

Dissertation

**Lokalisation und Funktion des Chloridkanals  
ClC-7 im Säugetier-Organismus**

vorgelegt von  
Uwe Kornak

Angefertigt am  
Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)  
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. T.J. Jentsch

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

2001

Diese Dissertation wurde in der Zeit vom 01.11.1996 bis zum 15.03.2001 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) angefertigt.

### Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch  
Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)  
Martinistr. 85  
20246 Hamburg

Prof. Dr. Ferdinand Hucho  
Freie Universität Berlin  
Institut für Biochemie  
Thielallee 63  
14195 Berlin

Datum der Disputation: 4. Mai 2001

Für Birgit  
und  
in Gedenken an Axel und meinen Vater



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Elektrische Erregbarkeit und Ionenkanäle . . . . .	1
1.2	Kationenkanäle . . . . .	2
1.2.1	Ligandengesteuerte Kationenkanäle . . . . .	2
1.2.2	Spannungsgesteuerte Kationenkanäle . . . . .	3
1.2.3	Durch Mutationen in Kationenkanälen hervorgerufene Erkrankungen	4
1.3	Anionenkanäle . . . . .	6
1.3.1	Die CLIC-Proteinfamilie . . . . .	6
1.3.2	Der „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)	7
1.3.3	Ligandengesteuerte Chloridkanäle . . . . .	8
1.3.4	Spannungsgesteuerte Chloridkanäle der CLC-Familie . . . . .	9
1.3.5	Die physiologische Funktion verschiedener CLC-Kanäle . . . . .	12
1.3.6	CLC-7 . . . . .	14
1.4	Grundlagen der Biologie des Knochengewebes . . . . .	15
1.4.1	Knochenwachstum und Entwicklung des Skeletts . . . . .	15
1.4.2	Entstehung und Funktionsweise der Osteoklasten . . . . .	16
1.4.3	Formen und Ursachen der Osteopetrose . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
2.1	Erzeugung der <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Maus . . . . .	19
2.2	CLC-7 ist in der <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Maus nicht mehr nachweisbar . . . . .	21
2.2.1	Detektion von CLC-7 durch Northern-Blot und RT-PCR . . . . .	21
2.2.2	Detektion von CLC-7 im Western-Blot . . . . .	24
2.3	Expression von CLC-7 im Embryo . . . . .	24
2.4	Der Phänotyp der <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Maus . . . . .	25
2.4.1	Makroskopische Veränderungen . . . . .	25
2.4.2	Röntgenbefunde und Histologie der Tibia . . . . .	28
2.4.3	Degeneration von Retina und Sehnerv . . . . .	28
2.4.4	Anzeichen für eine neuronale Speicherkrankheit . . . . .	31
2.4.5	Analyse von Blut und Urin . . . . .	33
2.5	Auswirkungen des Fehlens von CLC-7 auf die Funktion der Osteoklasten . . .	36
2.5.1	Morphologie der Osteoklasten . . . . .	36

