Untersuchungen zum gemeinsamen Schalten des lysosomalen Chlorid/Protonen-Austauschers ClC-7

vorgelegt von
Diplom Biophysikerin
Carmen Ludwig
geb. in Görlitz

von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr. Roderich Süssmuth
Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch
Gutachter: Prof. Dr. Thomas Friedrich

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 9. März 2015

Berlin 2015

Diese Arbeit wurde von Mai 2010 bis September 2014 unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin (MDC) und Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch
Abteilung Physiologie und Pathology des Ionentransports
Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin (MDC) und
Leibniz-Institut für Molekulare Pharamkologie (FMP) Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Friedrich
Institut für Chemie
Technische Universität Berlin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **1**

Abstract **2**

1. Einleitung **3**
1.1. Ionenkanäle . . . 3
1.2. Die Familie der CLC Chloridkanäle und -transporter . . . 4
1.2.1. Molekularer Aufbau der CLC's . . . 5
1.2.2. Funktionsweise des Ionentransportes . . . 6
1.2.3. *Gating* der CLC's . . . 9
1.2.4. Aufbau und Funktion der CBS-Domänen . . . 13
1.3. ClC-7, ein lysosomaler $2Cl^-/1H^+$-Austauscher . . . 15
1.3.1. Die ClC-7 Knockout-Maus . . . 16
1.3.2. Die β-Untereinheit Ostm1 . . . 16
1.3.3. *CLCN7/OSTM1*-Mutationen als Ursache humaner Osteopetrose 18
1.3.4. Biophysikalische Charakterisierung von ClC-7 . . . 19
1.4. Zielstellung dieser Arbeit . . . 21

2. Ergebnisse **23**
2.1. Elektrophysiologische Charakterisierung humaner ClC-7-Mutationen . . 23
2.1.1. Beobachtete Auswirkungen der Mutationen . . . 23
2.1.2. Einfluss der humanen Mutationen auf die Spannungsabhängigkeit von ClC-7 . . . 28
2.1.3. Zusammenhang zwischen Lokalisation und Auswirkung der Mutationen . . . 30
2.1.4. Untersuchung der Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche von ClC-7 . . . 31
2.2. Untersuchung des gemeinsamen Schaltens von ClC-7 . . . 34
2.2.1. Strategie . . . 34
2.2.2. Verifizierung der Strategie . . . 36
2.2.3. Der Einfluss „schneller" Mutationen auf das *common gate* von ClC-7 . . . 38
2.2.4. Kombination von „schnellen" Mutationen beschleunigt das *gating* nicht weiter . . . 41
2.3. Untersuchung des Chlorid-koordinierenden Tyrosins als mögliches inneres *gate* von ClC-7 . . . 42
2.3.1. Einfluss von Mutationen des Chlorid-koordinierenden Tyrosins auf die Kopplung von Chlorid- und Protonentransport . . . 42
2.3.2. Auswirkung der Mutationen Y600A und Y600S auf das *gating* von ClC-7 in Abhängigkeit vom pH-Wert . . . 47

3. Diskussion **49**
3.1. Auswirkungen der humanen Osteopetrose-Mutationen auf die Funktion von ClC-7 . . . 49

3.2. Was ist die physiologische Funktion des langsamen *gatings* von ClC-7? . 51
3.3. Die Rolle der Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche für das *common gating* 52
3.4. Physiologische Funktion des *common gatings* der CLC's 54
3.5. Was ist die Funktion des Chlorid-koordinierenden Tyrosins in ClC-7? . 55
3.6. Zusammenfassung und Ausblick 58

4. Materialien und Methoden 60
4.1. Materialien 60
4.1.1. Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien 60
4.1.2. Lösungen 60
4.1.2.1. Lösungen für Oozytenpräparation, -haltung und TEVC-Messungen 60
4.1.2.2. Lösungen für *patch clamp*-Messungen 61
4.1.2.3. Sonstige Lösungen 61
4.1.3. Plasmide 62
4.1.4. Zellen 64
4.1.4.1. Bakterien 64
4.1.4.2. Säugerzellen 64
4.1.4.3. *Xenopus laevis* Oozyten 64
4.1.5. Software 64
4.2. Methoden 65
4.2.1. Mikrobiologische Standardmethoden 65
4.2.2. Molekularbiologische Methoden 65
4.2.2.1. Behandlung und Manipulation von DNA 65
4.2.2.2. *In vitro* RNA-Synthese für die Injektion von Oozyten . 66
4.2.3. Zellbiologische Methoden 66
4.2.3.1. Kultur von HeLa-Zellen 66
4.2.3.2. Transiente Transfektion von HeLa-Zellen 66
4.2.3.3. Präparation von *Xenopus laevis* Oozyten 67
4.2.3.4. RNA-Mikroinjektion und Haltung von *Xenopus laevis* Oozyten 67
4.2.4. Elektrophysiologie 67
4.2.4.1. *Two Electrode Voltage-Clamp* (TEVC) 68
4.2.4.2. *Patch clamp* 70
4.2.5. Auswertung von elektrophysiologischen Daten 72
4.2.5.1. Ermittlung von Strom-Spannungs-Kurven 72
4.2.5.2. Analyse der Kinetik 72
4.2.5.3. Ermittlung der relativen Nitratleitfähigkeit 72
4.2.5.4. Ermittlung der Stöchiometrie des Ionenaustauschs . . 73
4.2.6. Erstellung des Homologiemodells mit Hilfe des I-Tasser Servers . 74

