die meisten bisher elektrophysiologisch untersuchten CLC-Kanäle weisen die Leitfähigkeitssequenz $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ auf, d. h. sie sind selektiv für Chlorid. Sequenzabschnitte, die Pore und Selektivitätsfilter bilden, finden sich nicht in einem Bereich des Proteins konzentriert, sondern scheinen über mehrere Transmembrandomänen hinweg verteilt zu sein (Schmidt-Rose und Jentsch, 1997b).

Wie sind CLC-Proteine in der Lage, Spannungsänderungen in eine Veränderung ihres Offenstandes umzusetzen? In ihrer Aminosäuresequenz findet sich kein Abschnitt mit einer Anhäufung geladener Aminosäuren wie im S4-Segment der spannungsgesteuerten Kationenkanäle. Es fiel aber auf, dass das Gating von CLC-0 von der Chloridkonzentration abhängig ist. Die gezielte Untersuchung dieses Effekts führte zu der Modellvorstellung, dass in der Pore gebundene Chloridionen selbst den Spannungssensor darstellen (Pusch et al., 1995). Dieses Modell konnte mittlerweile auch für CLC-1 und -2 belegt werden (Pusch et al., 1999).

Nicht bei allen CLC-Kanälen konnten nach heterologer Expression Chloridströme gemessen werden, was früh zu der Vermutung führte, dass ein Teil von ihnen intrazellulär lokalisiert sein könnte. Mittlerweile ist bekannt, dass lediglich die Mitglieder des ersten Zweiges der CLC-Familie ausschließlich in der Plasmamembran ihre Wirkung entfalten, während CLC-3, -4, -5, -6 und -7 überwiegend eine intrazelluläre Lokalisation aufweisen (Jentsch et al., 1999).

1.3.5 Die physiologische Funktion verschiedener CLC-Kanäle

1.3.5.1 Der Skelettmuskel-Chloridkanal CLC-1

Symptome der erblichen Myotonie (Myotonia congenita) sind Muskelsteifigkeit nach Muskelanspannung, die sich bei Wiederholung der Bewegung verringert, und in manchen Fällen Steifheit des ganzen Körpers bei Schreckreaktionen. Sie tritt in einer rezessiven (Becker Typ) und einer dominanten (Thomsen Typ) Form auf. In Messungen an myotonen Muskelfasern war eine Reduktion des Chloridstromes im Vergleich zum normalen Muskelgewebe nachweisbar (Adrian und Marshall, 1976). Diese Chloridströme sind kritisch für die Stabilisierung des Muskel-Membranpotentials und für die Repolarisation nach Anspannung. Aufgrund des Aufbaus des Muskelgewebes kann ein Kaliumausstrom diese Aufgabe nur bedingt übernehmen, da eine hierdurch erzeugte Kalium-Akkumulation in den T-Tubuli zu einer erneuten Depolarisation führen könnte.

Seine elektrophysiologischen Eigenschaften, vor allem das Öffnen nach Depolarisation, und seine starke Expression im Skelettmuskel machten CLC-1 daher zu einem sehr geeigneten Kandidatengen für die erbliche Myotonie. In der Tat konnte zuerst in der myotonen ADR-Maus eine Mutation im Gen für CLC-1 als Ursache der Erkrankung identifiziert werden (Steinmeyer et al., 1991a). Über 40 Mutationen in CLCN1, dem humanen Gen für CLC-1, konnten für beide Formen der humanen Erkrankung bisher identifiziert werden (Übersicht: (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999)).

