

2 Ergebnisse

2.1 Erzeugung der *Cln7*^{-/-}-Maus

Wie bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben (Kornak, 1996) wurden 2 verschiedene Targeting-Vektoren für die Ausschaltung von *CIC-7* in embryonalen Stammzellen konstruiert (siehe Abbildung 2.1).

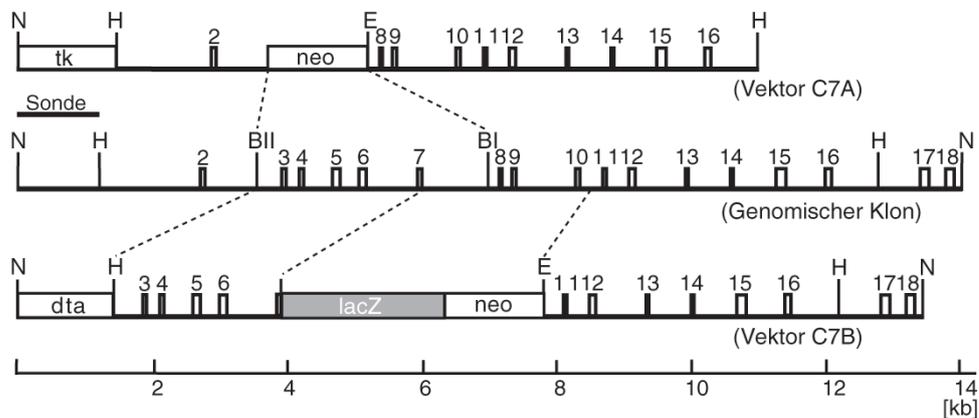


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Targeting-Vektoren C7A (oben) und C7B (unten). In der Mitte ist ein genomischer Klon abgebildet, von dem ausgehend beide Vektoren konstruiert wurden. Kästchen repräsentieren exonische Sequenzabschnitte. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind aufgeführt (BII=BglII, BI=BsrGI, E=EcoRI, H=HinDIII, N=NotI). Sonde=DNA-Fragment, das als Sonde für die Southern-Blot Analyse genutzt wurde. dta=Diphtherietoxin alpha Fragment; tk=Thymidylat-Kinase-Gen; neo=Neomycin-Resistenzgen; lacZ= β -Galaktosidase-Gen.

Während in Vektor C7A die Insertion der Neomycin-Resistenz-Kassette zu einer Deletion von Exon 2 bis 7 führte, wurde durch C7B *lacZ* als Reportergen in Exon 7 im Leserahmen eingefügt. Die Exone 8 bis 10 wurden vollständig deletiert. Das Ziel war es, ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen Teil von *CIC-7* bis hinter die zweite Transmembrandomäne und der β -Galaktosidase von *E. Coli* zu erzeugen, dessen Expression unter Kontrolle des *CIC-7* Promoters steht. Unter Ausnutzung der enzymatischen Aktivität der β -Galaktosidase sollte es somit möglich sein, die Expression von *CIC-7* in Geweben durch ein einfaches Färbeverfahren zu

untersuchen.

Durch Elektroporation wurden beide Targeting-Vektoren in embryonale Stammzellen eingebracht. Auf zweifache Weise wurden Stammzellen, in denen homologe Rekombination stattgefunden hat, selektiert. Das Neomycin-Resistenzgen diente als positiver Selektionsmarker. Nur Zellen, die dieses Gen enthielten, konnten die Zugabe eines Aminoglykosid-Antibiotikums (G418) überleben. Als negativen Selektionsmarker beinhalteten die Targeting-Vektoren entweder das Gen für die Thymidylat-Kinase (TK) des Herpes Simplex Virus oder das zytotoxische alpha Fragment des Diphtherie Toxins (DTA). Bei einer nicht homologen Integration in das Genom der Stammzelle würde der Vektor als Ganzes, meist sogar mehrfach als Konkatamer, inserieren, so dass der negative Selektionsmarker erhalten bliebe und es trotz Neomycin-Resistenz zu einem Absterben der betroffenen Zelle käme. Pro Targeting-Vektor wurden etwa 600 Kolonien von resistenten embryonalen Stammzellen isoliert und durch Southern-Blot analysiert (siehe Abbildung 2.2).

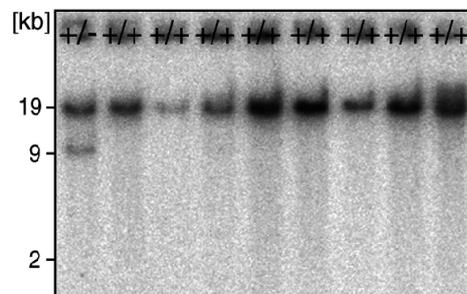


Abbildung 2.2: Southern-Blot Analyse von DNA embryonaler Stammzellklone nach Transformation mit Konstrukt C7B. Die erste Spur enthält DNA eines heterozygoten Klons (+/-), erkennbar an der 9kb Bande, während alle anderen Spuren lediglich die 19kb Wildtyp-Bande aufweisen.

Für jedes Konstrukt konnten jeweils 3 positive Stammzellklone gewonnen werden, d. h. in über 99% der Fälle erfolgte lediglich eine zufällige Integration des Vektors in das Genom der Stammzellen.

Jeweils zwei dieser Stammzellklone wurden in Blastozysten injiziert. Es ist hierbei zu beachten, dass beide verwendeten Linien embryonaler Stammzellen (E14 bzw. R1) sich von männlichen Tieren des Mausstammes 129 ableiten, der ein braunes (agouti) Fell hat. Die für die Gewinnung der Blastozysten verwendeten Tiere jedoch gehörten zur Linie C57BL/6 und hatten schwarzes Fell. Wachsen die injizierten transgenen Stammzellen in der Wildtyp-Blastozyste an, so entsteht nach dem Transfer in den Uterus einer scheinsschwangeren Maus ein chimärer Embryo, dessen Anteil an transgenen Zellen sehr variabel ist. Je größer folglich im später geborenen Tier der Anteil an braunem Fell, desto mehr haben die transgenen Stammzellen zur Bildung des Organismus beigetragen. Bestehen die Gonaden zum überwiegenden Teil aus den männlichen manipulierten Zellen, muß das betreffende Tier männlichen Geschlechts sein. Die Wahrscheinlichkeit der Keimbahntransmission, das heisst die Wahrscheinlichkeit,

dass die durch die homologe Rekombination eingefügte genetische Veränderung sich auf die Nachkommen der chimären Founder-Tiere vererbt, ist am höchsten für ein männliches Tier mit einem möglichst großen Anteil braunen Fells.

Im Falle von Konstrukt C7A resultierten aus der Blastozysten-Injektion eines Stammzellklons ein weibliches und 2 männliche chimäre Tiere mit 30-50% braunem Fell. Der zweite Klon war nicht in der Lage, chimäre Tieren hervorzurufen. Beide eingesetzten Stammzellklone von Konstrukt C7B führten zu insgesamt 10 zu 50-90% chimären Tieren, von denen jedoch 3 weiblichen Geschlechts waren.

Aus Verpaarungen von 5 der zusammen genommen 9 männlichen Founder-Tiere (F0-Generation) mit C57BL/6-Tieren gingen braune Nachkommen (F1-Generation) hervor, ein weiteres Indiz für Keimbahntransmission. Die Analyse durch Southern-Blot ergab, dass, wie zu erwarten, 50% dieser F1-Tiere einen heterozygoten Genotyp hatten. Aus der Verpaarung zweier heterozygoter Tiere sollten nach den Mendel-Gesetzen 25% homozygote *Clcn7^{-/-}*-Nachkommen resultieren. Wie sich jedoch herausstellen sollte, lag der tatsächliche Anteil bei nur etwa 15%. Der Grund hierfür lag in einem sehr ausgeprägten Phänotyp dieser Tiere, der weiter unten beschrieben wird.

2.2 *CLC-7* ist in der *Clcn7^{-/-}*-Maus nicht mehr nachweisbar

Der Effekt des Gen-Targeting auf die Expression des betreffenden Gens lässt sich nur schwer vorhersagen. Die für *CLC-7* gewählte Strategie zielte darauf ab, einen für die Funktion wahrscheinlich aller *CLC*-Proteine essentiellen Abschnitt der Aminosäure-Sequenz, das hoch konservierte GSGIP-Motiv, auf genomischer Ebene zu entfernen. Es ist gleichwohl möglich, dass durch alternatives Spleißen vom transgenen Allel eine trunke mRNA gebildet wird, die ein - zumindest teilweise - funktionelles Protein kodieren könnte. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst RNA aus Organen von Geschwistertieren mit verschiedenen Genotypen isoliert und durch Northern-Blot sowie RT-PCR analysiert.

2.2.1 Detektion von *CLC-7* durch Northern-Blot und RT-PCR

Northern-Blots von PolyA⁺-RNA der Linien C7A und C7B wurden mit cDNA-Sonden hybridisiert, die hinter der durch die homologe Rekombination verursachten Deletion lagen (3'-Sonde), oder der deletierten Sequenz entsprachen (C7Del). Im Fall von C7B kam auch ein Fragment der *lacZ*-cDNA als Sonde zur Anwendung (*lacZ*) (siehe Abbildung 2.3).

In RNA von *Clcn7^{-/-}*-Tieren beider Linien fand sich nach Hybridisierung mit der 3'-Sonde ein verglichen mit dem Wildtyp sehr viel schwächeres und kleineres Signal. Folglich wurde sehr viel weniger mRNA gebildet, die das 3'-Ende von *CLC-7* enthielt. Die geringere Größe des Fragments sprach zudem für ein Fehlen eines Teils der Sequenz. Die Hybridisierung mit Sonde C7Del ergab, dass es sich erwartungsgemäß bei der fehlenden Sequenz um den durch homologe Rekombination entfernten Abschnitt der cDNA handelte. Die *lacZ*-Sonde erkannte nur im heterozygoten und im Knockout-Tier von Linie C7B eine mRNA ähnlicher Länge

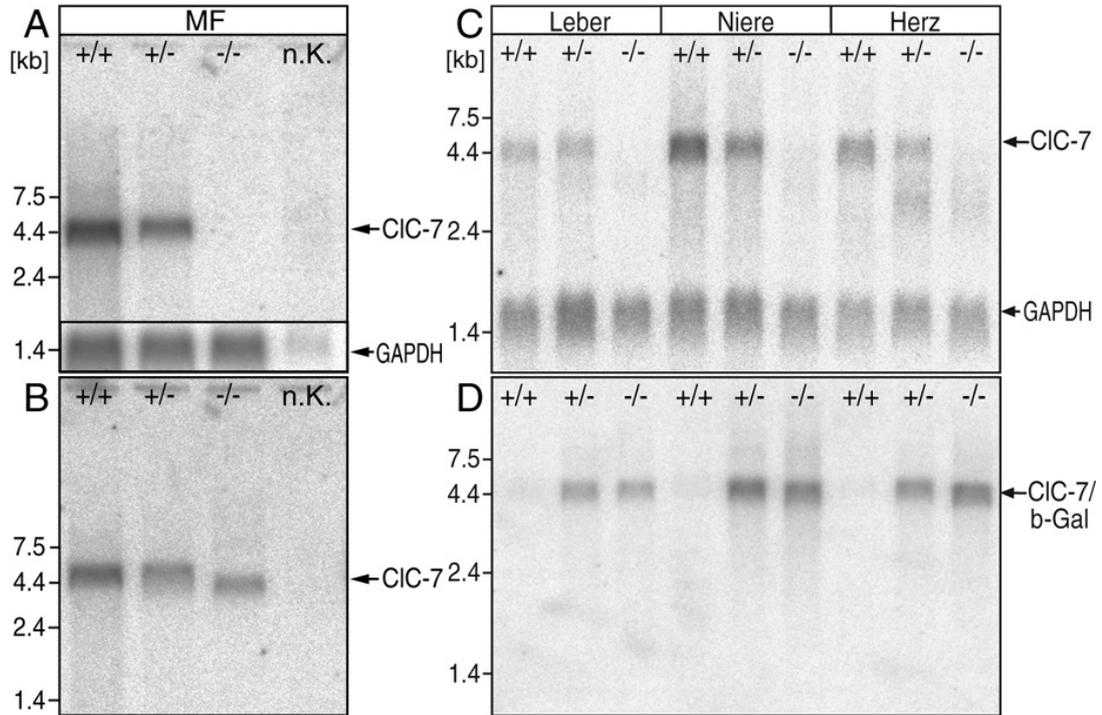


Abbildung 2.3: Northern-Blot Analyse der Expression von CIC-7 in RNA aus Fibroblasten und Geweben der verschiedenen Genotypen. (A,B) RNA aus Fibroblasten (MF) von Tieren der Linie C7A. (A) Hybridisierung mit Sonde C7Del, die dem durch das Gen-Targeting deletierten Abschnitt der cDNA entspricht. Das Signal für CIC-7 ist in der *Clcn7^{-/-}*-RNA nicht vorhanden. Unten im Bild wurde das Signal nach Hybridisierung des gleichen Blots mit der GAPDH-Sonde hineinmontiert. Die gleich starken Banden sprechen für eine gleichmäßige Beladung der Spuren. (B) Hybridisierung mit einer 3'-Sonde. In der *Clcn7^{-/-}*-Spur erscheint ein auf ca. 4 kb verkürztes Transkript, das vermutlich durch Exon-Skipping entstanden ist. (C,D) RNA aus Leber, Niere und Herz von Tieren der Linie C7B. (C) Hybridisierung mit einer 3'-Sonde. In der *Clcn7^{-/-}*-Spur findet sich ein schwaches Signal bei etwa 3 kb, wiederum vermutlich durch Exon-Skipping. (D) Hybridisierung mit der *lacZ*-cDNA. Nur in der *Clcn7^{+/-}*- und in der *Clcn7^{-/-}*-Spur erscheint ein ca. 4,4 kb großes Signal. Das in den *Clcn7*-Locus inserierte *lacZ*-Gen scheint transkribiert zu werden. n.K.= Negativkontrolle. GAPDH= Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase.

wie die Wildtyp-mRNA. Dies belegte, dass das Einfügen der *lacZ*-cDNA in Exon 7 von CIC-7 tatsächlich die Expression einer mRNA zur Folge hatte, die aus dem 5'-Teil von CIC-7 und der *lacZ*-Sequenz bestand.