A. Anhang 76
A.1. Sequenzvergleich zur Erstellung des Homologiemodells 76
A.2. Sequenzvergleich ausgewählter CLC's 77

Literatur **80**

Abbildungsverzeichnis **93**

Tabellenverzeichnis **93**

Abkürzungsverzeichnis **95**

Publikationen **97**

Zusammenfassung

ClC-7 ist ein Chlorid/Protonen-Antiporter, der zusammen mit seiner β-Untereinheit Ostm1 in Lysosomen und der Resoptionslakune, welche vom Bürstensaum der Osteoklasten gebildet wird, lokalisiert. Während ClC-7 in Osteoklasten für die Aufrechterhaltung eines sauren pH-Wertes der Resorptionslakune notwendig ist, ist seine Funktion in Lysosomen noch nicht vollständig verstanden. ClC-7 scheint hier eine wichtige Rolle für die Akkumulation von Chloridionen zu spielen. Die physiologische Bedeutung von ClC-7 wird verdeutlicht durch den Phänotyp der ClC-7 Knockout Maus. Dieser ist gekennzeichnet von schwerer Osteopetrose, der Degeneration der Retina und der CA3-Region des Hippocampus. Des Weiteren sind etwa 50 Mutationen im Menschen bekannt, die mit der Entstehung von dominanter oder rezessiver humaner Osteopetrose unterschiedlicher Schweregrade in Verbindung gebracht werden. Mit Hilfe von Mutationen, die eine partielle Lokalisation von ClC-7 an der Plasmamembran hervorriefen, gelang erstmals eine elektrophysiologische Charakterisierung von ClC-7. Diese zeigte, dass ClC-7 ein langsam aktivierter, auswärts rektifizierender $2Cl^-/1H^+$-Austauscher ist. Während ClC-7 einige Merkmale wie z.B. die Ionenselektivität, die Stöchiometrie oder die starke Rektifizierung mit anderen CLC's teilt, ist die langsame Aktivierung einzigartig unter den intrazellulären CLC's.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine Charakterisierung der Auswirkung der humanen Mutationen auf ClC-7 vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass neben einer Reihe von Mutationen, welche zu einem Funktionsverlust des Proteins führen, viele Mutationen das *gating* von ClC-7 beschleunigen. Diese Mutationen befinden sich mehrheitlich an der Interaktionsfläche zwischen Transmembrandomäne und zweiter CBS-Domäne. „Schnelle" Mutationen sind in der Lage, in Heterodimeren auch das *gating* der Wildtyp-Untereinheit zu beschleunigen. Sie beeinflussen also das *common gating* von ClC-7, welches der langsamen Aktivierung zu Grunde liegt. Die Existenz eines *common gating*-Prozesses war bis jetzt nur für ClC-0, ClC-1 und ClC-2 bekannt; ClC-7 ist damit das erste intrazelluläre CLC, für das das Vorhandensein eines *common gates* gezeigt wurde. Die molekulare Identität des äußeren *gates* ist in ClC-7, wie auch in allen anderen CLC's, das *gating*-Glutamat. Welcher Teil des Proteins das innere *gate* der CLC-Transporter darstellt, ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird aber vermutet, dass das Chlorid-koordinierende Tyrosin, ein hochkonservierter Rest der Pore, das innere *gate* von EcClC-1, einem CLC-Transporter aus *E. coli*, bildet. Mit Hilfe der Bestimmung des Umkehrpotentials konnte nun gezeigt werden, dass in ClC-7 Mutationen dieses Tyrosins den Chlorid/Protonen-Antiport nicht entkoppeln. Somit ist das Chlorid-koordinierende Tyrosin nicht das innere *gate* von ClC-7, sondern scheint vielmehr ebenfalls eine wichtige Rolle für das *gating* zu spielen.

Abstract

ClC-7, a chloride/proton antiporter, localizes to lysosomes and to the ruffled border of osteoclasts together with its β-subunit Ostm1. While it is widely accepted that ClC-7 is necessary for the acidification of the resorption lacuna in osteoclasts, its role in the physiology of lysosomes is not well understood. Apparently, the function of ClC-7 in these organelles lies in chloride accumulation rather than pH regulation. The phenotype of ClC-7 knockout mice, that suffer from severe osteopetrosis, degeneration of the retina and the CA3 region of the hippocampus, emphasizes the physiological importance of ClC-7. Around 50 mutations in humans are known to cause recessive or dominant osteopetrosis of varying severity. Recently, the first electrophysiological characterization of ClC-7 that made use of a sorting mutant that partially localizes to the plasma membrane, showed that ClC-7 is a slowly activated, outwardly rectifying $2Cl^-/1H^+$ exchanger. While ClC-7 shares some of the features like ion selectivity, stoichiometry and strong rectification with other CLC's, its slow activation is unique among the intracellular CLC's.