1.3.5.2 Die Nieren-spezifischen CLC-Kanäle

Sowohl aus Nagern als auch aus dem Menschen konnten zwei mehr als 90% identische CLC-Kanäle kloniert werden, die CLC-K1 und -K2, bzw. CLC-Ka und -Kb genannt wurden, da aus der Sequenz nicht ersichtlich war, welcher Kanal jeweils das Spezieshomolog darstellte (Adachi et al., 1994)(Kieferle et al., 1994). Die Tatsache, dass CLC-K1 nach Dehydratation verstärkt gebildet wird, deutete bereits auf eine Rolle bei der Wasserrückresorption hin (Uchida et al., 1993). Dazu passend wurde der Kanal im dünnen aufsteigenden Teil der Henle-Schleife lokalisiert, der für diese Rückresorption eine wichtige Rolle spielt. Die heterologe Expression führte zu Strömen, die spannungsunabhängig waren und mit denen der betreffenden Nierenzellen gut übereinstimmten. Den letzten Beweis für diese Hypothese erbrachte die Deletion des Gens durch homologe Rekombination in der Maus. Knockout-Tiere leiden unter Diabetes insipidus, d. h. ihr Urin kann nicht entsprechend aufkonzentriert werden und sie verlieren große Mengen an Flüssigkeit (Matsumura et al., 1999).

Die Funktion von ClC-Kb hingegen wurde durch humangenetische Untersuchungen aufgeklärt. Ebenso wie bei dem bereits erwähnten Kaliumkanal ROMK führen Mutationen in ClC-Kb zum Bartter-Syndrom, da das über den apikalen $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Kotransporter aufgenommene Chlorid die Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife nicht basolateral Richtung Blutbahn verlassen kann (Simon et al., 1997). Die Konsequenz ist eine stark verminderte Salz-Rückresorption mit den vorher beschriebenen Folgen. Funktionell entspricht daher ClC-K1 ClC-Ka und ClC-K2 ClC-Kb. Während die heterologe Expression von ClC-K2 lediglich zu Artefakten führte, gelang es jüngst, Chimären von ClC-K1 und -Kb, die zum größeren Teil aus ClC-Kb bestehen, zu charakterisieren (Waldegger und Jentsch, 2000).

1.3.5.3 Intrazelluläre CLC-Kanäle

Die Dent'sche Erkrankung ist X-chromosomal rezessiv vererbt und durch eine stark erhöhte Konzentration an niedermolekularen Proteinen und Kalzium im Urin charakterisiert, was zu Nierensteinen und zur Zerstörung des Organs führen kann. Mehrere Mutationen in *CLCN5* konnten als Ursache identifiziert werden (Lloyd et al., 1996). Alle haben gemeinsam entweder einen Verlust oder zumindest – bei Punktmutationen – eine starke Reduktion des durch ClC-5 hervorgerufenen auswärtsgerichteten Chloridstroms. Dies spricht dafür, dass die Bereitstellung einer Chloridleitfähigkeit die entscheidende Funktion von ClC-5 ist.

Obwohl der Kanal auch in anderen Organen vorhanden ist, wirkt sich der Verlust seiner Funktion lediglich in den Zellen des proximalen Tubulus voll aus, die einen sehr aktiven Endozytose-Apparat besitzen, durch den die im Primärharn vorhandenen niedermolekularen Proteine rückresorbiert werden. In denselben Zellen werden sie in Aminosäuren zerlegt und dem Blutkreislauf zugeführt. In einem Knockout-Mausmodell konnte die Rolle von ClC-5 bei diesem Prozess tiefergehend untersucht werden (Piwon et al., 2000). Demnach findet sich ClC-5 intrazellulär in einem frühen endosomalen Kompartiment der Zellen des proximalen Tubulus, das ebenfalls die V-Typ H^+ -ATPase in großer Menge aufweist. Ohne ClC-5 sind diese Zellen kaum in der Lage, Proteine aus dem Primärharn zu endozytieren. Ebenfalls ist die Endozytose von Plasmamembran-Proteinen und von Proteinhormonen zu regulatorischen Zwecken verlangsamt, so dass eine Erhöhung von PTH im Urin zur Dysregulation des Kalziumhaushalts beiträgt. Dies alles ist vermutlich Folge einer verminderten Azidifizierung der frühen Endosomen. ClC-5 scheint für den Transport von Chlorid entlang der von der H^+ -ATPase gebildeten Potentialdifferenz in die Vesikel zu sorgen, so dass im Endeffekt ein elektroneutraler Transport von HCl resultiert (siehe Abbildung 1.6).