Um sicher zu sein, dass die im Knockout detektierten kleineren Banden keine mRNA repräsentierten, die zur Bildung eines mehr oder weniger großen Teils des CIC-7 Proteins führen könnten, wurde eine RT-PCR Analyse durchgeführt. Nach dem Umschreiben der RNA in cDNA mit Reverser Transkriptase ließen sich durch verschiedene Oligonukleotid-Kombinationen

bestimmte Sequenzabschnitte durch PCR amplifizieren und anschließend sequenzieren (siehe Abbildung 2.4). Lag eines der Oligonukleotide in dem durch homologe Rekombination deletierten Abschnitt, so blieb die Amplifikation erfolglos, was die Daten aus der Northern-Blot Hybridisierung mit Sonde C7Del bestätigte. Überspannte jedoch ein Primerpaar den deletierten Abschnitt, so wurden verkürzte, oft multiple PCR-Produkte erzeugt.

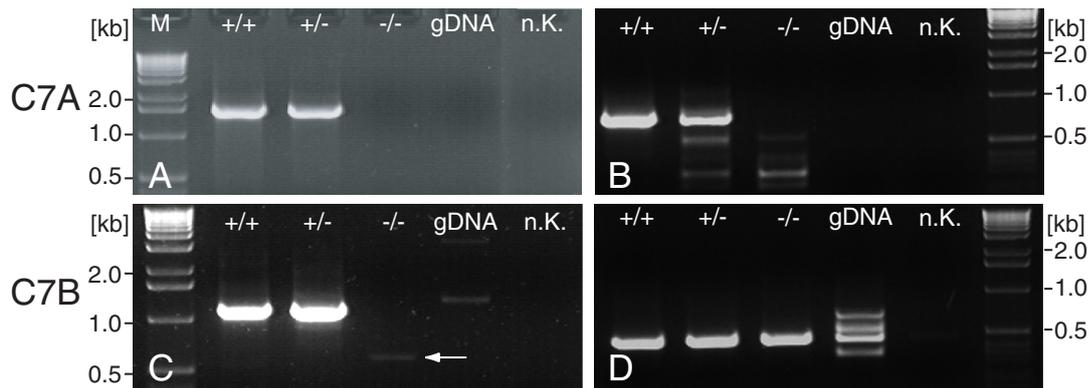


Abbildung 2.4: RT-PCR Analyse der Expression von *Clc-7* in RNA von Linie C7A und C7B. (A,B)RNA aus MF von Linie C7A. (A) Amplifikation mit einem vor der Deletion und einem in der Deletion liegenden Oligonukleotid (7A14/7CD4). In der *Clcn7^{-/-}*-RNA ist kein *Clc-7* nachweisbar. (B) Vor und hinter der Deletion liegende Oligonukleotide (7A10/7R16). Durch disorganisiertes Exon-Skipping entstehen in *Clcn7^{+/-}* und *Clcn7^{-/-}* mehrere Banden, die kleiner als die Wildtyp-Bande sind. (C,D) RNA aus Leber von Linie C7B. (C) Vor und hinter der Deletion liegende Oligonukleotide (7A14/7M1). Eine schwache, gegenüber dem Wildtyp kleinere Bande ist in *Clcn7^{-/-}* zu erkennen. (D) Amplifikation mit gegen α -Tubulin gerichteten Oligonukleotiden (α Tuf/ α Tur). In allen Spuren finden sich starke Signale, d. h. in allen PCR Reaktionen für die verschiedenen Genotypen befand sich cDNA. gDNA= genomische DNA. Diese wurde eingesetzt, um sicherzustellen, dass die Signale nicht durch Verunreinigung der cDNA mit genomischer DNA hervorgerufen wurden. n.K.= Negativkontrolle.

Wie die Sequenzierung ergab, lag der Grund hierfür in einem Exon-Skipping, das zu einer Verknüpfung des letzten Exons vor der Deletion mit einem der Exone nach der Deletion führte. Im Fall von Vektor C7A führte dieser Mechanismus teilweise zu mRNA mit erhaltenem Leserahmen, so dass die Translation eines *Clc-7* Fragmentes theoretisch möglich wäre. Die Deletion von Exon 7 bis 10 durch Vektor C7B rief hauptsächlich ein alternatives Spleißprodukt hervor, das ein verfrühtes Stop-Codon durch eine Verschiebung des Leserahmens aufwies. Die Expression eines Teils von *Clc-7* über den mit der β -Galaktosidase verknüpften N-Terminus hinaus erschien daher in diesem Fall sehr unwahrscheinlich.

2.2.2 Detektion von CIC-7 im Western-Blot

Um mit Sicherheit davon ausgehen zu können, dass das Gen-Targeting zu einem Fehlen von CIC-7 führt, wurden Gewebehomogenate von Wildtyp- und *Clcn7*^{-/-}-Tieren beider Linien mittels eines gegen den N-Terminus von CIC-7 gerichteten Antikörpers im Western-Blot untersucht (siehe Abbildung 2.5). Entsprechend den Resultaten aus der Analyse der RNA konnte in (-/-) Geweben von Linie C7A kein CIC-7 nachgewiesen werden, während in der Wildtyp-Kontrolle die erwartete Bande bei etwa 80 kDa zu sehen war. Im Homogenat von Linie C7B trat dagegen eine ca. 130kDa Bande auf, die dem Fusionsprotein aus dem N-Terminus von CIC-7 und der β -Galaktosidase entsprach. Beide Gen-Targeting Strategien führten also zu einer Abwesenheit von funktionellem CIC-7 in allen untersuchten Geweben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein aus CIC-7 und der β -Galaktosidase unter Kontrolle des CIC-7 Promoters in Linie C7B exprimiert wurde.

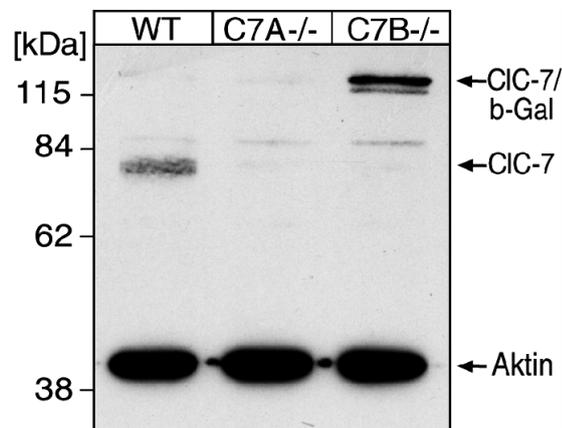


Abbildung 2.5: Western-Blot Analyse der Expression von CIC-7 in Proteinextrakten von *Clcn7*^{-/-}-Gewebe aus Linie C7A und C7B im Vergleich zum Wildtyp (WT). Das Wildtyp-Signal bei etwa 80kDa ist in C7A^{-/-} nicht vorhanden, während bei C7B^{-/-} das β -Galaktosidase/CIC-7-Fusionsprotein (b-Gal/CIC-7) bei ca. 130kDa detektiert wird. Gleich starke durch einen gegen Aktin gerichteten Antikörper hervorgerufene Signale belegen die gleichmäßige Beladung der Gelspuren.

2.3 Expression von CIC-7 im Embryo

Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass die Expression von CIC-7 bereits in frühen embryonalen Entwicklungsstadien nachweisbar ist (Brandt und Jentsch, 1995). Es erschien daher sinnvoll, die Lokalisation von CIC-7 zunächst an Embryonen zu untersuchen, da alle Gewebe auf einem Gewebeschnitt zu übersehen und die Stärke der Expression in den jeweiligen Geweben daher gut miteinander zu vergleichen ist. Durch das Einfügen von *lacZ* in

das Gen *Clcn7* in Linie C7B stand neben den üblichen Verfahren der *in situ* Hybridisierung und der Immunhistochemie die Färbung mit X-Gal als Detektionsmethode zur Verfügung. X-Gal ist ein Galaktose-Derivat, das durch die β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Zur Herstellung der Sonde für die *in situ* Hybridisierung diente ein Fragment der cDNA, das dem durch das Gen-Targeting deletierten Teil der CIC-7 cDNA entsprach. Dies Fragment wurde in einen Vektor eingefügt, der es erlaubte, durch *in vitro* Transkription radioaktiv markierte Sense- und Antisense-Sonden herzustellen. Sowohl die *in situ* Hybridisierung als auch die X-Gal Färbung wurde an aufeinanderfolgenden Serien-Gefrierschnitten von 16,5 Tage alten Embryonen aller Genotypen der Linie C7B durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt sind alle Organsysteme schon weitgehend ausgebildet, wenn auch Nervensystem und Retina noch unreif sind.

Beide verwendeten Detektionsmethoden ergaben keinerlei unspezifische Signale (siehe Abbildung 2.6(A-D)). Die Hybridisierung der Antisense-Sonde war negativ im *Clcn7*^{-/-} Embryo und die X-Gal Färbung war negativ im *Clcn7*^{+/+} Embryo, der keine β -Galaktosidase-Aktivität aufweisen sollte. Es fiel auf, dass die *in situ* Hybridisierung sensitiver war und die im Allgemeinen in jedem (bisher untersuchten) Zelltypus des Organismus anzutreffende basale Expression von CIC-7 durch ein gleichmäßiges Hintergrundsignal gut widerspiegelte. Die X-Gal gefärbten Schnitte hingegen wiesen einen in der Übersicht kaum wahrnehmbaren Hintergrund auf. Am deutlichsten angefärbt waren jedoch exakt jene Gewebe, die ebenfalls in der *in situ* Hybridisierung die stärksten Signale aufwiesen. Hierbei handelte es sich einerseits um neuronale Gewebe wie Gehirn, Dorsalganglien, Trigeminalganglien, Rückenmark und die Retina. Andererseits waren Herz, Haut, und die noch größtenteils knorpeligen Knochen in beiden Methoden stark positiv.

Angesichts der Skelettveränderungen in den *Clcn7*^{-/-}-Tieren wurden die in den Knochen auftretenden Signale näher untersucht (siehe Abbildung 2.6(E)). Es stellte sich heraus, dass es sich um einzelne, recht große Zellen handelte, die lediglich in knöchernen Kernen der knorpeligen Knochen anzutreffen waren. In einer solchen Lokalisation sind lediglich Osteoblasten, die Knochen bildenden Zellen, und Osteoklasten, die Knochen abbauenden Zellen, zu erwarten. Die beträchtliche Größe der angefärbten Zellen legte die Vermutung nahe, dass es sich um Osteoklasten handeln könnte.

2.4 Der Phänotyp der *Clcn7*^{-/-}-Maus

2.4.1 Makroskopische Veränderungen

Obwohl die Strategien zum Ausschalten des Gens *Clcn7* sich erheblich unterschieden, war der Phänotyp von *Clcn7*^{-/-}-Tieren der Linie C7A und der Linie C7B identisch. Zunächst war eine erhöhte Lethalität in den ersten zwei Lebenswochen auffällig. Während die Genotypisierung von Embryonen den zu erwartenden Anteil von 25% *Clcn7*^{-/-}-Tieren ergab, sank diese Zahl bis zum 14. Lebenstag (P14) auf etwa 15%. D. h. 2/5 der Knockout Tiere starb während dieser Zeit aus unbekanntem Gründen.

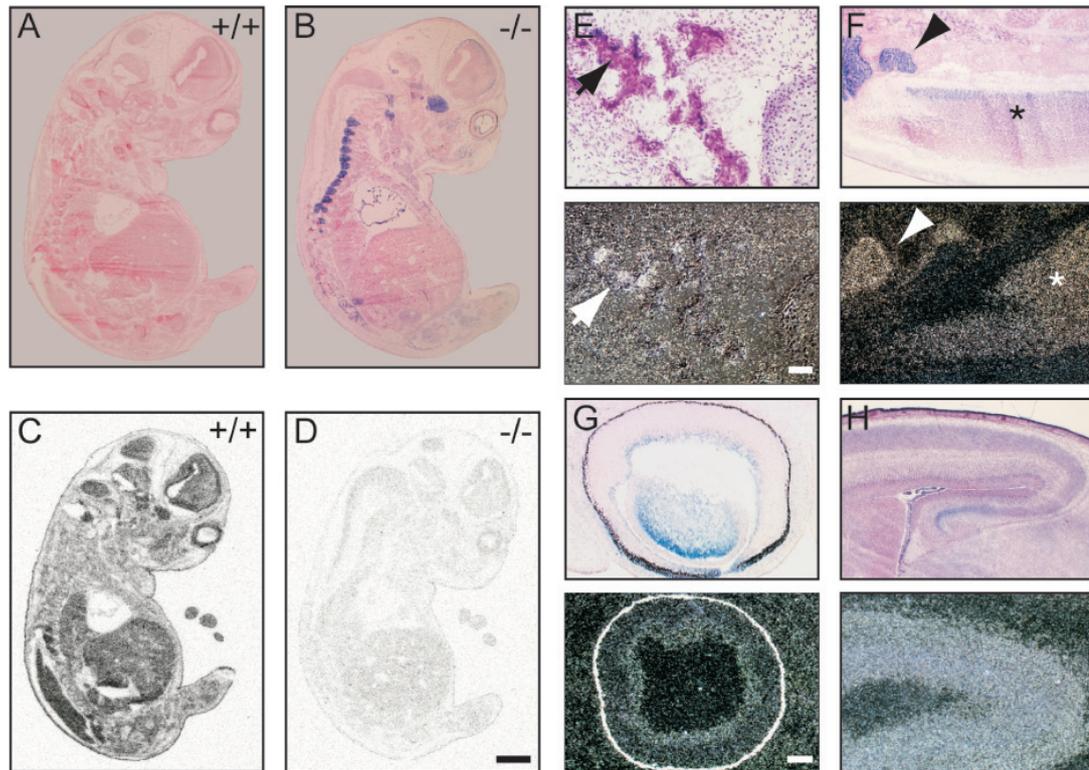


Abbildung 2.6: (A-D) X-Gal-Färbung (blau) mit Eosin-Gegenfärbung (rot) und *in situ* Hybridisierung (schwarz) von *Clcn7*^{+/+}- und *Clcn7*^{-/-}-Embryonen von Tag E16,5 in der Übersicht. (E-H) Gewebe, die *Clcn7* besonders hoch exprimieren, in stärkerer Vergrößerung. Gegenüberstellung von X-Gal-Färbung (blau) an *Clcn7*^{-/-}-Gewebeschnitten mit Eosin-Gegenfärbung (oben) und *in situ* Hybridisierung an *Clcn7*^{+/+}-Gewebeschnitten nach Entwicklung mit Fotoemulsion (unten). (E) Blau gefärbte Osteoklasten im Kieferknochen (Pfeil). (F) Dorsalganglien (Pfeilspitze) und Rückenmark (*) sind X-Gal positiv. (G) Färbung von Linse und Retina im sich entwickelnden Auge. (H) Färbung im entstehenden Großhirn. Größenmaßstäbe: (A-D) 1mm, (E-H) 100µm

Nachdem ihr äußerer Aspekt in den ersten Tagen nach der Geburt nicht wesentlich vom Wildtyp abwich, ließen sich *Clcn7*^{-/-}-Tiere im Alter von zwei Wochen (P14) sicher von ihren heterozygoten und Wildtyp-Geschwistern dadurch unterscheiden, dass sie kleiner waren und keine Zähne sichtbar waren (siehe Abbildung 2.7). Die Tiere erhielten daher ab der dritten Lebenswoche ein spezielles Flüssigfutter.