Within the scope of this thesis the first characterization of effects of mutations related to human osteopetrosis has been performed. Some mutations resulted in loss-of-function while others accelerated the slow gating of ClC-7. These mutations mostly localize to the interface between transmembrane domain and second CBS domain and are able to accelerate gating *in trans* if present in a homodimer consisting of a mutant and a wildtype subunit. This reveals that common gating underlies the slow activation of ClC-7. So far, the existence of a common gate was only known for ClC-0, ClC-1 and ClC-2. ClC-7 is the first intracellular CLC that has been proven to show common gating as well. While it is widely accepted that the molecular identity of the outer gate is constituted by the gating-glutamate, it is still unclear which part of the protein forms the inner gate of CLC transporters. In this respect, a highly conserved tyrosine residue inside the pore that has a role in coordinating the central chloride ion has been discussed. However, experiments that led to this conclusion employed the bacterial transporter EcClC-1. Reversal potential measurements of two mutants of this residue in ClC-7 contradict this hypothesis, as these mutant proteins still appear to be coupled chloride/proton antiporters. Rather than being part of the inner gate, the tyrosine seems to play an important role for voltage dependent gating as well.

1. Einleitung

1.1. Ionenkanäle

Biologische Membranen ermöglichen die Abgrenzung der Zelle von ihrer Umwelt ebenso wie die Abgrenzung der Zellkompartimente wie z.B. Mitochondrien und Lysosomen gegenüber dem Zytosol. Dies erlaubt die Aufrechterhaltung von in Ionenkonzentration und Proteinausstattung verschiedener Milieus zu beiden Seiten der Membran. Die Lipiddoppelschicht der Membran erlaubt die Diffusion von kleinen, unpolaren Molekülen aber verhindert aufgrund ihrer Hydrophobizität die Diffusion von geladenen Ionen und organischen Verbindungen sowie Makromolekülen wie Proteinen. Der notwendige Transport dieser Stoffe über die Membran erfolgt mit Hilfe spezieller integraler Proteine, welche durchlässige Poren in der Membran bilden. Ionen leitende Membranproteine - sogenannte Ionenkanäle - erfüllen eine Vielfalt von Funktionen wie z.B. die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials oder die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen.

Man unterscheidet im Wesentlichen nach der Art des Transports in Kanäle und Transporter. Ionenkanäle erleichtern die passive Diffusion der Ionen durch die Membran in Richtung eines geringeren elektrochemischen Potentials. Im Gegensatz dazu betreiben Transporter den aktiven Transport ihres Substrates entegegen dessen Konzentrationsgradienten. Dabei wird entweder Adenosintriphosphat (ATP) gespalten und die aus der Hydrolyse frei werdende Energie direkt genutzt oder der Kotransport eines zweiten Substrates in Richtung dessen Konzentrationsgradienten treibt den (sekundär) aktiven Transport an. Weiterhin kann man Ionenkanäle, abgesehen vom Modus des Transports, nach einer Reihe weiterer Eigenschaften klassifizieren. Sie zeichnen sich z.B. durch die Selektivität für bestimmte Ionen oder Gruppen von Ionen aus und ihr Schließverhalten kann auf verschiedene Weise reguliert werden. So existieren z.B. liganden- und spannungsgesteuerte Ionenkanäle aber auch Ionenkanäle, die auf mechanische Stimuli reagieren.

Ionenkanäle und -transporter haben außerordentliche physiologische Bedeutung. Ein bekanntes Beispiel ist z.B. das Aktionspotential, welches durch die Öffnung schneller, ligandengesteuerter Natriumkanäle der postsynaptischen Membran initiiert wird. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle bewirken dann die Weiterleitung des Aktionspotentials während spannungsgesteuerte Kaliumkanäle eine wichtige Rolle für die Repolarisation der Membran spielen. Ein Beispiel für einen aktiven Ionentransporter ist die H^+-ATPase, welche die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie nutzt, um

Protonen entgegen ihres elektrochemischen Gradienten in Lysosomen zu pumpen und somit für eine Ansäuerung derselben sorgt.