Die Parallelschaltung einer Chloridleitfähigkeit mit dem primär aktiven Transport von Protonen ist ein universeller Mechanismus für die Ansäuerung von intra- und extrazellulären Kompartimenten (al Awqati, 1995). Außer ClC-5 befinden sich ebenfalls die nah verwandten ClC-3 und -4, sowie ClC-6 und -7, die den dritten Zweig des CLC-Stammbaums repräsentieren, in intrazellulären Kompartimenten und könnten daher an Ansäuerungsprozessen beteiligt sein. Auch CLIC-Proteine werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

Für ClC-3 konnte jüngst gezeigt werden, dass sein Fehlen in *Clcn3*^{-/-}-Mäusen zu einer

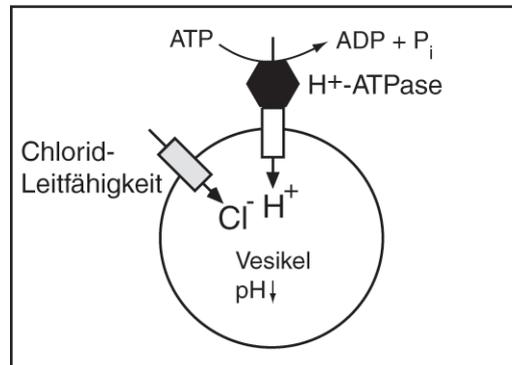


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Funktion von Chloridkanälen bei der Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente

verringerten Azidifizierung von synaptischen Vesikeln führt (Stobrawa et al., 2001). In nicht-neuronalem Gewebe befindet sich ClC-3 vornehmlich in späten Endosomen. Makroskopisch wirkt sich der Verlust von ClC-3 in einer hippocampalen und retinalen Degeneration aus.

Durch Kreuzungsexperimente zwischen verschiedenen Mausstämmen konnten Mäuse erzeugt werden, denen das Gen für ClC-4, *Clcn4*, fehlt (Palmer et al., 1995). Kein Phänotyp konnte bisher in diesen Tieren beobachtet werden, so dass die Funktion dieses Proteins unklar ist, das sich ebenso wie ClC-5 teilweise in der Plasmamembran befindet und dort messbare Chloridströme hervorruft (Friedrich et al., 1999).

Für den ubiquitär vorkommenden ClC-6 konnte eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation belegt werden (Buyse et al., 1998). Nach neueren Daten scheint es sich um ein frühes endosomales Kompartiment zu handeln. Welche Funktion dieser Kanal dort ausübt, ist unbekannt.

1.3.6 ClC-7

Der phylogenetische Abstand von ClC-7 und ClC-6, die untereinander lediglich 45% Identität aufweisen, zu den anderen CLC-Proteinen aus Säugetieren ist beträchtlich (Brandt und Jentsch, 1995). Dagegen ähneln alle bisher aus Pflanzen isolierten CLC-Proteine interessanterweise am meisten ClC-6 und -7 (Hechenberger et al., 1996). Die Analyse der genomischen Struktur des auf Chromosom 16p13 lokalisierten *CLCN7*-Gens ergab eine Unterteilung der kodierenden Sequenz in 25 Exone. Einige Exon/Intron-Grenzen waren mit denen von *CLCN6* identisch (Kornak et al., 1999).

Auf RNA-Ebene konnte in allen untersuchten Geweben eine Expression von ClC-7 nachgewiesen werden, was zu der Annahme führte, dass der Kanal eine allgemeine Housekeeping-Funktion haben könnte. Diese Vermutung wurde durch eine fehlende TATA-Box in der Promoter-Region unterstützt. Darüber hinaus war eine sehr starke Expression in frühen Embryonalstadien auffällig. Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass die hydrophobe

Domäne D4 in CLC-7 fehlt und ebenso die sonst bei CLC-Kanälen übliche Glykosylierungsstelle zwischen D8 und D9. Eine in transient transfizierten Zellen nachweisbare intrazelluläre Lokalisation konnte den Umstand erklären, dass heterologe Expression von CLC-7 in *Xenopus*-Oozyten und in kultivierten Zellen nicht zu messbaren Strömen führte (Brandt, 1997). CLC-7 war somit bisher lediglich als putativer Chloridkanal zu bezeichnen, dessen physiologische Funktion völlig unbekannt ist. Um mehr über die Funktion dieses Ionenkanals im Säugetier-Organismus zu erfahren, wurden zwei unterschiedliche Knockout-Tiermodelle entwickelt, bei denen CLC-7 ausgeschaltet wurde. Die Erzeugung und Analyse dieser Tiermodelle ist Inhalt der vorliegenden Arbeit.