Durch das Fehlen der im Verhältnis sehr großen Nagezähne wirkte die Schnauze verkürzt und der Schädel insgesamt erschien plumper. Mit zunehmendem Alter kam es zu einem charakteristischen Hängen des Oberlides (Ptose) und einem verstärkten Tränen der Augen. In der vierten Lebenswoche trat eine gekrümmte Haltung auf (Kyphosierung) und die Bewegungen wurden insgesamt unsicherer (ataktisch). Die Fellpflege ließ nach und der Allgemeinzustand

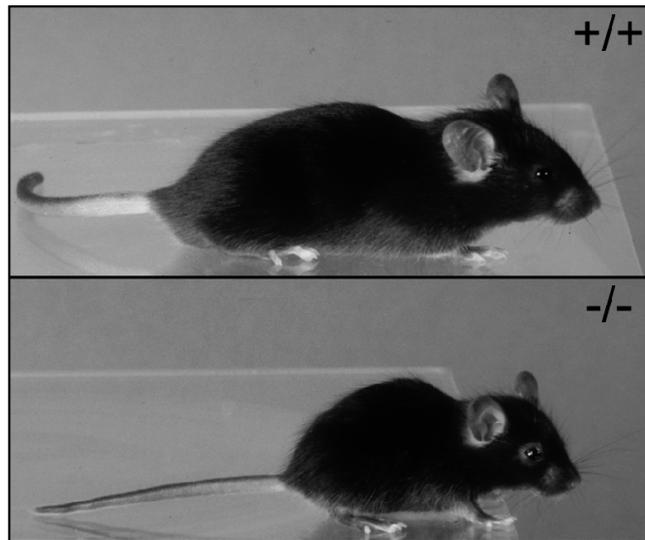


Abbildung 2.7: 28 Tage alte $Clcn7^{-/-}$ -Maus und Wildtyp-Geschwister

der Tiere verschlechterte sich rapide, bis sie schließlich im Alter von maximal 45 Tagen aus bisher unbekannter Ursache verstarben. Es konnte weder ein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden, noch wich der Phänotyp heterozygoter Tiere von dem des Wildtyps ab.

Die oben geschilderte Entwicklung der $Clcn7^{-/-}$ -Maus spiegelt sich auch in der zeitlichen Veränderung ihres Körpergewichts wider (siehe Abbildung 2.8).

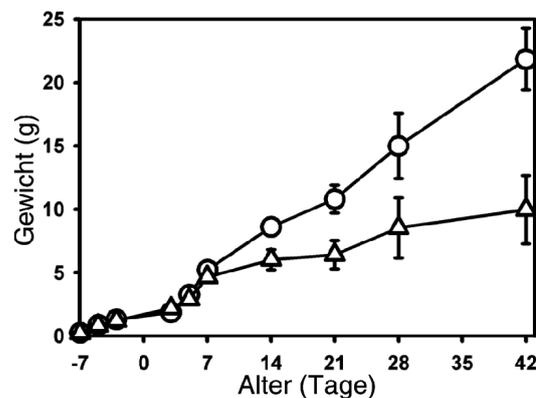


Abbildung 2.8: Vergleich der Entwicklung des Körpergewichts von $Clcn7^{-/-}$ -Tieren (Δ) und Wildtyp-, bzw. heterozygoten Geschwister (O) innerhalb der ersten 6 Lebenswochen.

Während der vorgeburtlichen Entwicklung (Tage -7 bis 0) entspricht das Gewicht von $Clcn7^{-/-}$ -Tieren dem Durchschnitt. Ab Tag 7, wenn normale Tiere einen Wachstumsschub

erfahren, kam es zu einer erheblichen Reduktion der Gewichtszunahme der *Clcn7^{-/-}*-Jungen. Die Gewichts Differenz nahm in der folgenden Zeit zu, obwohl durch die Verabreichung von Flüssigfutter und die Belassung der *Clcn7^{-/-}*-Jungen beim Muttertier nach dem Absetzen der normalen Geschwister eine ausreichende Nahrungsaufnahme gewährleistet war. Die stark abgeflachte Gewichtskurve ließ sich daher am ehesten durch ein beeinträchtigtes Längenwachstum erklären.

Es wurden ebenfalls Gewichte einzelner Organe bestimmt und verglichen. Um dem geringeren Körpergewicht der *Clcn7^{-/-}*-Mäuse Rechnung zu tragen, wurden die Organgewichte in mg auf das Körpergewicht in g bezogen. Es stellte sich heraus, dass die Milz im Knockout erheblich vergrößert war (KO: $10.1 \pm 1.3 \text{ mg/g}$; WT/HZ: $5.0 \pm 1.0 \text{ mg/g}$).

2.4.2 Röntgenbefunde und Histologie der Tibia

Eine fehlerhafte Zahnentwicklung ist bei Mäusen oft mit Skelettanomalien vergesellschaftet (Tiffée et al., 1999). Da *Clcn7^{-/-}*-Tiere außerdem ein gestörtes Längenwachstum aufwiesen, wurden Kontakt-Röntgenaufnahmen von fünf Wochen alten Tieren angefertigt, um einen Überblick über den Zustand des Skeletts zu erhalten (siehe Abbildung 2.9(A)).

Neben dem allgemeinen Größenunterschied zwischen den beiden Tieren fiel in der Aufnahme vor allem das stark abweichende Aussehen der Röhrenknochen im *Clcn7^{-/-}*-Tier auf. Humerus, Femur und Tibia waren nicht nur stark verkürzt, sondern erschienen an den Enden keulenförmig aufgetrieben und hatten keine erkennbare Markhöhle. Noch deutlicher wurde dies in der Einzelaufnahme der Tibia (siehe Abbildung 2.9(B)). Um festzustellen, welches Material zum Verschluss der Markhöhle geführt hatte, wurden in der Abteilung für Osteopathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf Methacrylatschnitte der Tibiae angefertigt. Es ist in der Übersichtsaufnahme deutlich zu erkennen, dass der Markraum des Schienbeinknochens mit verkalktem Knochengewebe angefüllt ist, das durch die von-Kossa-Färbung schwarz hervortritt (siehe Abbildung 2.9(C)). Das röntgenologische und histologische Bild der Röhrenknochen der *Clcn7^{-/-}*-Maus entspricht daher dem der Osteopetrose, auch Marmor-Knochenkrankheit genannt. Der osteopetrotische Verschluss des Markraumes zwingt das blutbildende Gewebe dazu, sich in Leber und Milz anzusiedeln, die hierdurch oft vergrößert sind.

2.4.3 Degeneration von Retina und Sehnerv

Das klinische Erscheinungsbild der humanen Osteopetrose, vor allem der infantilen Form, beinhaltet regelmäßig einen Visusverlust bis hin zur völligen Erblindung (Gerritsen et al., 1994). Um zu überprüfen, ob dies auch in *Clcn7^{-/-}*-Mäusen der Fall ist, wurden Augen von Tieren verschiedener Altersstufen histologisch untersucht. Während an Tag P14 das Erscheinungsbild der Retina von *Clcn7^{-/-}*-Tieren noch dem normaler Tiere entsprach, wurde bei Tag P22 ein Verlust an Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht (ONL) deutlich (siehe Abbildung 2.10). Die äußeren Segmente (OS) der Photorezeptoren erschienen zu diesem Zeitpunkt außerdem verkürzt. Die weitere Analyse bei P16, P18, P22 und P25 ergab, dass der

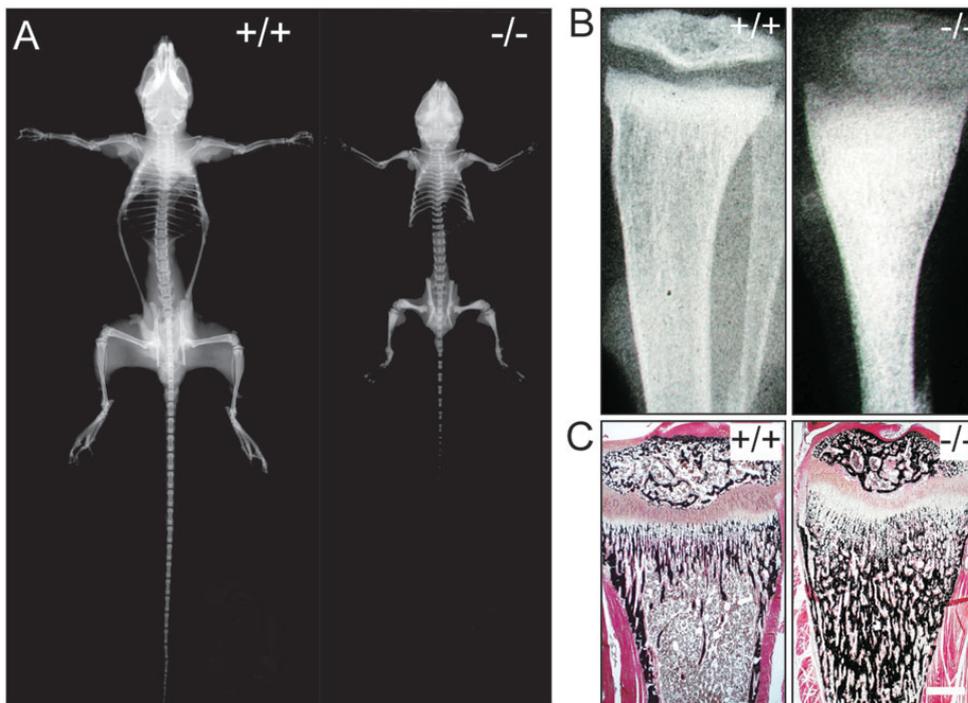


Abbildung 2.9: (A) Kontakt-Röntgenaufnahme eines Wildtyp-Tieres (+/+) und eines *Clcn7*^{-/-}-Geschwisters (-/-) an Tag P35. (B) Einzelaufnahmen zweier Tibiae. (C) Von Kossa gefärbte Methacrylat-Schnitte der gleichen Tibiae. Größenmaßstab: 0,5mm.

degenerative Prozess schon bei P16 in Form einer Verkleinerung der äußeren Segmente (OS) der Photorezeptoren seinen Anfang nahm (Daten hier nicht gezeigt).

Als Ursache für den Visusverlust bei Osteopetrose-Patienten wird meist die Kompression des Sehnervs diskutiert. Der Sehnerv verläßt die mittlere Schädelgrube durch einen knöchernen Kanal (Canalis opticus), um in die Augenhöhle (Orbita) zu gelangen. Da sich bei der Osteopetrose auch in den Knochen der Schädelbasis nicht ausreichend resorbiertes Knochenmaterial anhäuft, kann es zu einer Verengung des Kanals und hierdurch zu einer Druckschädigung des Sehnerven kommen. Die Verengung läßt sich in vielen Fällen durch Computertomographie nachweisen (Elster et al., 1992). Jedoch gibt es eine erhebliche Anzahl von Patienten, bei denen dieser Nachweis nicht gelingt, so dass hier eine andere Ursache für den Visusverlust vermutet wird.

Um den Canalis opticus zu beurteilen, wurden in der Abteilung für Osteopathologie Micro-CT Aufnahmen sowie histologische Schnitte von Maus-Schädeln angefertigt (siehe Abbildung 2.11).