1.2. Die Familie der CLC Chloridkanäle und -transporter

Das erste identifizierte Mitglied dieser spannungsabhängigen Familie von Chloridkanälen und -transportern - ClC-0 - stammt aus dem Zitterrochen *Torpedo marmorata*. ClC-0 Ströme wurden erstmals von White und Miller (1979) beschrieben und das kodierende Gen von Thomas Jentsch kloniert (Jentsch et al., 1990). Die Familie der CLC Chloridkanäle und -transporter ist evolutionär hochkonserviert; Vertreter der CLC-Proteine finden sich in allen Phyla - in Bakterien ebenso wie in Säugetieren (Jentsch, 2008). Säugetiere besitzen, wie in Abbildung 1.1 gezeigt, insgesamt neun CLC-Proteine. ClC-1, ClC-2, ClC-Ka und ClC-Kb sind Chlorid-Kanäle der Plasmamembran (Pusch et al., 1994; Thiemann et al., 1992; Estévez et al., 2001), während ClC-3 bis ClC-7 in endosomalen und lysosomalen Membranen vorkommen und Cl^-- und H^+-Austauscher sind (Picollo und Pusch, 2005; Scheel et al., 2005; Neagoe et al., 2010; Leisle et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität von ClC-Ka und ClC-Kb von der Anwesenheit von Barttin, einem kleineren Typ III Membranprotein abhängt (Estévez et al., 2001). Auch ClC-7 benötigt eine β-Untereinheit - das Typ I Membranprotein Ostm1 (Lange et al., 2006). Vor kurzem wurde außerdem eine modulierende Wirkung von GlialCAM auf ClC-2 beschrieben (Jeworutzki et al., 2012; Hoegg-Beiler et al., 2014), weshalb GlialCAM als Hilfsuntereinheit von ClC-2 bezeichnet wird.

CLCs erfüllen eine Vielzahl physiologisch wichtiger Funktionen (siehe Abbildung 1.1). Während ClC-1 wichtig für die Stabilisierung des Membranpotentials von Muskelzellen ist (Steinmeyer et al., 1991), spielen ClC-2 und die ClC-K's eine Rolle für die extrazelluläre Ionenhomöostase (Bösl et al., 2001; Blanz et al., 2007) und die neuronale Erregbarkeit (Staley et al., 1996; Rinke et al., 2010) bzw. für den transepithelialen Chlorid-Transport (Simon et al., 1997; Matsumura et al., 1999). Die Rolle der intrazellulären Cl^-- und H^+-Austauscher - vor allem von ClC-3, ClC-4 und ClC-6 - ist hingegen noch nicht vollständig verstanden. Für ClC-5 und ClC-7 wurde jedoch eine Beteiligung an der Regulierung der endo-lysosomalen Ionen-Homöostase nachgewiesen (Günther et al., 2003; Novarino et al., 2010; Graves et al., 2008; Weinert et al., 2010).

Die physiologische Bedeutung der CLC-Proteine wird außerdem durch ihre Assoziation mit humanen Erkrankungen hervorgehoben. Mutationen in ClC-1 führen zur Muskelschwäche Myotonia Congenita (Steinmeyer et al., 1991; Koch et al., 1992). ClC-2 wurde