2.5.2	Lokalisation von ClC-7 in Osteoklasten . . . . .	37
2.5.3	Messung der Resorptionsleistung von Osteoklasten in vitro . . . . .	40
2.5.4	Messung der Ansäuerung der Resorptionslakune . . . . .	42
2.6	ClC-7 befindet sich in späten Endosomen und Lysosomen . . . . .	42
2.7	Der Verlust von ClC-7 führt zu infantiler maligner Osteopetrose im Menschen	45
2.7.1	Mutationssuche in <i>CLCN7</i> in DNA von Osteopetrose-Patienten . . .	46
2.7.2	Auswirkungen der Mutationen in <i>CLCN7</i> . . . . .	46
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	49
3.2	Vergleich der angewandten Gentergeting-Strategien . . . . .	50
3.2.1	Linie C7A . . . . .	50
3.2.2	Linie C7B . . . . .	51
3.2.3	Effizienz des Gen-Targetings und Einfluss des genetischen Hintergrunds	52
3.3	Die Gewebeverteilung von ClC-7 . . . . .	53
3.4	Vergleich der <i>Clcn7</i> <sup>-/-</sup> -Maus mit anderen osteopetrotischen Mausmodellen .	54
3.4.1	Mutanten mit fehlender oder reduzierter Reifung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen . . . . .	55
3.4.2	Mutanten mit mehrkernigen, ultrastrukturell unvollständig ausdiffe- renzierten Osteoklasten . . . . .	56
3.4.3	Mutanten mit defekter Funktion der ausgereiften Osteoklasten . . . .	57
3.5	Das Krankheitsbild der humanen Osteopetrose im Vergleich . . . . .	58
3.6	Hinweise auf die Beziehung zwischen Struktur und Funktion von ClC-7 . . .	60
3.7	Der retinale Phänotyp der <i>Clcn7</i> <sup>-/-</sup> -Maus . . . . .	61
3.7.1	Ist die Erblindung Folge einer Kompression des Sehnervs? . . . . .	61
3.7.2	Der primär betroffene Zelltyp: RPE oder neuronale Zellen? . . . . .	62
3.7.3	Retinadegeneration in anderen ClC-Knockouts . . . . .	63
3.8	Mögliche Pathomechanismen der Zerebralen Neurodegeneration . . . . .	64
3.8.1	Eine Form der Neuronalen Zeroidlipofuszinose (NCL) entsteht ver- mutlich durch defekte Regulation des lysosomalen pH-Wertes . . . . .	66
3.8.2	Ein Mausmodell mit einer sehr ähnlichen Degeneration von Retina und Gehirn . . . . .	66
3.9	Molekulare Mechanismen des Transports von Protonen über Membranen . . .	67
3.9.1	Mechanismen und Funktion intrazellulärer Ansäuerung . . . . .	69
3.9.2	Mechanismen und Funktion extrazellulärer Ansäuerung . . . . .	72
3.9.3	Protonentransport in der Ruffled Border des Osteoklast . . . . .	73
3.10	Gemeinsamkeiten zwischen Ruffled Border Membran und späten Endosomen	74
3.11	Abschließende Bewertung der Ergebnisse . . . . .	75

<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>77</b>
4.1	Chemikalien und Enzyme . . . . .	77
4.2	Filmmaterial . . . . .	77
4.3	Zellen und Zellkulturmaterialien . . . . .	77
4.4	Antikörper . . . . .	77
4.5	Mikroskopie . . . . .	78
4.6	Puffer, Lösungen und Medien . . . . .	78
4.7	Bakterienstämme . . . . .	80
4.8	Vektoren . . . . .	80
4.9	Mikrobiologische Methoden . . . . .	80
4.9.1	Erzeugung elektrokompeter Bakterien . . . . .	80
4.9.2	Transformation von Bakterien . . . . .	80
4.9.3	Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien . . . . .	80
4.10	Zellbiologische Methoden . . . . .	81
4.10.1	Auftauen von kryokonservierten Zellen . . . . .	81
4.10.2	Trypsinieren von Fibroblasten . . . . .	81
4.10.3	Gewinnung und Kultivierung von embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF) . . . . .	81
4.10.4	Gewinnung und Kultivierung von humanen Fibroblasten . . . . .	82
4.10.5	Inaktivierung von embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF) . . . . .	82
4.10.6	Gewinnung transgener embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) . . . . .	82
4.10.7	Einfrieren von Zellen . . . . .	83
4.10.8	Kultivierung primärer Maus-Osteoklasten . . . . .	84
4.10.9	Kultivierung von aus Milzzellen differenzierten Osteoklasten . . . . .	84
4.10.10	Pit-Assay . . . . .	85
4.10.11	Messung der Ansäuerung durch Acridin Orange . . . . .	85
4.11	Erzeugung chimärer Founder-Tiere . . . . .	85
4.11.1	Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten . . . . .	85
4.11.2	Transfer von Blastozysten in scheinchwangere Mäuse . . . . .	86
4.12	Molekularbiologische Methoden . . . . .	87
4.12.1	Restriktion von DNA . . . . .	87
4.12.2	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	87
4.12.3	Isolierung von DNA . . . . .	87
4.12.4	Southern-Blot Analyse genomischer DNA . . . . .	89
4.12.5	Isolierung von RNA . . . . .	89
4.12.6	Gewinnung von PolyA(+)-RNA . . . . .	90
4.12.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	90
4.12.8	Northern-Blot Analyse von PolyA(+)-RNA . . . . .	90
4.12.9	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden und Hybridisierung von Northern- und Southern-Blots . . . . .	90
4.12.10	Erzeugung von cDNA . . . . .	91