Der Vergleich des *Clcn7*^{-/-}-Schädels mit dem des Wildtyps im Computertomogramm

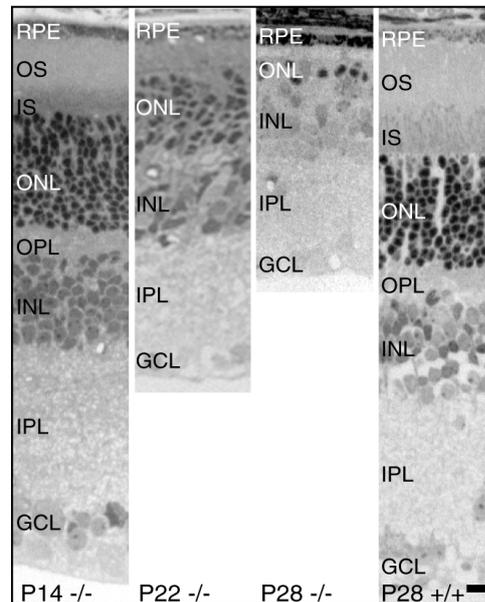


Abbildung 2.10: Semidünnschnitte der Retina von *Clcn7*^{-/-} bei Tag P14, P22 und P28. Färbung mit Toluidinblau. Da die Retina im Wildtyp zwischen P14 und P28 keinen wesentlichen histologischen Änderungen unterliegt, wurde den *Clcn7*^{-/-}-Präparaten lediglich ein Wildtyp-Präparat von P28 gegenübergestellt. Bei P22 sind die äußeren Segmente (OS) bereits verkürzt und die Zahl der Zellkerne in der ONL dezimiert. An Tag P28 sind keine OS und nur noch wenige Kerne in der ONL zu sehen. GCL=Ganglienzellschicht, IPL=Innere plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerzellschicht, OPL=Äußere plexiforme Schicht, ONL=Äußere Körnerzellschicht, IS=Innere Segmente der Photorezeptoren, OS=Äußere Segmente der Photorezeptoren, RPE=Retinales Pigmentepithel. Größenmaßstab: 10 μ m

zeigt die massive Manifestation der Osteopetrose auch in diesem Teil des Skeletts. Das Schädeldach ist erheblich dicker und der Schädel insgesamt erscheint gestaucht. Die Kieferhöhle (Sinus maxillaris) im *Clcn7*^{-/-}-Schädel ist nicht mehr zu erkennen, da sie vollständig mit Knochen angefüllt ist. Der Canalis opticus wird durch einen Fortsatz des Kieferknochens vor dem Ausgang zur Augenhöhle erheblich eingeengt. Im Wildtyp ist dieser Knochenfortsatz kaum vorhanden. Es schien daher wahrscheinlich, dass der Sehnerv bei der Passage dieser Engstelle geschädigt werden könnte. Histologische Schnitte durch die Schädelbasis bestätigten diese Vermutung. Der Sehnerv wirkte vor und nach Passage der Engstelle im Canalis opticus blass und atrophisch. Der Phänotyp der *Clcn7*^{-/-}-Maus kommt also auch in dieser Hinsicht der menschlichen Osteopetrose sehr nahe. Die Form der Retinadegeneration jedoch schließt eine Schädigung des Sehnervs als Ursache weitgehend aus, da hierdurch die Ganglienzellen und nicht die Photorezeptoren primär betroffen sein müssten.

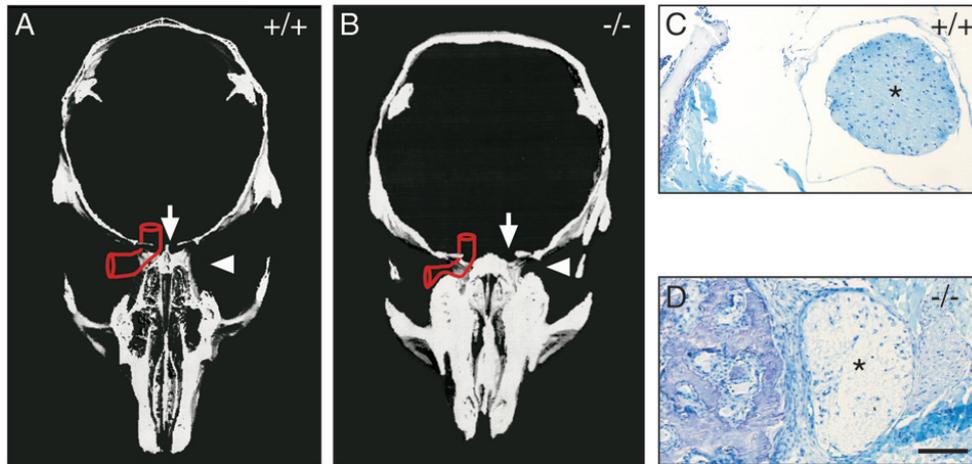


Abbildung 2.11: (A,B) Micro-CT auf Höhe der Schädelbasis. Wildtyp und *Clcn7*^{-/-}-Tier waren 39 Tage alt. Der Canalis opticus ist schematisch in Rot dargestellt. Der Pfeil bezeichnet den Anfang des Kanals in der Schädelgrube und der Pfeilkopf das Ende in der Augenhöhle. (C,D) Schnitt durch den Sehnerv (*) auf Höhe der engsten Stelle des Canalis opticus. Färbung Toluidinblau, Größenmaßstab: 100µm.

2.4.4 Anzeichen für eine neuronale Speicherkrankheit

Zusätzlich zum Visusverlust kann es in einzelnen Fällen von maligner Osteopetrose auch zu einer zerebralen Neurodegeneration kommen, die sich u.a. in geistiger Retardierung und Krampfanfällen äußert (Gerritsen et al., 1994). Dies und die Tatsache, dass CIC-7 auch im ZNS nachgewiesen wurde, veranlasste eine detaillierte histologische Untersuchung des Gehirns von *Clcn7*^{-/-}-Mäusen.

Bereits in Nissl gefärbten Serienschritten des Gehirns erschienen die corticalen und hippocampalen Neuronen in älteren Knockout-Tieren angeschwollen. Außerdem fand sich eine etwa bei P21 beginnende Degeneration der CA3-Region des Hippocampus, die bei P35 vollständig war (siehe Abbildung 2.12).

Eine immunhistologische Färbung der Astroglia durch einen Antikörper gegen das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) zeigte eine deutliche, mit dem Alter zunehmende Astrogliose zuerst zentraler Bereiche des Hirns, die sich dann aber sukzessive in den Cortex ausbreitete. Dies war ein sicheres Zeichen für eine globale Neurodegeneration im Knockout-Gehirn, auch wenn der Verlust von Neuronen sich nur im Hippocampus drastisch darstellte (siehe Abbildung 2.13).

Die naheliegendste gemeinsame Erklärung für diese Beobachtungen war eine neuronale Speicherung von nicht korrekt abgebautem Material. Da solches Material oft Autofluoreszenz zeigt, wurden ungefärbte Hirnschnitte unter dem UV-Mikroskop untersucht. Tatsächlich fand sich eine nur im Knockout zu beobachtende Autofluoreszenz in Neuronen des Cortex und des

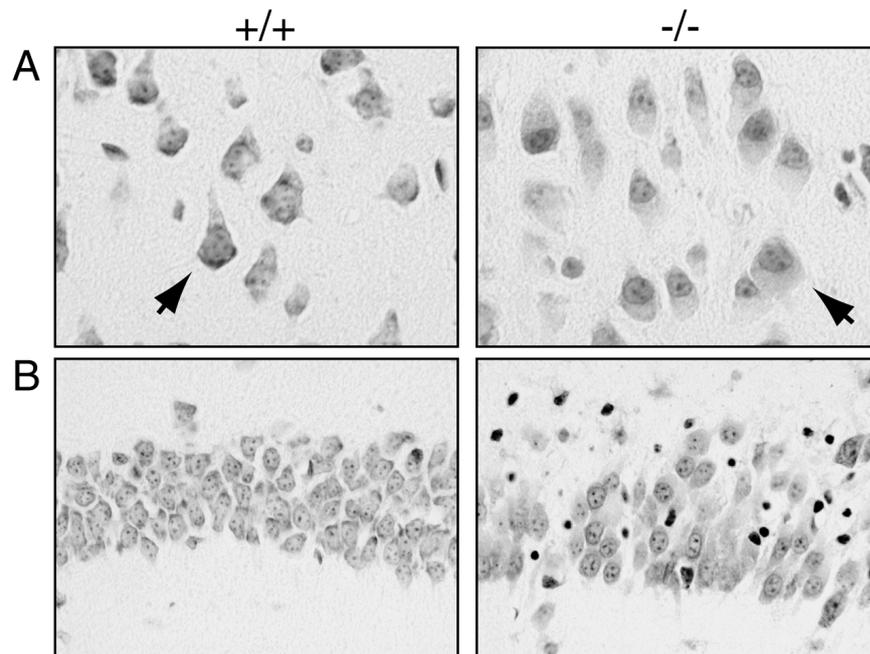


Abbildung 2.12: Nissl-Färbung von Cortex (A) und Hippocampus (B) von *Clcn7*^{-/-}-Gehirn und Wildtyp-Kontrolle an Tag P35. Sowohl die corticalen als auch die hippocampalen *Clcn7*^{-/-}-Neuronen wirken geschwollen. Die Pfeile weisen auf repräsentative corticale Pyramidenzellen hin. Die Zellarchitektur des abgebildeten CA2-Bereiches des Hippocampus erscheint im *Clcn7*^{-/-}-Gewebe desorganisiert. Die dunkel angefärbten Punkte repräsentieren abgestorbene Zellen, die ausschließlich im Knockout auftreten. Vergrößerung: 400fach.

Hippocampus (siehe Abbildung 2.14) . Eine andere Eigenschaft vieler zellulärer Speichersubstanzen ist ihre Anfärbbarkeit mit PAS (Periodsäure-Schiff)-Reagenz. Auch im *Clcn7*^{-/-}-Hirn färbten sich die geschwollen erscheinenden Neuronen schwach in der PAS-Färbung, während im Wildtyp lediglich eine leichte Anfärbung des die Zellen umgebenden Gewebes zu beobachten war.

Um die Ultrastruktur der Ablagerungen aufzuklären, die durch den Vergleich mit bekannten Ultrastrukturen Hinweise auf die Zusammensetzung des gespeicherten Materials geben könnte, wurden von Frau Dr. Schweizer aus der Abteilung für Morphologie des ZMNH Ultradünnschnitte von parietalem Cortex eines 5 Wochen alten *Clcn7*^{-/-}-Tieres angefertigt und unter dem Elektronenmikroskop untersucht (siehe Abbildung 2.15). Es zeigten sich multiple Ablagerungen im Cytoplasma der corticalen Neuronen mit amorpher Struktur. Es war bislang nicht möglich, aus den verschiedenen Befunden eindeutige Rückschlüsse auf die Natur der gespeicherten Substanzen zu ziehen. Wie im Folgenden noch näher beschrieben wird, paßt das Auftreten von zellulären Ablagerungen aber sehr gut in das Bild der Funktion von ClC-7, das

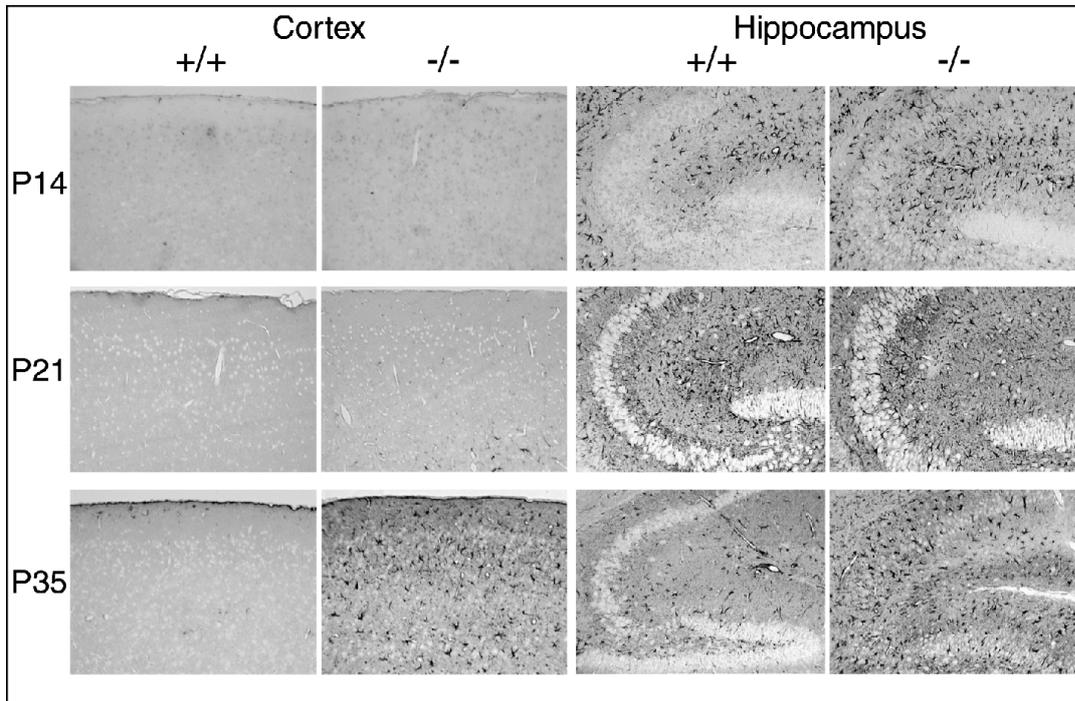


Abbildung 2.13: Immunhistochemischer Nachweis von Astroglia durch einen Antikörper gegen Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in *Clcn7*^{-/-}-Gehirn und Wildtyp-Kontrolle verschiedener Altersstadien. Astrogliazellen treten im *Clcn7*^{-/-}-Cortex zuerst um Tag P21 auf (siehe unterer Bildrand). Bei Tag P35 ist der gesamte Cortex durchsetzt. Im *Clcn7*^{-/-}-Hippocampus sind auch um Tag P14 schon geringfügig mehr Astrogliazellen zu sehen. Bei P35 ist dieser Unterschied aber deutlich ausgeprägter. In diesem Alter ist auch eine Abnahme der Neuronenzahl vor allem in der CA3-Region des Hippocampus evident. Vergrößerung 200fach.

sich im Laufe der Analyse des *Clcn7*^{-/-}-Tiermodells zunehmend verdeutlichte.