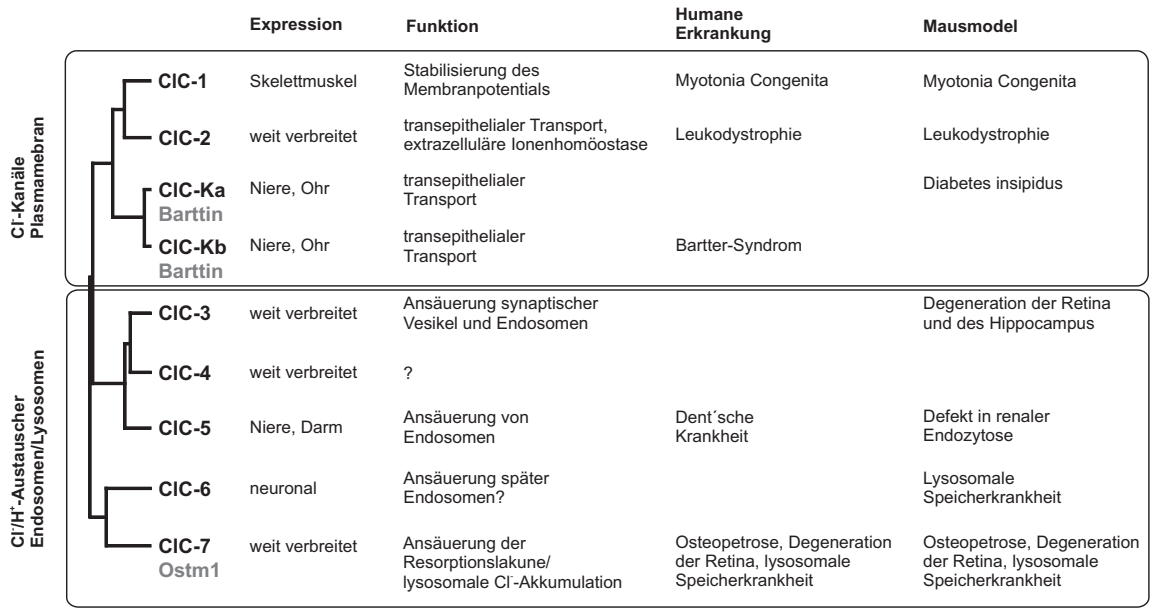


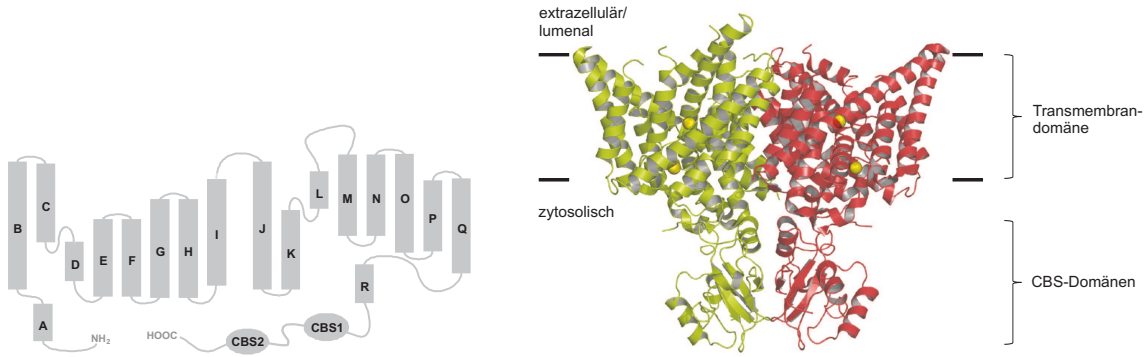
Abbildung 1.1: Die Familie der CLC-Proteine. In Säugetieren besteht die Familie der ClC-Ionenkanäle und -transporter aus den in der Plasmamembran lokalisierten Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka und ClC-Kb sowie den intrazellulären Cl^-- und H^+-Austauschern ClC-3 bis ClC-7. Einige ClC´s sind mit humanen Erbkrankheiten assoziiert. ClC-Ka und ClC-Kb benötigen Barttin, ClC-7 benötigt Ostm1 als β-Untereinheit. Aus Jentsch (2008), bearbeitet.

kürzlich mit Leukodystrophie in Verbindung gebracht (Depienne et al., 2013), während ClC-Kb an der Entstehung des Bartter-Syndroms beteiligt ist (Simon et al., 1997). Mutationen in ClC-5 und ClC-7 führen zur Entstehung der Dent'schen Krankheit (Fisher et al., 1994; Lloyd et al., 1996) bzw. Osteopetrose (Kornak et al., 2001).

1.2.1. Molekularer Aufbau der CLC's

CLC Proteine bestehen, wie in Abbildung 1.2a schematisch dargestellt, aus einer aus 18 α-Helices gebildeten Transmembrandomäne, wobei die α-Helices J-Q eine strukturelle Wiederholung der α-Helices B-I darstellen. Diese weisen jedoch eine entgegengesetzte Orientierung auf, was zu einer pseudo-zweifachen Symmetrieachse innerhalb der Membran führt (Dutzler et al., 2002). Eukaryotische und einige prokaryotische CLCs besitzen zusätzlich zwei C-terminale intrazelluläre CBS (Cystathionin-β-Synthase)-Domänen, die wiederum aus je zwei α-Helices und zwei β-Faltblättern bestehen.

CLC Proteine bilden Dimere, wobei jedes Monomer über eine eigene Pore verfügt. Dies wurde anhand früher Einzelkanal-Messungen vermutet (Miller, 1982) und später mit Experimenten an Konkatemeren bestätigt (Ludewig et al., 1996; Middleton et al.,



(a) **(b)**

Abbildung 1.2: Molekularer Aufbau der CLC Proteine. (a) Topologiemodel der CLCs. Die α-Helices A bis R bilden die Transmembrandomäne, an deren C-Terminus sich die zytosolischen CBS-Domänen anschließen. (b) Kristallstruktur von CmClC (Feng et al., 2010). Die zwei Untereinheiten des Dimers sind in rot bzw. grün, die Chlorid-Ionen als gelbe Sphären dargestellt.

1996). Diese zeigten deutlich drei Niveaus verschiedener Leitfähigkeiten, die durch die Einführung spezieller Mutationen verändert werden konnten.

Es wurden Kristallstrukturen von insgesamt vier verschiedenen CLC Cl^-- und H^+-Antiportern publiziert. Neben den bakteriellen CLCs StClC aus *Salmonella typhimurium* und EcClC-1 aus *Escherichia coli* (Dutzler et al., 2002) wurden die Kristallstruktur von SyClC aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* (Jayaram et al., 2010) und mit CmClC aus der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* die einzige Struktur eines eukaryotischen CLC's gelöst (Feng et al., 2010). Diese ist zugleich die einzige Kristallstruktur eines CLCs mit CBS-Domänen. Sie zeigte neben der schon bekannten hohen Form-Komplementarität der beiden Untereinheiten an deren Interaktionsfläche eine mit einer Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zu vergleichende Interaktion der CBS-Domänen mit der Transmembrandomäne (Feng et al., 2010).