1.4 Grundlagen der Biologie des Knochengewebes

1.4.1 Knochenwachstum und Entwicklung des Skeletts

Das Skelett von Säugetieren besteht in der Embryonalentwicklung zuerst aus Knorpel und verknöchert dann je nach Knochentyp desmal, d. h. von außen, oder enchondral, also vom Inneren der knorpeligen Knochen-Vorläufer her. Aber Knorpelzellen (Chondrozyten) bestimmen nicht nur in dieser frühen Phase die Form der Knochen, sondern sie sind auch im entwickelten Knochen von essentieller Bedeutung für das Wachstum. Die Epiphysenfuge genannte Struktur, die zwischen Schaft und Enden der langen Röhrenknochen gelegen ist, besteht aus Knorpel. Hier befinden sich Knorpelzellen, die säulenförmig proliferieren. Die zum Schaft hin orientierten Zellen sterben ab und werden in der Eröffnungszone teilweise abgebaut, so dass in die Markhöhle weisende Knorpelstreben stehenbleiben. Diese werden von Osteoblasten als Leitschiene benutzt, die die Knorpelstreben in einen primitiven Knochen umwandeln, der Primärspongiosa genannt wird (siehe Abbildung 1.7). Um die mechanisch vorteilhafte Röhrenform der langen Knochen aufrechtzuerhalten, muss diese Primärspongiosa abgebaut und an den nötigen Stellen in reifen, dichten Knochen umgebaut werden, wie er z.B. in der Corticalis, der Röhrenwand des Knochenschaftes, zu finden ist.

Auch diese Corticalis wiederum muss permanent umgebaut werden, da während des Wachstums nicht nur die Länge, sondern auch der Durchmesser der Röhrenknochen zunimmt. Auch im ausgewachsenen Knochen geschieht ein ständiger Ab- und Aufbau von Knochengewebe, was eine Anpassung an die wechselnden mechanischen Belastungen erlaubt. Ohne ständiges Belastungstraining verringert sich beispielweise die Knochendichte in der Schwerelosigkeit bedrohlich, da der Abbau den Neuaufbau des Knochens überwiegt. Die Erhaltung der Stabilität des ausgewachsenen Skeletts beruht also allein auf dem funktionierenden Zusammenspiel zweier Zelltypen: Den knochenbildenden Osteoblasten und den Osteoklasten, die als einzige Zellen des Organismus zum Knochenabbau befähigt sind.

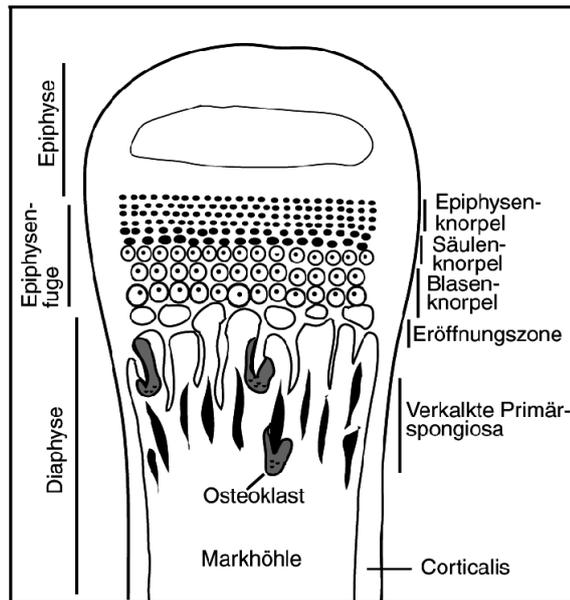


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Wachstums von Röhrenknochen. Proliferierende Knorpelzellen der Epiphysenfuge erzeugen ein knorpeliges Gerüst, das durch das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten in Knochen umgewandelt wird.