4.12.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	91
4.12.12	Sequenzierung von DNA . . . . .	93
4.13	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	93
4.13.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen . . . . .	93
4.13.2	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) . . . . .	94
4.13.3	Western-Blot . . . . .	94
4.14	Histologische Techniken . . . . .	94
4.14.1	Gewebeschnitte . . . . .	94
4.14.2	Histologische Färbemethoden . . . . .	95
4.14.3	<i>in situ</i> Hybridisierung . . . . .	97
4.14.4	Färbung der Zellkerne mit TOTO-3 Iodid . . . . .	98
4.14.5	Immunhistologische Methoden . . . . .	98
4.14.6	Eindeckeln von Gewebeschnitten . . . . .	99
4.15	An Tieren durchgeführte Experimente . . . . .	100
4.15.1	Narkotisierung von Versuchstieren . . . . .	100
4.15.2	Sammeln und Analyse von Blut und Urin . . . . .	100
4.15.3	Perfusionsfixierung . . . . .	100
4.15.4	Endozytose von fluoreszenzmarkiertem <i>beta</i> -Lactoglobulin . . . . .	100
4.15.5	Röntgenaufnahmen . . . . .	101
4.15.6	Micro-CT . . . . .	101
4.16	Oligonukleotide (Primer) . . . . .	101
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
	<b>5 Abkürzungen</b>	<b>117</b>
	<b>6 Danksagung</b>	<b>119</b>
	<b>7 Kooperationen</b>	<b>121</b>
	<b>8 Veröffentlichungen</b>	<b>123</b>
	<b>9 Lebenslauf</b>	<b>125</b>
	<b>10 Zusammenfassung</b>	<b>127</b>
	<b>11 Abstract</b>	<b>129</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Topologie der ligandengesteuerten Ionenkanäle . . . . .	3
1.2	Topologie der spannungsgesteuerten Kationenkanäle . . . . .	5
1.3	Topologie von CFTR . . . . .	8
1.4	Phylogenetischer Stammbaum der CLC-Proteinfamilie . . . . .	10
1.5	Topologiemodell der CLC-Kanäle . . . . .	11
1.6	Chloridkanäle und vesikuläre Azidifizierung . . . . .	14
1.7	Wachstum des Röhrenknochens . . . . .	16
1.8	Funktionsweise des Osteoklasten . . . . .	17
2.1	Targeting-Vektoren . . . . .	19
2.2	Southern Blot Screening von ES-Zellen . . . . .	20
2.3	Nachweis des Fehlens von CLC-7 im Northern-Blot . . . . .	22
2.4	Durch Exon-Skipping entstehende Spleißprodukte von CLC-7 . . . . .	23
2.5	Western-Blot Analyse der Expression von CLC-7 . . . . .	24
2.6	Expression von CLC-7 im Embryo . . . . .	26
2.7	<i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Maus und Wildtyp-Geschwister P28 . . . . .	27
2.8	Entwicklung des Körpergewichts . . . . .	27
2.9	Röntgenaufnahmen des Skeletts und Histologie der Tibia . . . . .	29
2.10	Histologie der Retina bei P14, P22 und P28 . . . . .	30
2.11	Micro-CT des Schädels und Histologie des Sehnervs . . . . .	31
2.12	Veränderte Neuronen-Morphologie in der Nissl-Färbung . . . . .	32
2.13	Reaktive Astrogliose im <i>Clcn7<sup>-/-</sup></i> -Gehirn . . . . .	33
2.14	Nachweis von neuronalen intrazellulären Ablagerungen . . . . .	34
2.15	Ultrastruktur der neuronalen Ablagerungen . . . . .	35
2.16	Urinparameter . . . . .	36
2.17	Morphologie und TRAP-Expression der Osteoklasten . . . . .	38
2.18	Lokalisation von CLC-7 in Osteoklasten . . . . .	40
2.19	Pit Assay . . . . .	41
2.20	pH-Messung in Osteoklasten mit Acridin Orange . . . . .	42
2.21	Kolokalisation von CLC-7 mit subzellulären Markern . . . . .	44
2.22	Endozytose von $\beta$ -Laktoglobulin im proximalen Tubulus . . . . .	45
2.23	Mutationen in <i>CLCN7</i> und ihre Auswirkungen . . . . .	47

## *Abbildungsverzeichnis*

---

3.1	Entwicklungsstadien des Osteoklast . . . . .	59
3.2	Molekulare Mechanismen des Protonentransports . . . . .	68
4.1	Erzeugung von Knockout-Tieren aus embryonalen Stammzellen . . . . .	86