2.4.5 Analyse von Blut und Urin

Im Rahmen des Screenings nach möglichen pathologischen Veränderungen wurden auch Standardparameter in Blut und Urin untersucht. Die hierfür verwendeten Tiere waren zwischen 21 und 42 Tage alt. Um optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden immer parallel Proben von einem *Clcn7*^{-/-}-Tier und zwei bis drei unter möglichst gleichen Bedingungen gehaltenen Geschwistertieren entnommen. Angesichts des starken Effekts des Fehlens von CIC-7 wiesen die *Clcn7*^{-/-}-Tiere bemerkenswert wenige Abweichungen von den Serumwerten der Vergleichstiere auf. Die einzige signifikante Veränderung bestand in einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase (AP), die von den Zellen der Gallenwege und von Osteoblasten gebildet wird. Dieser Wert reflektierte daher am wahrscheinlichsten die erhöhte Gesamtzahl von Osteo-

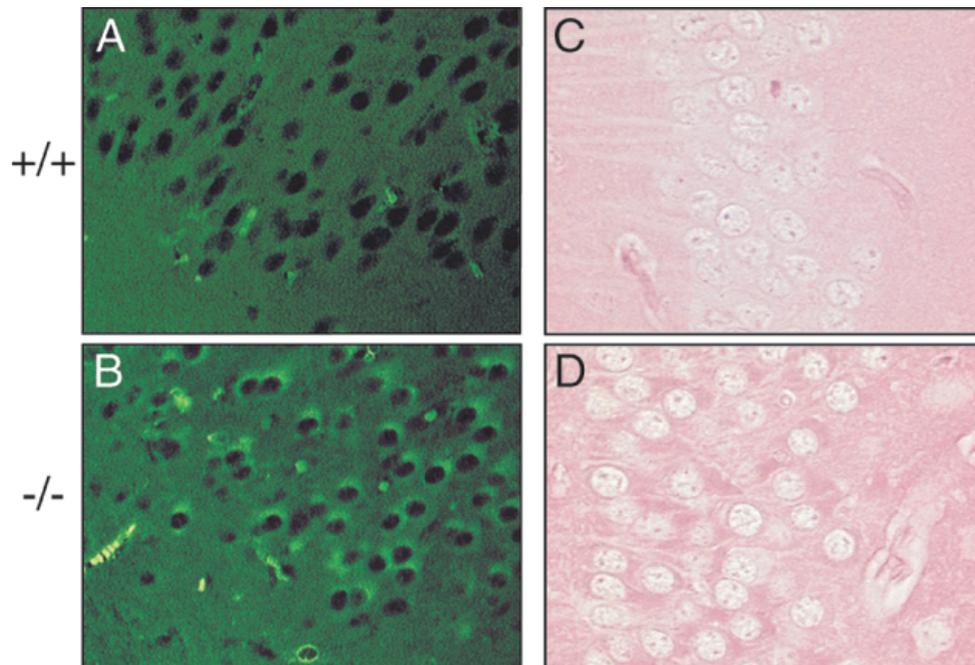


Abbildung 2.14: Nachweis von intrazellulären Ablagerungen im $Clcn7^{-/-}$ -Gehirn. (A,B) Autofluoreszenz von Neuronen des parietalen Cortex. Die Kerne der Zellen sind als dunkle Punkte in der leichten Hintergrundfluoreszenz des Hirngewebes zu erkennen. Nur im $Clcn7^{-/-}$ -Gehirn fand sich eine Autofluoreszenz des neuronalen Cytoplasmas um den dunklen Zellkern herum. Hell leuchtende kleinere Strukturen entsprechen z.B. Erythrozyten. (C,D) Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS) von Neuronen des Hippocampus. Nur im Knockout war das Cytoplasma der Zellen verstärkt gefärbt, während im Wildtyp nur die Zellkerne als Aufhellungen in der schwachen Hintergrundfärbung zu erkennen sind. Vergrößerung: (A,B) 400fach; (C,D) 630fach.

blasten auf der durch die Osteopetrose vergrößerten Oberfläche der $Clcn7^{-/-}$ -Knochen. Der Hämatokrit, d. h. der Anteil roter Blutkörperchen am Gesamtvolumen der untersuchten Blutprobe, zeigte eine deutliche Erniedrigung im Knockout (KO: $34 \pm 2\%$; WT/HZ: $45 \pm 1\%$). Dies ist als eine Konsequenz der Verdrängung des blutbildenden Gewebes aus dem osteopetrotischen Knochen zu werten. Ungleich komplexer als die Analyse der Serumwerte ist die Auswertung der Urinparameter. Während die Zusammensetzung des Serums innerhalb sehr enger Grenzen konstant gehalten wird, ist die je nach Bedarf stark wechselnde Ausscheidungsfunktion der Niere gerade die Voraussetzung für ein konstantes inneres Milieu. Es wurde in achtstündigen Aufenthalten in metabolischen Käfigen parallel von Knockout- und Wildtyp-Geschwistertieren Urin gesammelt. Alle Tiere hatten zuvor für mindestens 2 Tage Flüssigfutter bekommen. Trotz dieser Maßnahmen unterlagen die erhaltenen Urinwerte großen Schwankungen (siehe Abbildung 2.16).

Das Körpergewicht wurde in die Grafik eingeschlossen, um die relative Homogenität der

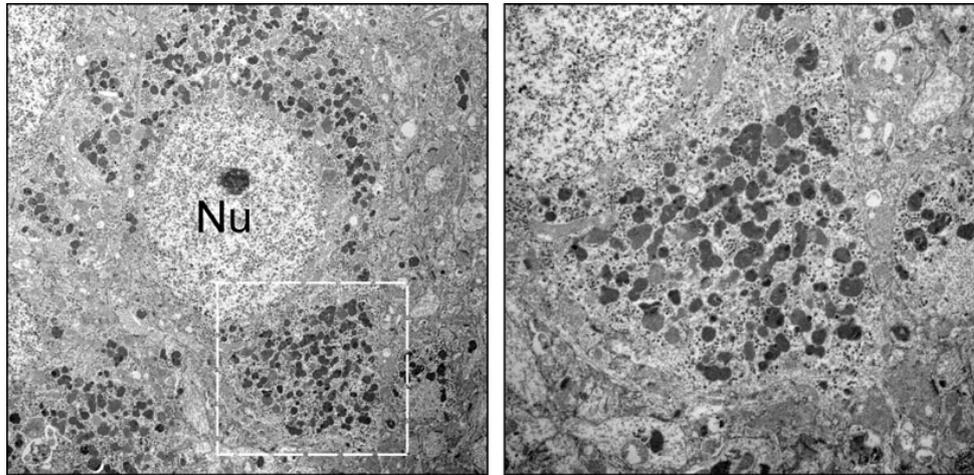


Abbildung 2.15: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur der neuronalen Ablagerungen in corticalen *Clcn7*^{-/-}-Neuronen. Links 2000fache Vergrößerung eines Neurons. Rechts weitere Vergrößerung eines durch gestrichelte Linien gekennzeichneten Ausschnitts des linken Bildes, um die Binnenstruktur der Einschlüsse darzustellen. Nu= Zellkern.

Testgruppen zu illustrieren und um zu verdeutlichen, dass die *Clcn7*^{-/-}-Tiere erheblich leichter waren, wodurch verschiedene Parameter beeinflusst werden können. Ein Beispiel ist die Kreatinin-Konzentration im Urin, die von der Muskelmasse abhängig ist. Trotz des Gewichtsunterschieds zwischen Wildtyp und Knockout war die Kreatinin-Konzentration jedoch exakt gleich. Da dies ein Hinweis auf eine vergleichbare renale Filtrationsrate ist, erscheint der direkte Vergleich der übrigen Messwerte legitim. Von den Elektrolyten war lediglich Phosphat signifikant niedriger im Knockout, Kalzium zeigte nur einen nicht signifikanten Trend zu niedrigeren Werten. Der pH-Wert war leicht erniedrigt und die Konzentration von Glukose erhöht, jedoch mit einer erheblichen Schwankungsbreite, die den Wert zweifelhaft erscheinen ließ. Es gab keinen Hinweis auf eine Proteinurie und die Osmolarität war vergleichbar, was ebenso wie die Kreatinin-Werte für einen ähnlichen Diuresestatus beider Testgruppen spricht.

Die deutlichsten Auswirkungen der Osteopetrose auf den Blut- und Urinstatus der *Clcn7*^{-/-}-Tiere waren also eine starke Erhöhung der alkalischen Phosphatase im Serum, eine deutliche Verringerung des Hämatokrit und eine leichte Erniedrigung der Phosphatausscheidung im Urin. Ein Hinweis auf eine renale Funktionsstörung in Knockout-Tieren fand sich nicht.

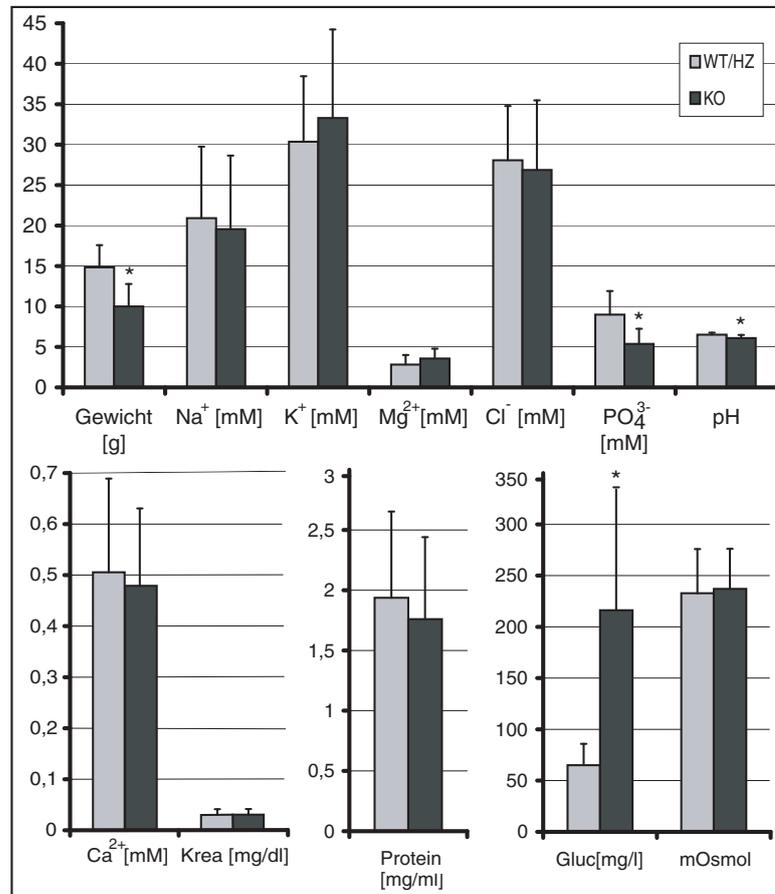


Abbildung 2.16: Analyse einiger Urinparameter von 3 bis 5 Wochen alten Tieren. Die Einheiten sind in eckigen Klammern für die einzelnen Parameter angegeben. Krea= Kreatinin. Gluc= Glukose. * = Signifikante Abweichung.

2.5 Auswirkungen des Fehlens von ClC-7 auf die Funktion der Osteoklasten

2.5.1 Morphologie der Osteoklasten

Zwei Tatsachen wiesen auf den Osteoklasten als den am meisten durch das Fehlen von ClC-7 in seiner Funktion beeinträchtigten Zelltyp hin. Die *Clcn7^{-/-}*-Tiere litten unter einer ausgeprägten Osteopetrose, die auf eine verminderte Resorption von Knochengewebe zurückzuführen ist. Osteoklasten sind wahrscheinlich die einzigen Zellen, die Knochen resorbieren können. Darüber hinaus wurde eine prominente Expression von ClC-7 in Osteoklasten-ähnlichen Zellen sowohl in der *in situ* Hybridisierung als auch in der X-Gal Färbung nachgewiesen. Der

nächste Schritt bestand in einer vergleichenden lichtmikroskopischen Analyse der Osteoklasten in Gewebeschnitten. Es wurden die Parameter Größe, Aussehen, Zahl der Zellkerne und Vorhandensein der sogenannten Ruffled Border untersucht. Die Ruffled Border ist eine für den Osteoklasten spezifische, vielfach gefaltete Membran, die das Zytoplasma der Zelle gegen den zu resorbierenden Knochen abschließt. In der Toluidinblau-Färbung stellt sich die Ruffled Border als Aufhellung dar. Osteoklasten von Tieren aller Genotypen waren mehrkernig (siehe Abbildung 2.17(A,B)). Die Anzahl der Kerne variierte je nach Anschnitt zwischen 2 und 6. Die Größe der Osteoklasten war im Knockout etwas geringer. Deutlich abweichend war jedoch das Aussehen der *Clcn7^{-/-}*-Osteoklasten. Sie waren meist länglicher und lagen der Knochenoberfläche weniger dicht an. Ihr Zytoplasma war homogen und stark angefärbt, wogegen in normalen Osteoklasten das Zytoplasma durch eine Vielzahl von Vesikeln mehr oder weniger stark aufgelockert erschien. Nur in insgesamt 2 Fällen wiesen *Clcn7^{-/-}*-Osteoklasten eine angedeutete Ruffled Border auf. Unter normalen Osteoklasten fand sich ein deutlich höherer Anteil an resorbierenden Zellen mit deutlicher Ruffled Border.

Eine weitere in diesem Zusammenhang gebräuchliche histochemische Methode ist die TRAP-Färbung, der Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase, die relativ spezifisch für reife Osteoklasten ist. Im *Clcn7^{-/-}*-Knochen war, ebenso wie im Wildtyp, eine große Zahl TRAP-positiver Osteoklasten zu beobachten (siehe Abbildung 2.17(C,D)). Aus diesen Daten ließ sich folgern, dass im Knockout zwar die Fusion der Vorläufer-Zellen zu mehrkernigen, TRAP-positiven Osteoklasten stattfindet, diese aber nicht resorbieren können.