1.4.2 Entstehung und Funktionsweise der Osteoklasten

Osteoklasten entwickeln sich aus denselben Stammzellen wie die zu den weißen Blutkörperchen gehörenden mononukleären Fresszellen (Monozyten). Zunächst entstehen einkernige Vorläuferzellen, die sich unter entsprechender hormoneller Stimulation zusammenlagern können, so dass der reife Osteoklast entsteht. Diese zwischen 10 und 20 Zellkerne enthaltende Zelle kann leicht eine Größe von $100\mu\text{M}$ erreichen. Um Knochen abbauen zu können, muss der Osteoklast sich durch Integrine fest an die Knochenoberfläche anheften, was eine Reihe von Veränderungen in der Zelle induziert, z. B. die Formung eines Aktin-Ringes um die Stelle der Anhaftung herum. In der Folge kommt es zu einer massiven Fusion saurer Vesikel mit der innerhalb des Actinringes gelegenen, zum Knochen orientierten Membran, die sich dadurch vergrößert und auffaltet. Die so entstandene sogenannte „Ruffled Border“ enthält große Mengen einer V-Typ H^+ -ATPase, die Protonen in den Raum zwischen Osteoklast und Knochen sezerniert, der Resorptions-Lakune benannt wird.

Der saure pH-Wert der Lakune führt zur Auflösung des Hydroxylapatits des Knochens und ermöglicht die maximale Aktivität der durch die Fusion saurer Vesikel mit der Ruffled Border sezernierten sauren Hydrolasen, die die organischen Bestandteile des Knochens, hauptsächlich Kollagen, zersetzen. Die sich in der Lakune anhäufenden Abbauprodukte werden durch Transzytose zum gegenüberliegenden Zellpol des Osteoklasten transportiert und dort freigesetzt (Salo

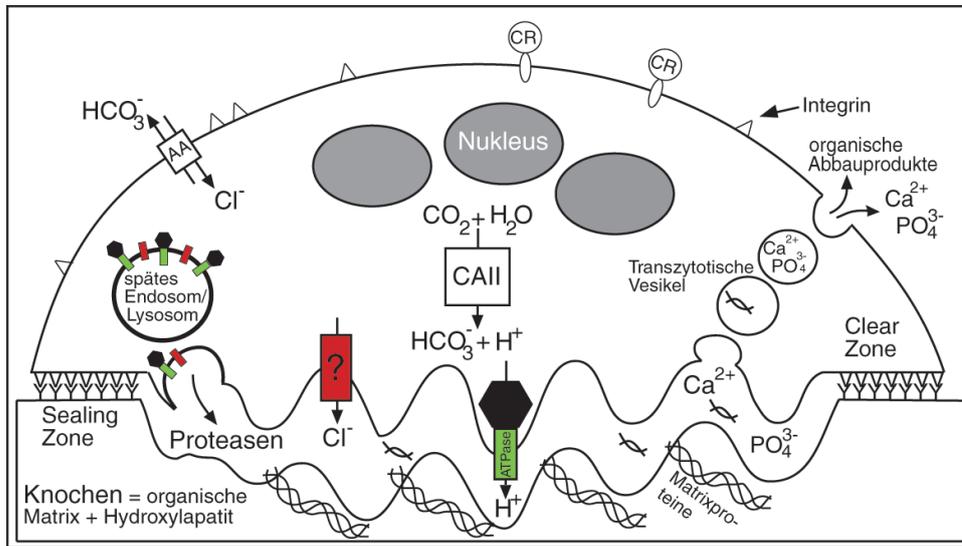


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung eines aktiven Osteoklasten. Die Zelle haftet an der Sealing Zone über Integrine fest am Knochen. Zwischen beiden Sealing Zones ist die Ruffled Border Membran angedeutet, in der sich in hoher Konzentration sowohl eine V-Typ H⁺-ATPase (ATPase) als auch ein noch unbekanntes Cl⁻-leitendes Protein (?) befindet. Die in die Resorptionslakune sezernierten Protonen und Chloridionen werden durch das Zusammenwirken der Carboanhydrase II (CAII) und eines Anionenaustauschers (AA) bereitgestellt. CR= Calcitonin-Rezeptor.

et al., 1997).