1.2.2. Funktionsweise des Ionentransportes

Wie in Abbildung 1.3 dargestellt, besitzen CLC-Transporter an der intrazellulären Seite des Proteins getrennte Transportwege für Protonen und Chloridionen, welche jedoch an der extrazellulären/lumenalen Seite konvergieren (Accardi et al., 2005). Prinzipiell funktioniert der Transport beider Ionen in beide Richtungen (Accardi und Miller, 2004). Es gibt zwei für den Ionentransport bedeutende Glutamatreste, das „*gating*-Glutamat“ (Glu_{ex}) und das „Protonen-Glutamat“ (Glu_{in}). Das *gating*-Glutamat ist hochkonserviert, nur ClC-Ka und ClC-Kb besitzen stattdessen ein Valin. Dieser Rest kann mit Chloridionen um dessen Bindungsstellen in der Porenregion konkurrieren

(Dutzler et al., 2002, 2003) und somit das Eintreten und Passieren externer Chloridionen sterisch verhindern. Das *gating*-Glutamat spielt außerdem für die Cl^-- und H^+-Antiporter eine wichtige Rolle für die Kopplung von Chlorid- und Protonentransport. Wird das *gating*-Glutamat des EcClC-1 durch ein Alanin ersetzt (E148A), so verwandelt dies EcClC-1 in einen passiven Chloridkanal; Protonentransport findet nicht mehr statt (Accardi und Miller, 2004). Die gleiche Beobachtung wurde auch mit den entsprechenden Mutationen in ClC-4 und ClC-5 (Scheel et al., 2005; Picollo und Pusch, 2005), sowie ClC-6 (Neagoe et al., 2010) und ClC-7 (Leisle et al., 2011) gemacht. Da in diesen Mutanten das Öffnungs- und Schließverhalten des Kanals - das *gating* - nicht mehr abhängig von der Spannung ist, sondern sie konstitutiv offene Kanäle bilden, wird dieser Glutamatrest als *gating*-Glutamat bezeichnet. Die Kristallstruktur der E148Q-Mutante des EcClC (siehe Abbildung 1.4c) zeigte außerdem, dass sich die Glutamin-Seitenkette außerhalb der Porenregion befindet (Lobet und Dutzler, 2006). Dies ist ein Indiz dafür, dass das *gating*-Glutamat im Falle einer Protonierung nach außen schwingt, die Pore frei gibt und auf diese Weise den Durchfluss von Chloridionen ermöglicht.

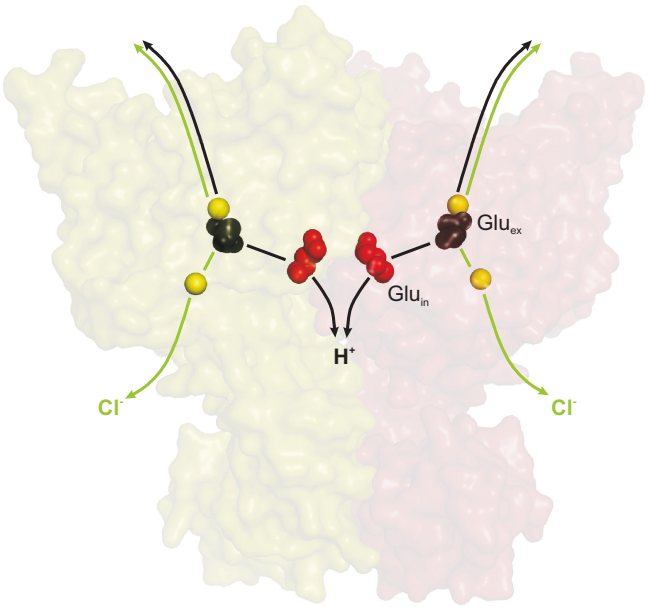
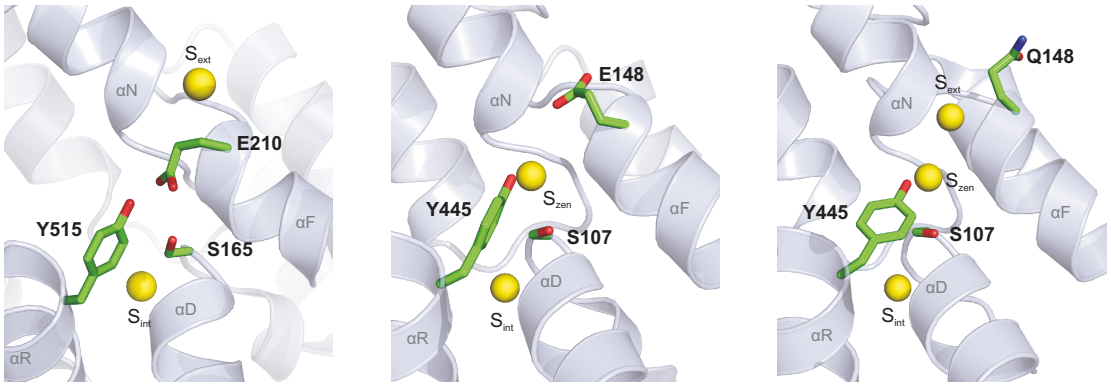


Abbildung 1.3: Cl^-- und H^+-Transportwege. Übersicht über die Ionentransportwege in der Kristallstruktur von CmClC (PDB ID: 3ORG). Die beiden Untereinheiten sind in grün bzw. dunkelrot, die Chloridionen als gelbe Sphären, das externe Glutamat (Glu_{ex}, „*gating*-Glutamat“) ist in schwarz, das interne Glutamat (Glu_{in}, „Protonen-Glutamat“) in rot dargestellt. Das „Protonen-Glutamat“ ist im CmClC nicht konserviert sondern ein Threonin.