Die Toluidinblau-Färbung erlaubt jedoch keinen verlässlichen Nachweis der Ruffled Border. Um die Morphologie von Osteoklasten wirklich vergleichend beurteilen zu können, ist die Elektronenmikroskopie die Methode der Wahl. In der morphologischen Abteilung des Zentrums wurden Ultradünnschnitte von Knochenfragmenten aus der sehr Osteoklasten-reichen Region unterhalb der Eröffnungszone der Tibia angefertigt. Zahlreiche aktive Osteoklasten mit sehr unterschiedlich ausgeprägter Ruffled Border konnten im Wildtyp-Knochen identifiziert werden. Dagegen fand sich im Knockout lediglich eine Zelle mit einer annähernd an eine Ruffled Border erinnernden Membranauffaltung, die zur Knochenoberfläche orientiert und klar zwischen zwei sogenannten Clear Zones gelegen war (siehe Abbildung 2.17(D,E)). Eine Clear Zone ist die Stelle der engen, Integrin-vermittelten Anheftung des Osteoklasten an die Knochenoberfläche, durch die die saure Resorptionslakune gegen die Umgebung abgedichtet wird. Weiterhin war, wie schon in der Lichtmikroskopie beobachtet, das Zytoplasma der *Clcn7^{-/-}*-Osteoklasten sehr homogen und arm an Vesikeln, ein Zeichen für fehlende Resorptionstätigkeit. Offenbar sind *Clcn7^{-/-}*-Osteoklasten also ebenso wie normale Zellen in der Lage, sich an den Knochen anzuheften und Clear Zones zu bilden, können dann aber keine Ruffled Border ausbilden und resorbieren.

2.5.2 Lokalisation von CIC-7 in Osteoklasten

Der Verlust von CIC-7 führte allen Anschein nach zu morphologisch veränderten und funktionslosen Osteoklasten. Außerdem konnte die Expression von CIC-7 im embryonalen Osteo-

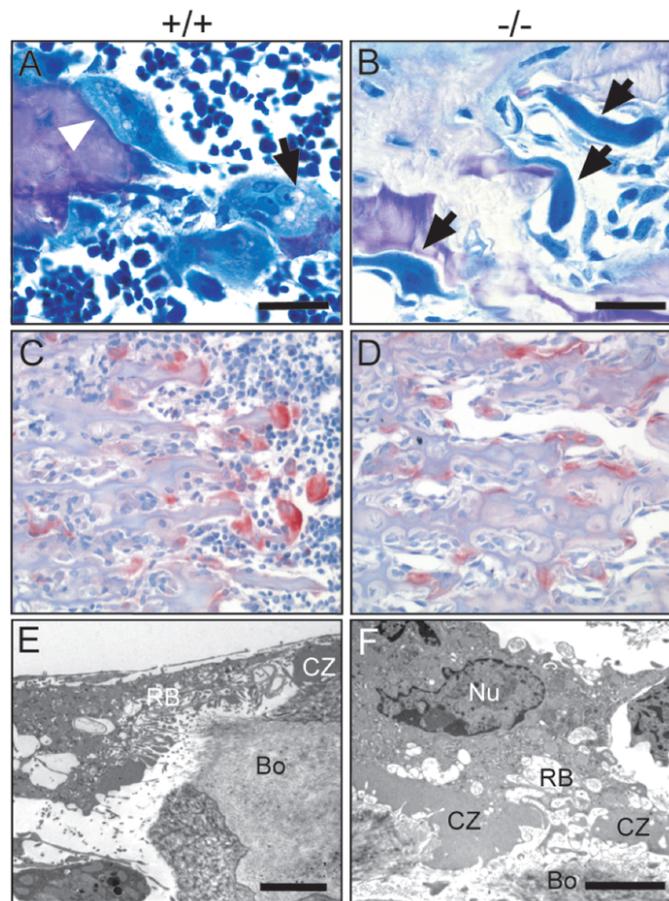


Abbildung 2.17: Vergleich der Morphologie und der TRAP-Expression von Osteoklasten in Wildtyp und *Clcn7*^{-/-}. (A,B) Toluidinblau-Färbung. Die *Clcn7*^{-/-}-Osteoklasten (dunkelblau, Pfeile) wirken länglicher, in weniger dichtem Kontakt zur Knochenoberfläche und ihr Zytoplasma ist homogen dicht. Dagegen sind im Wildtyp-Osteoklast große Vesikel (Pfeil) und eine Ruffled Border (Pfeilspitze) zu erkennen. (C,D) TRAP-Färbung (rot), Toluidinblau-Gegenfärbung. Ebenso wie im Wildtyp finden sich im Knockout in der Eröffnungszone des Knochens viele TRAP-positive, reife Osteolasten. (D,E) Elektronenmikroskopie. Obwohl eine Clear Zone (CZ) auch in *Clcn7*^{-/-}-Osteoklasten vorhanden ist, ist die Ruffled Border (RB) nur rudimentär ausgebildet. Bo= Knochen, Nu= Zellkern. Größenmaßstab: (A,B) 25 μ m; (E,F) 2 μ m. (C,D) Vergrößerung 200fach.

klasten gezeigt werden, was auf einen Osteoklasten-intrinsischen Effekt des Knockouts hinwies. Andere Ursachen für die Beeinträchtigung der Funktion dieses Zelltyps, z.B. eine fehlende Stimulation, konnten aber nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Analyse der Lokalisation von CIC-7 im Osteoklasten sollte weitere Aufklärung über den Mechanismus der Entstehung

des Phänotyps leisten.

Eine X-Gal-Färbung wurde an Knochengewebe eines fünf Wochen alten *Clcn7*^{-/-}-Tieres durchgeführt, um festzustellen, ob und in welchem Maße im herangewachsenen Tier *Clc-7* in Osteoklasten gebildet wird. Ebenso wie im Embryonalstadium war eine sehr starke Färbung des gesamten Cytoplasmas der Osteoklasten zu beobachten (siehe Abbildung). Auch Osteoblasten und Chondrozyten wiesen intrazellulär eine Färbung auf, die aber um ein Vielfaches schwächer war. Eine subzelluläre Lokalisation von *Clc-7* war durch diese Methode jedoch nicht möglich, da durch die enzymatische Reaktion ausschließlich das Fusionsprotein, in dem nur 1/6 des Proteins aus *Clc-7* bestand, und nicht das Wildtyp-Protein detektiert werden konnte. Der gegen den N-Terminus von *Clc-7* gerichtete Antikörper 7N4 war bereits erfolgreich im Western-Blot zur spezifischen Detektion eingesetzt worden. Durch die bessere Auflösung immunhistologischer Verfahren sollte - sofern der Antikörper das Epitop auch im Gewebeschnitt erkennt - eine Zuordnung eines Proteins zu Kompartimenten innerhalb einer Zelle zu erreichen sein. In der Tat konnte *Clc-7* im Paraffin- und im Gefrierschnitt von (+/+) - Knochen durch Antikörper 7N4 und einen enzymgekoppelten Zweitantikörper detektiert werden. Alle Osteoklasten zeigten deutliche intrazelluläre Signale, die aber in einem Teil der Zellen zur Knochenoberfläche hin konzentriert erschienen. In höherer Vergrößerung sah man deutlich die Anfärbung intrazellulärer Vesikel und einer Struktur nahe am Knochen in einer mehrkernigen Zelle, die sicher als Osteoklast zu identifizieren war (siehe Abbildung 2.18(F,G)).

Eine weitere Erhöhung der Auflösung und die Möglichkeit der Kolo-kalisation eines zu untersuchenden Proteins mit einem bereits gut charakterisierten Marker-Protein bietet die Immunfluoreszenz-Detektion in Verbindung mit der konfokalen Laser-Mikroskopie. β_3 -Integrin ist ein bewährter und spezifischer Marker der Plasmamembran des Osteoklasten. Auch in der Immunfluoreszenz-Detektion von *Clc-7* zusammen mit β_3 -Integrin zeigten sich starke Signale für *Clc-7* fast ausschließlich in β_3 -Integrin-positiven Osteoklasten. Die Signale waren intrazellulär und oft in vesikulären Strukturen anzutreffen. In einem Teil der Osteoklasten jedoch war *Clc-7* wiederum in einer nahe der Knochenoberfläche gelegenen Struktur konzentriert, die kein β_3 -Integrin zu enthalten schien (siehe Abbildung 2.18(H)). In Schnitten von *Clcn7*^{-/-}-Knochen der Linie C7A war das Signal für β_3 -Integrin in normaler Stärke vorhanden, jedoch fehlte sowohl das Signal für *Clc-7* als auch die Integrin-freie, zum Knochen gerichtete Struktur. Eine DNA-Färbung durch TOTO3-Iodid bestätigte die Multinuklearität der Knockout-Osteoklasten (siehe Abbildung 2.18(I)). Die Deletion von *Clc-7* führte zu einem vollständigen Verschwinden des vom Antikörper 7N4 erkannten Epitopes. Gleichzeitig war das Vorhandensein von β_3 -Integrin ein weiteres Zeichen dafür, dass *Clcn7*^{-/-}-Osteoklasten weitgehend normal heranreifen. Es wurde an dieser Stelle die Hypothese aufgestellt, dass *Clc-7* in der Ruffled Border Membran von resorbierenden Osteoklasten lokalisiert und dort zusammen mit der H⁺-ATPase an der Sekretion von Säure in die Resorptionslakune beteiligt ist. Durch das Fehlen dieser Chloridleitfähigkeit unterbleibt die Resorption und auch die effiziente Ausbildung einer Ruffled Border, die durch die beginnende Resorption mittels eines unbekanntem positiven Rückkopplungsmechanismus induziert wird.

Eine alternative Hypothese wäre, dass eine durch das Fehlen von *Clc-7* gestörte Funkti-

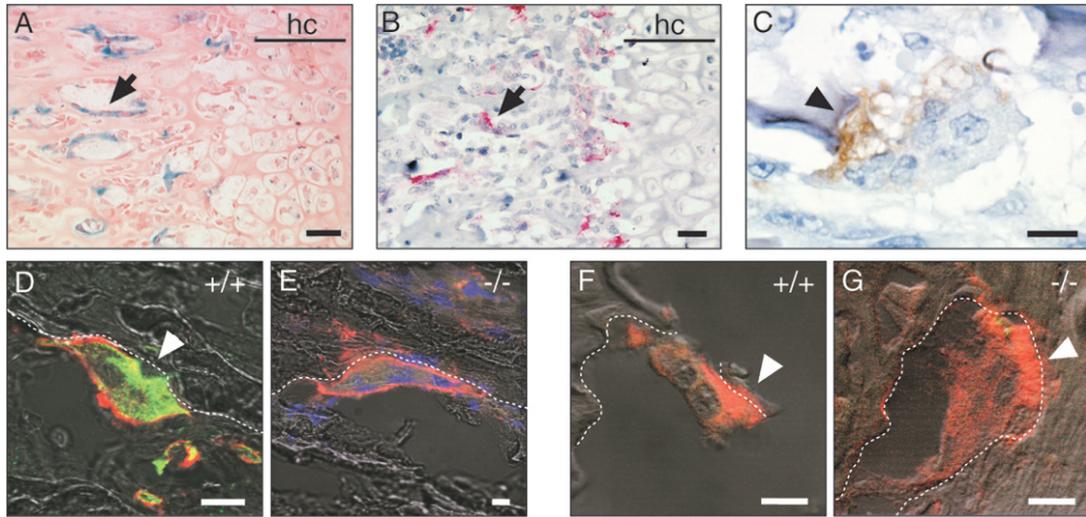


Abbildung 2.18: Immunhistochemische subzelluläre Lokalisation von CIC-7 und H⁺-ATPase in Osteoklasten. (A) X-Gal Färbung von *Clcn7*^{-/-}-Knochen mit Kernechtrot-Gegenfärbung. Wie auch in (B) Schnitt durch den Blasenknorpel (hc) und die anschließende Eröffnungszone der Tibia. (B) Immunhistochemischer Nachweis von CIC-7 in Osteoklasten mit AP-gekoppeltem Zweitantikörper. (C) Wie (B), aber mit HRP-gekoppeltem Zweitantikörper, höhere Vergrößerung. (D) Detektion von CIC-7 (grün) und β_3 -Integrin (rot) durch Immunfluoreszenz. (E) Wie (D), aber *Clcn7*^{-/-}-Osteoklast, zusätzlich TOTO3-Iodid-Färbung der Zellkerne. (F,G) Detektion der H⁺-ATPase in (+/+) - (F) und (-/-) -Osteoklasten (G) durch Immunfluoreszenz. Größenmaßstäbe: (A,B) 25 μ m, (C-G) 10 μ m

on den Transport oder die Fusion H⁺-ATPase-enthaltender Vesikel mit der Ruffled Border Membran verhindert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Versuch unternommen, die H⁺-ATPase mittels eines Antikörpers in Wildtyp- und Knockout-Osteoklasten vergleichend zu detektieren (siehe Abbildung 2.18(F,G)). In einem Teil der Osteoklasten beider Genotypen befand sich die H⁺-ATPase neben einer intrazellulären in einer Ruffled Border-ähnlichen Lokalisation. Die Intensität der Signale war allerdings in *Clcn7*^{-/-}-Zellen tendenziell schwächer, was in Anbetracht der geringen Ausbildung der Ruffled Border nicht verwundert. Auch was die charakteristische Lokalisation der Protonenpumpe anbelangte, schienen *Clcn7*^{-/-}-Osteoklasten sich nur graduell vom Wildtyp zu unterscheiden.

2.5.3 Messung der Resorptionsleistung von Osteoklasten in vitro

CIC-7 befindet sich zwar in großer Menge in Osteoklasten, ist aber auch in anderen Zelltypen, z.B. Osteoblasten vorhanden, die funktionell eng an Osteoklasten gekoppelt sind. Es konnte daher nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass das Ausschalten von CIC-7 primär eine andere Zellpopulation beeinträchtigt, was wiederum die Osteoklasten in ihrer

Funktion hemmt. Unter meiner Mitarbeit wurde von Frau Dr. Kasper ein Zellkultur-System etabliert, in dem Osteoklasten-Vorläufer aus der Milz oder reife, aus Knochen gewonnene Osteoklasten der verschiedenen Genotypen zusammen mit Wildtyp-Osteoblasten auf Dentin-Scheiben kultiviert wurden. Das Dentin, welches von einem Elefanten-Stoßzahn stammte, entspricht in seiner Zusammensetzung weitgehend dem Knochen, hat demgegenüber aber den Vorteil, dass es kompakt ist und sich zu sehr dünnen und glatten Scheiben verarbeiten läßt. Im Zellkultur-Medium befand sich Vitamin D3 und Dexamethason zur maximalen Stimulation der Osteoklasten, die durch Resorption des Dentins kleine Löcher in der glatten Oberfläche hinterließen. Diese Löcher (Pits) konnten anschließend im Raster-Elektronenmikroskop gezählt werden, weshalb diese Methode allgemein „Pit-Assay“ genannt wird. Wenn in diesem Assay Unterschiede in der Resorptionsleistung zwischen Wildtyp und Knockout auftraten, so konnte dies nur auf einen Osteoklasten-intrinsischen Effekt des Knockouts zurückzuführen sein.