Zur Erzeugung der für die Ansäuerung der Lakune benötigten Protonen bedient sich der Osteoklast eines ähnlichen Apparates wie die Schaltzellen (Intercalated Cells) des Sammelrohrs der Niere. Eine cytoplasmatische Carboanhydrase wandelt CO₂ in H⁺ und HCO₃⁻ um. Das anfallende HCO₃⁻ wird durch einen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher aus der Zelle entfernt und durch Cl⁻ ersetzt (Übersicht in (Väänänen et al., 2000)).

1.4.3 Formen und Ursachen der Osteopetrose

Unzureichende Funktion der Osteoklasten führt zu einer Anhäufung von Knochenmaterial und verhindert den Umbau zu mechanisch stabilem Knochen. Die resultierende Sprödigkeit der Knochen führte zu der Bezeichnung Marmorknochenkrankheit, bzw. Osteopetrose. Während die Analyse etlicher spontaner oder gentechnisch erzeugter osteopetrotischer Mausmutanten viel zum Verständnis der Funktionsweise des Osteoklasten beigetragen hat, sind nur zwei genetische Ursachen für die erbliche humane Osteopetrose aufgeklärt (Lazner et al., 1999). Interessanterweise sind beide Gene an der Säuresekretion des Osteoklasten beteiligt.

Einen eher milden Verlauf weist die autosomal rezessiv vererbte Osteopetrose mit renaler tubulärer Azidose auf. Ursache sind Mutationen in der Carboanhydrase Typ II, die sowohl in

den Schaltzellen der Niere als auch in Osteoklasten vorkommt, was das Zusammentreffen von fehlender Säuresekretion in beiden Zelltypen erklärt (Sly et al., 1983).

Infantile maligne Osteopetrose ist dagegen eine schwere Erkrankung, die in den ersten Lebenswochen beginnt und ohne Therapie innerhalb von 2 bis 10 Jahren zum Tode führt (Gerritsen et al., 1994). Die einzige wirksame Therapie besteht in frühzeitiger Knochenmark-Transplantation. Die Kinder leiden unter Anämie, Leber- und Milzvergrößerung, Abwehrschwäche, häufigen Knochenbrüchen und Taub- und Blindheit.

Mutationen in *TCIRG1*, dem Gen für die $\alpha 3$ -Untereinheit der V-Typ H^+ -ATPase, konnten in mehreren unabhängigen Familien als häufigste genetische Ursache der infantilen malignen Osteopetrose identifiziert werden (Frattini et al., 2000) (Kornak et al., 2000). Diese V-Typ H^+ -ATPase ist ein großer Enzymkomplex aus mindestens 13 Untereinheiten, von denen bis jetzt 10 mehrere Isoformen aufweisen (Forgac, 1998). Diese Isoformen sind teilweise gewebespezifisch und modulieren wahrscheinlich die Eigenschaften des Enzyms nach den örtlichen physiologischen Gegebenheiten. Drei Isoformen sind von der α -Untereinheit der H^+ -ATPase bekannt, wobei Isoform $\alpha 3$, zunächst OC116 genannt, besonders stark in Osteoklasten exprimiert wird (Li et al., 1996). Das zugehörige Gen *TCIRG1* konnte in einer chromosomalen Region lokalisiert werden, die bereits zuvor mit einer schweren rezessiven Form der Osteopetrose in Verbindung gebracht worden war (Heaney et al., 1998). Darüber hinaus führte der Verlust der $\alpha 3$ -Untereinheit zu einer letalen Osteopetrose in einem transgenen Mausmodell ebenso wie in der spontanen Mausmutante „oc“ (Li et al., 1999) (Scimeca et al., 2000).

In einigen unter infantiler maligner Osteopetrose leidenden Patienten konnten jedoch keine Mutationen gefunden werden, was auf mindestens ein weiteres in der Entstehung dieser Krankheit involviertes Gen schließen lässt.