Das Protonen-Glutamat dagegen ist nur in den meisten CLC Cl^-/H^+-Antiportern konserviert. Bekannte Ausnahmen sind das CmClC, in dem dieser Rest durch ein Threonin ersetzt ist und ein ClC aus *Citrobacter koseri*, das an dieser Stelle ein Isoleucin besitzt (Phillips et al., 2012). Die Chloridkanäle der CLC-Familie besitzen ein Valin an dieser

Position. Das Protonen-Glutamat dient als intrazellulärer Protonenakzeptor (Accardi et al., 2005) und ist für den Protonentransport in den meisten CLC Cl^-/H^+-Antiportern unerlässlich, wie mit den entsprechenden Mutationen in ClC-4 und ClC-5 bewiesen wurde, die sowohl Protonen- als auch Chloridtransport aufhoben (Zdebik et al., 2008). Dies ist konsistent mit der Theorie, dass es eine zentrale Stelle (das *gating*-Glutamat) gibt, an der die Kopplung von Chlorid- und Protonentransport erfolgt. Wird der Protonentransport durch eine Neutralisierung des Protonen-Glutamates verhindert, so kann aus diesem Grund auch kein Chloridtransport stattfinden. (Eine Ausnahme stellt in diesem Fall EcClC-1 dar, in dem die Neutralisierung des Protonen-Glutamats wieder eine reine Chloridleitfähigkeit generiert (Accardi et al., 2005).) Neutralisiert man in ClC-4 und ClC-5 zusätzlich zum Protonen-Glutamat das *gating*-Glutamat, so wird die Chloridleitfähigkeit wiederhergestellt. Außerdem kann das Protonen-Glutamat auch durch andere protonierbare Reste wie Aspartat, Histidin oder Tyrosin ersetzt werden ohne den Protonentransport komplett aufzuheben (Zdebik et al., 2008).



(a) **(b)** **(c)**

Abbildung 1.4: Wichtige Aminosäuren der Pore. Nahansicht der Porenregion in den Kristallstrukturen von (a) CmClC (PDB ID: 3ORG), (b) EcClC (PDB ID: 1OTS) und (c) EcClC E148Q (PDB ID: 1OTU). Gezeigt sind jeweils die für die Koordinierung der Chloridionen wichtigen Reste S165 (CmClC) bzw. S107 (EcClC) („Chlorid koordinierendes Serin"), E210 (CmClC) bzw. E148 (EcClC) („*gating*-Glutamat") und Y515 (CmClC) bzw. Y445 (EcClC) („Chlorid koordinierendes Tyrosin") sowie die beteiligten α-Helices. Die Chloridbindungsstellen sind, sofern ein Chloridion gebunden ist, mit S_{ext} für die externe, S_{zen} für die zentrale und S_{int} für die interne Bindungsstelle bezeichnet.

In der Porenregion der CLC's befinden sich, wie aus Abbildung 1.4 ersichtlich, drei Bindungsstellen für Chloridionen, eine externe (S_{ext}), eine zentrale (S_{zen}) und eine interne Bindungsstelle (S_{int}). Sowohl interne als auch externe Bindungsstelle haben Kontakt zur intra- bzw. extrazellulären/lumenalen Lösung, die zentrale Bindungsstelle befindet sich dagegen in der Mitte der Membran und ist isoliert. Bindet ein Chloridion an die zentrale Bindungsstelle, so liegt dieses entweder vollständig oder teilweise dehydratisiert vor

(Dutzler et al., 2003; Feng et al., 2010). Es wird in dieser Position durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Amid-Stickstoffen der Helices F, D und N stabilisiert und von einem konservierten Serin- und Tyrosinrest koordiniert, wie in Abbildung 1.4b und c am Beispiel des EcClC gezeigt ist. Der Serinrest spielt eine wichtige Rolle für die Ionenselektivität und scheint zugleich der einzige Rest zu sein der über diese entscheidet. Ein ClC aus *Arabidopsis thaliana*, AtClC-a, ist ein NO_3^-/H^+-Antiporter und besitzt an dieser Position ein Prolin statt des Serins (De Angeli et al., 2006). AtClC-a kann durch Mutation dieses Prolins zu einem Serin in einen Cl^-/H^+-Antiporter verwandelt werden, ebenso wie die entgegengesetzte Mutation die Nitratleitfähigkeit von ClC-0, EcClC und ClC-5 drastisch erhöht (Zifarelli und Pusch, 2009; Bergsdorf et al., 2009; Picollo et al., 2009). Mutationen des Chlorid koordinierenden Tyrosins führen dagegen, ähnlich einer Neutralisierung des *gating*-Glutamates, zu einer teilweisen oder vollständigen Entkopplung des Chloridtransportes vom Protonentransport (Accardi et al., 2006; Walden et al., 2007).