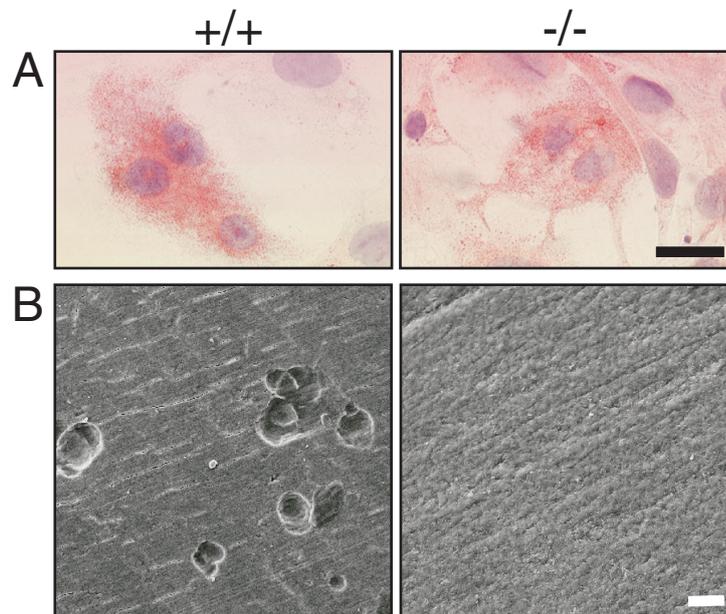


Abbildung 2.19: (A) TRAP- und Hämatoxylin-Färbung von kultivierten Osteoklasten. Sowohl in Wildtyp- als auch in Knockout-Zellen sind TRAP-positive, mehrkernige Osteoklasten zu finden. (B) Raster-Elektronenmikroskopie der Elfenbein-Oberfläche nach dem Entfernen der darauf kultivierten Zellen. Nur Wildtyp-Osteoklasten sind in der Lage, Löcher hervorzurufen. Größenmaßstäbe: (A) 50 μ m ; (B) 20 μ m

Es wurde jeweils die gleiche Anzahl an Zellen pro Dentinscheibe ausplattiert und durch TRAP-Färbung überprüft (siehe Abbildung 2.19). Es fanden sich deutliche TRAP-positive Zellen in Kulturen von Zellen aller Genotypen. Während im Wildtyp bis zu mehreren hundert Löcher in der Oberfläche einer Dentinscheibe auftraten, fehlten diese im Knockout vollständig.

Dies Ergebnis wurde mehrmals, sowohl mit primären Osteoklasten als auch mit Osteoklasten-Vorläufern aus der Milz, bestätigt. Es konnte daher kein Zweifel mehr bestehen, dass das Fehlen von *Clc-7* direkt die Osteoklastenfunktion stört.

2.5.4 Messung der Ansäuerung der Resorptionslakune

Ein bewährtes Mittel zur pH-Bestimmung ist die Inkubation lebender Zellen mit Acridin Orange, welches fluoresziert, wenn es entweder in DNA interkaliert oder in ein saures Milieu gelangt. Inkubiert man im oben beschriebenen Zellkultursystem kultivierte aktive Osteoklasten mit Acridin Orange, so erlaubt dies eine Identifizierung von Kompartimenten niedrigen pH-Wertes innerhalb des Osteoklasten sowie in der sauren Resorptionslakune unterhalb des angehefteten Osteoklasten. Da das Elfenbein nicht lichtdurchlässig ist, diente ein Laser-Mikroskop zur Detektion. In Wildtyp-Osteoklasten traten punktuelle intrazelluläre Signale und in einigen Zellen große, blasenförmige fluoreszierende Bereiche auf. Erstere entsprachen sauren Vesikeln, wahrscheinlich hauptsächlich Lysosomen, während letztere die stark saure Resorptionslakune repräsentierten (siehe Abbildung 2.20). In *Clcn7*^{-/-}-Osteoklasten fanden sich ebenfalls vesikuläre Signale, jedoch niemals Zeichen für eine extrazelluläre Azidifizierung. Dies unterstützt die vorher erwähnte Hypothese, dass *Clc-7* im Osteoklasten an der extrazellulären Azidifizierung der Resorptionslakune beteiligt ist.

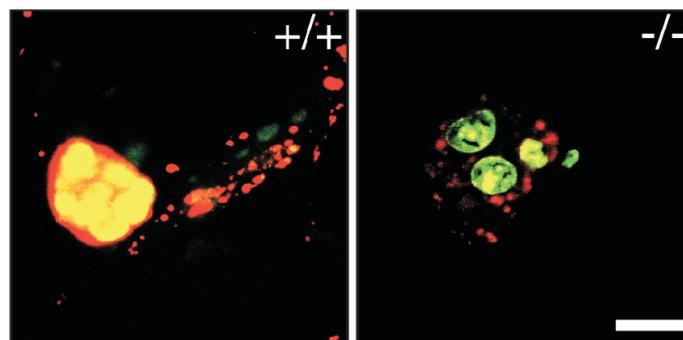


Abbildung 2.20: Fluoreszenzsignale in kultivierten primären Osteoklasten nach Inkubation mit Acridin Orange. Grün leuchtende Strukturen sind Zellkerne, rot leuchtende saure Kompartimente. In der Wildtyp-Zelle ist deutlich die Anfärbung der sauren Resorptionslakune sichtbar. In der *Clcn7*^{-/-}-Zelle finden sich lediglich vesikuläre Fluoreszenz-Signale. Größenmaßstab: 50µm

2.6 *Clc-7* befindet sich in späten Endosomen und Lysosomen

Die Untersuchung des Pathomechanismus der Osteopetrose zeigte, dass *Clc-7* in Osteoklasten in der Ruffled Border zu finden und dort an der Sekretion von Säure in die Resorptionslakune beteiligt ist. Aus allen bisherigen Daten zur Gewebeverteilung geht aber hervor, dass *Clc-7*

ubiquitär exprimiert wird. Wie ist die subzelluläre Verteilung von *ClC-7* und welche Funktion besitzt er in anderen Geweben?

Die Experimente zur Klärung dieser Frage wurden an Nierengewebe durchgeführt. Der Mechanismus der extrazellulären Azidifizierung in Osteoklasten wird in der Literatur oft mit dem der Schaltzellen des Sammelrohrs der Niere verglichen. Diese dienen der pH-Regulation des Urins, bzw. des Blutes und die H^+ -ATPase tritt in ihrer Plasmamembran in hoher Dichte auf. Die Ruffled Border weist Ähnlichkeit zum späten Endosom auf (Palokangas et al., 1997). Sollte auch *ClC-7* sich in Endosomen befinden, so könnte dies einen Effekt auf die Kinetik der Endozytose von Proteinen haben, welche sich sehr gut im proximalen Tubulus der Niere untersuchen lässt. Darüber hinaus sind die einzelnen vesikulären Kompartimente im proximalen Tubulus in einem konstanten und übersichtlichen Muster angeordnet, was die Zuordnung sehr erleichtert.

Zum Vergleich der Endozytose-Leistung in Wildtyp und *Clcn7^{-/-}* und zur Kollokalisierung von *ClC-7* mit endozytiertem Protein, wurde Fluoreszenz-markiertes Lactoglobulin intravenös in betäubte Tiere injiziert und nach 15 oder 30 Minuten die Niere durch Perfusion fixiert. Es war bekannt, dass bestimmte in den Primärharn gelangte Proteine Rezeptor-vermittelt endozytiert werden und zuerst in frühe, dann in späte Endosomen und letztlich in Lysosomen gelangen (Günther et al., 1998). Das Signal für *ClC-7* kollokalisierte ab 15min Endozytose-Zeit mit dem markierten Protein, was für eine Lokalisation in späten Endosomen spricht (siehe Abbildung 2.21(B)).

Außerdem wurden Kompartiment-spezifische Marker mit *ClC-7* kollokalisiert. Villin kommt in hoher Konzentration im Bürstensaum des proximalen Tubulus vor, d. h. auf der zum Lumen hin gerichteten Seite der Tubuluszellen (siehe Abbildung 2.21(A)). Unmittelbar unter dem durch Villin markierten Bürstensaum befinden sich die frühen Endosomen. *lamp-1* kommt in späten Endosomen und in Lysosomen vor und die durch Antikörper gegen *lamp-1* detektierten Vesikel lagen im allgemeinen basal in Zellkernnähe. Das *ClC-7* entsprechende Fluoreszenzsignal war vesikulär, befand sich in einem deutlichen Abstand vom durch Villin markierten Bürstensaum und überlappte zum größten Teil mit dem Signal von *lamp-1* (siehe Abbildung 2.21(C)). Folglich schien *ClC-7* in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert zu sein. Ein interessanter Nebenbefund war, dass in dem als Negativkontrolle für eventuelle unspezifische Antikörper-Signale verwendeten *Clcn7^{-/-}*-Gewebe der Linie C7B vom Antikörper gegen *ClC-7* das β -Galaktosidase/*ClC-7*-Fusionsprotein in einer sehr ähnlichen subzellulären Lokalisation wie *ClC-7* im Wildtyp detektiert wurde (siehe Abbildung 2.21(C,D)). Entsprechende Nierenschnitte von Linie C7A hingegen zeigten keinerlei für *ClC-7* spezifische Signale (siehe Abbildung 2.21(E)).

Die Expression von *ClC-7* war jedoch keinesfalls auf den proximalen Tubulus beschränkt, sondern die Immunfluoreszenz ergab schwache vesikuläre Signale auch im distalen Tubulus und im Sammelrohr. Kein von diesem intrazellulären Muster abweichendes Signal konnte in Schaltzellen des Sammelrohrs entdeckt werden, die gleichwohl die H^+ -ATPase – ähnlich der Ruffled Border – in großer Menge in der Plasmamembran enthielten (siehe Abbildung 2.21(F)).

Neben der Möglichkeit der Markierung verschiedener endozytotischer Kompartimente war

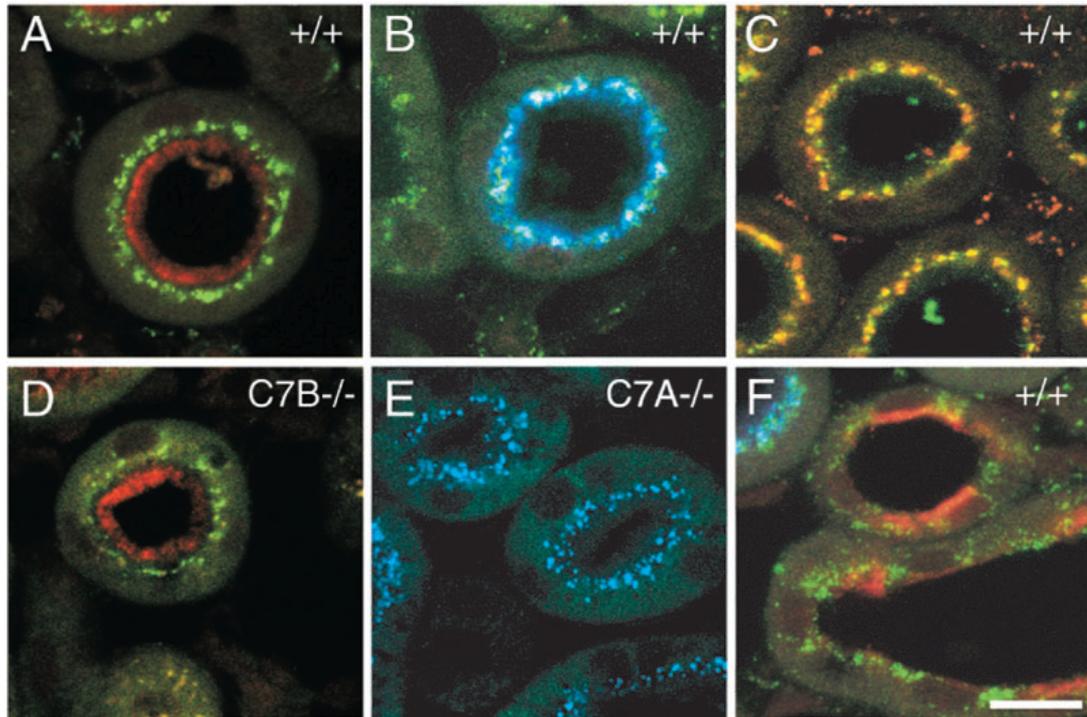


Abbildung 2.21: Kolokalisation von CIC-7 mit subzellulären Markern im proximalen Tubulus der Niere. (A,D) Kolokalisation von CIC-7 (grün) und Villin (rot). (A) Das vesikuläre, ringförmige Signal für CIC-7 liegt im Wildtyp deutlich entfernt vom Signal für Villin in Zellkernnähe. (D) Im Knockout der Linie C7B detektiert der Antikörper gegen CIC-7 ein dem Wildtyp sehr ähnliches basal gelegenes Signal, was vermutlich dem Fusionsprotein aus CIC-7 und der β -Galaktosidase entspricht. (B,E) Kolokalisation von CIC-7 (grün) und 15min endozytiertem β -Laktoglobulin (blau). (B) Das endozytierte Protein befindet sich größtenteils in CIC-7-positiven Vesikeln (Überlagerung beider Signale = hellblau), vermutlich späten Endosomen. (E) Im Knockout der Linie C7A ist CIC-7 nicht detektierbar. (C) Kolokalisation von CIC-7 (grün) und lamp-1 (rot). Ein fast vollständiges Überlappen der Signale (resultierende Farbe: gelb) bestätigt die durch die Kolokalisation mit endozytiertem Protein (siehe (B)) vermutete Lokalisation von CIC-7 im späten Endosom/ Lysosom. (F) Kolokalisation der 31kDa-Untereinheit der H^+ -ATPase (rot) mit CIC-7 (grün) im Sammelrohr. Schaltzellen sind durch starke apikale H^+ -ATPase-Signale gekennzeichnet. CIC-7 kolokalisiert nicht mit diesen Signalen, sondern befindet sich ausschließlich intrazellulär. Größenmaßstab: $10\mu\text{m}$.

ein weiteres Ziel der Endozytose-Versuche, eventuelle Defekte in der Passage von Proteinen durch diese Kompartimente im Knockout zu untersuchen. Es wäre beispielsweise vorstellbar gewesen, dass das Fehlen von CIC-7 in späten Endosomen zur Anhäufung von Protein in diesem Kompartiment führt. Es fand sich aber weder ein Hinweis auf eine mit diesem Verfahren erfassbare Reduktion der Protein-Endozytose im Knockout noch eine Beeinträchtigung des

vesikulären Transports (siehe Abbildung 2.22).

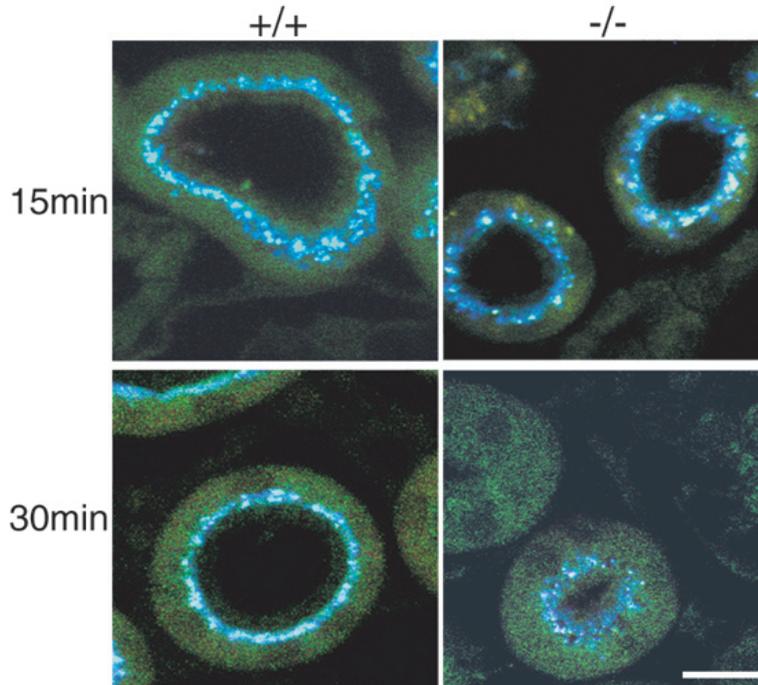


Abbildung 2.22: Endozytose von Cy5-fluoreszenzmarkiertem β -Laktoglobulin (blau) im proximalen Tubulus der Niere und Kolokalisation mit lamp-1 (grün). Nach 15min Endozytose (oben) kolokalisiert das endozytierte β -Laktoglobulin bei $Clcn7^{+/+}$ und $Clcn7^{-/-}$ mit lamp-1, d. h. es befindet sich bereits im späten Endosom. Auch nach 30min Endozytose (unten) bleibt eine deutliche Überlagerung der Fluoreszenzsignale bestehen. Es gibt keinen Anhalt für eine Verzögerung der Passage des endozytierten Proteins zum lysosomalen Kompartiment. Größenmaßstab: $10\mu\text{m}$.

2.7 Der Verlust von CLC-7 führt zu infantiler maligner Osteopetrose im Menschen

Transgene Tiere dienen oft als Modelle menschlicher Erkrankungen. Sie sollen die Ergründung der Pathomechanismen und die Erprobung neuer Heilungsmethoden vereinfachen. Jedoch gibt es eine größere Anzahl an Fällen, in denen der Phänotyp der Maus von dem der humanen Erkrankung stark abweicht. Der Vergleich der pathologischen Daten der $Clcn7^{-/-}$ -Maus mit bekannten menschlichen Erkrankungen ergab, dass der Phänotyp gut dem der infantilen malignen Osteopetrose entspricht. Gemeinsamkeiten sind ein früher Beginn, meist in den ersten Lebensmonaten, häufige Erblindung, Anämie und in manchen Fällen neurologische Auffälligkeiten wie epileptische Anfälle und geistige Behinderung. Die Lebenserwartung be-

trägt ohne Therapie nur wenige Jahre und die Vererbung ist rezessiv. Es schien daher nicht ausgeschlossen, dass Mutationen im humanen Gen für *CLC-7*, *CLCN7*, für diese Erkrankung verantwortlich sind.

2.7.1 Mutationssuche in *CLCN7* in DNA von Osteopetrose-Patienten

Obwohl die infantile maligne Osteopetrose sehr selten ist, gelang es, Material von 11 Patienten zu erhalten, wobei es sich teilweise um aus Hautbiopsien gewonnene Fibroblasten handelte, teilweise um Blutproben. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme zwischen 2 und 10 Monaten alt und wurden in der Kinderklinik der Universität Ulm auf eine Knochenmarktransplantation vorbereitet, die einzige effektive Therapiemöglichkeit. Alle 25 Exone von *CLCN7* wurden durch PCR von aus dem Probenmaterial isolierter genomischer DNA amplifiziert. Die hierzu nötigen Oligonukleotide wurden anhand der in der Datenbank befindlichen kompletten humanen genomischen Sequenz von *CLC-7* so gewählt, dass sie kurz vor, bzw. hinter den jeweiligen Exon/Intron-Grenzen lagen. Die Amplifikate wurden direkt durch die Kettenabbruch-Methode mit Fluoreszenz-markierten Terminatoren sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden sowohl mit der genomischen Sequenz aus der Datenbank als auch mit der bekannten cDNA-Sequenz mit Hilfe des Macaw-Programms verglichen. Ein großer Teil der Patienten wies Polymorphismen der DNA-Sequenz auf, die die Aminosäure-Sequenz nicht veränderten und daher nicht als pathologische Mutationen in Betracht kamen. In Patient H. jedoch gelang es, eine heterozygote Stop-Mutation (Q555X) in Exon 18 zu identifizieren, die zum Verlust etwa eines Viertels des *CLC-7* Proteins und somit zu dessen Funktionslosigkeit führen sollte (siehe Abbildung 2.23(A)). Allerdings hat eine Stop-Mutation selten einen dominant negativen Effekt und der Verlust eines *Clcn7*-Allels hat in *Clcn7*^{+/-}-Mäusen keinerlei Auswirkungen, so dass diese Mutation alleine nicht für die Krankheit verantwortlich sein konnte. Die weitere Suche führte zu einer - ebenfalls heterozygoten - Missense-Mutation (R762Q) in Exon 24, durch die ein bei den intrazellulären Mitgliedern der *CLC*-Familie konserviertes Arginin in ein Glutamin umgewandelt wurde (siehe Abbildung 2.23(B)). Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Mutation R762Q lediglich ein Polymorphismus ist. Daher wurden zunächst 70 Kontroll-DNAs westeuropäischer Herkunft auf Anwesenheit dieser Mutation überprüft. Es wurde hierbei die Tatsache ausgenutzt, dass durch die Mutation eine neue *AlwNI*-Restriktionsschnittstelle entstand. Exon 24 konnte daher durch PCR amplifiziert und die Amplifikate einem Restriktionsverdau unterzogen werden. Die Auswertung erfolgte durch eine Gel-Elektrophorese. In keiner Kontroll-DNA konnte die Veränderung detektiert werden.

2.7.2 Auswirkungen der Mutationen in *CLCN7*

Aus den von Patient H. vorhandenen Fibroblasten konnte RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert werden. Amplifizierte man *CLC-7* von dieser cDNA, so fanden sich in der Sequenz nicht wie in der genomischen Sequenz an Position 762 sowohl ein für Arginin als auch ein

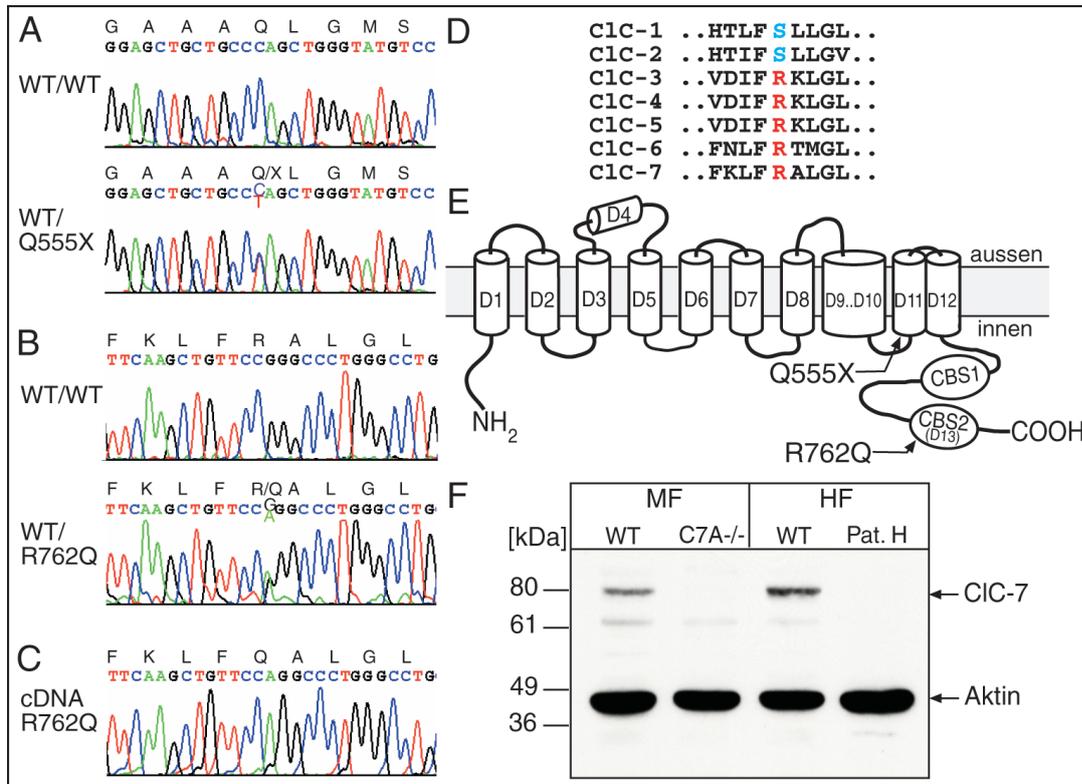


Abbildung 2.23: (A,B) Ausschnitte aus Original-Sequenzen von Patient H. im Vergleich mit Wildtyp-Sequenzen. (A) Stop-Mutation Q555X in Exon 18. (B) Mutation R762Q. (C) cDNA-Sequenz mit homozygoter Mutation R762Q. (D) Vergleich der Aminosäuresequenz zu Beginn von CBS2 verschiedener CIC-Kanäle. R762 ist in den intrazellulär lokalisierten Kanälen CIC-3 bis -7 konserviert. (E) Position der Mutationen im Topologiemodell der CIC-Kanäle. (F) Western-Blot von Proteinlysaten von Maus-Fibroblasten (MF) von Wildtyp und *Clcn7*^{-/-} und Humanen Fibroblasten (HF) von einem Kontroll-Individuum und Patient H.. Aktin diente als Kontrolle für gleiche Proteinmengen in den Spuren des Gels.

für Glutamin kodierendes Codon, sondern nur das mutierte Codon für Glutamin. Dafür trat bei Position 555 lediglich das Wildtyp-Codon, nicht aber das in der genomischen Sequenz heterozygote Stopcodon auf. Dieses Ergebnis zeigte nicht nur, dass das Transkript mit der Stop-Mutation Q555X auf RNA-Ebene offensichtlich nicht vorhanden war, sondern ebenfalls, dass sich beide Mutationen auf verschiedenen Allelen befanden. Durch Amplifikation von genomischer DNA mit Allel-spezifischen Oligonukleotiden konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Es handelte sich bei Patient H. folglich um einen Fall von Compound-Heterozygotie.

Das in den Fibroblasten und wahrscheinlich auch in allen anderen Zellen des Patienten vorhandene CIC-7 Transkript enthielt also die R762Q-Mutation, die mit hoher Wahrscheinlichkeit

keinen benignen Polymorphismus darstellte. Betrachtet man die Lokalisation der Aminosäure R762, so fällt auf, dass sie in der zweiten der beiden CBS-Domänen von CLC-7 liegt, denen eine Rolle für die Wechselwirkung von CLC-Proteinen untereinander oder eventuell mit anderen Proteinen zugeschrieben wird (Schmidt-Rose und Jentsch, 1997a) (siehe Abbildung 2.23(D)). Um die Auswirkung der Mutation auf die vorhandene Menge an CLC-7 zu beurteilen, wurden aus Fibroblasten des betreffenden und eines anderen Patienten, der keine Mutation in *CLCN7* aufwies, gewonnene Proteinlysate im Western-Blot mit Hilfe von Antikörper 7N4 untersucht (siehe Abbildung 2.23(F)). Wie in aus *Clcn7^{-/-}*-Tieren gewonnenen Fibroblasten, konnte in den Fibroblasten des Patienten kein CLC-7 detektiert werden, d. h. es handelte sich um einen kompletten Verlust des Proteins auf Zellebene. Da dies der Situation im *Clcn7^{-/-}*-Tier entsprach, war es sehr wahrscheinlich, dass beide Mutationen im Zusammenspiel die Osteopetrose in diesem Fall verursachten.