Wie aus Abbildung 1.4 ersichtlich und bereits erwähnt, kann das *gating*-Glutamat mit den Chloridionen um die zentrale und die externe Bindungsstelle konkurrieren. Aus der Tatsache, dass die drei hier gezeigten Kristallstrukturen das *gating*-Glutamat (beziehungsweise im Falle der E148Q-Mutante aus Abbildung 1.4c das Glutamin) in je einer anderen Position (zentrale Bindungsstelle - externe Bindungsstelle - außerhalb der Pore) zeigen, wurde geschlossen, dass möglicherweise diese Kristallstrukturen das *gating*-Glutamat in seinen verschiedenen Konformationen im Zuge des Transportzyklus zeigen (Feng et al., 2010).

1.2.3. *Gating* der CLC's

Gating bezeichnet den Übergang eines Ionenkanals bzw. -transporters zwischen leitenden und nicht leitenden Zuständen. Ein *gate* ist demnach ein Teil des Proteins, der eine offene und eine geschlossene Konformation einnehmen kann und somit eine Translokation von Ionen erlaubt bzw. verhindert (Hille, 2001; Gadsby, 2009). Der fundamentale Unterschied zwischen Ionenkanälen und Transportern auf molekularer Ebene besteht, laut dem gängigen Modell (Csanády und Mindell, 2008; Gadsby, 2009), in der Anzahl der vorhandenen *gates*. Wie in Abbildung 1.5 dargestellt, benötigen Ionenkanäle nur ein einziges *gate* um den Ionenfluss zu regulieren, Ionentransporter dagegen zwei - ein inneres und ein äußeres.

Die beiden *gates* eines Ionentransporters dürfen nie gleichzeitig geöffnet sein, da dies zu einer Entkopplung des Transportes der verschiedenen Substrate führen würde. Aus

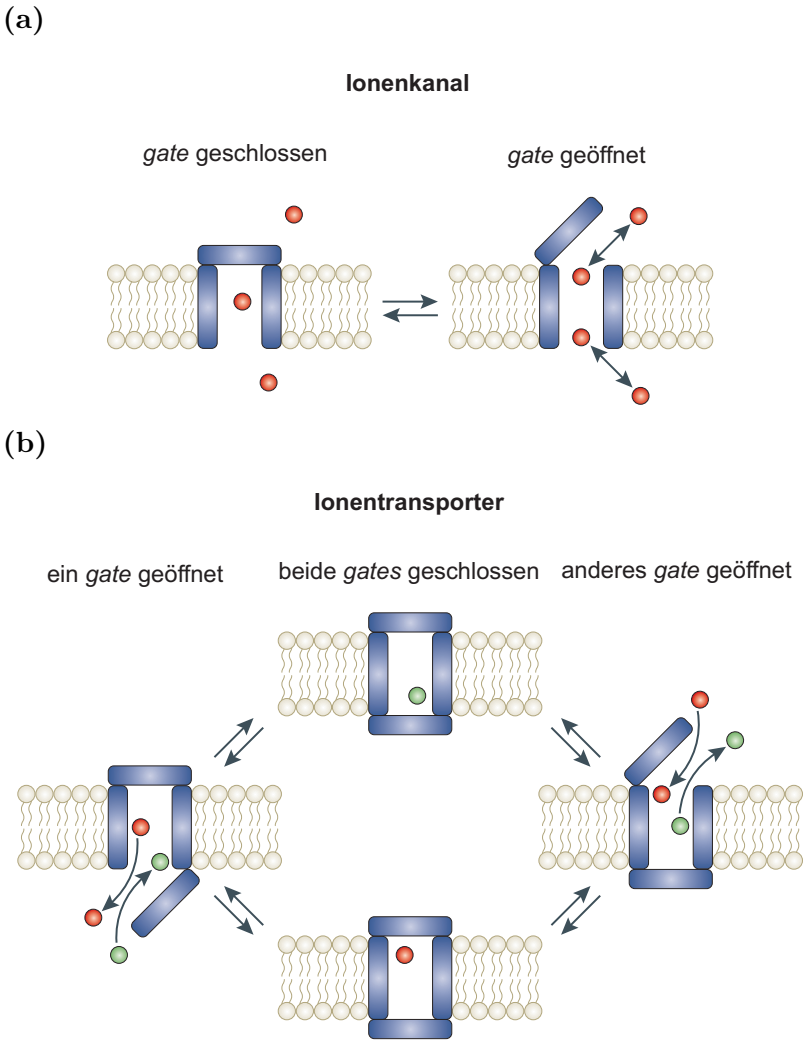


Abbildung 1.5: Ionenkanäle und -transporter besitzen eine verschiedene Anzahl an *gates*. (a) Schematische Darstellung eines Ionenkanals mit einem einzigen *gate*, welches einen offenen und einen geschlossenen Zustand einnehmen kann. (b) Ionentransporter dagegen besitzen ein inneres und ein äußeres *gate* die beide geöffnet sein müssen um Ionen passieren zu lassen. Adaptiert von Gadsby (2009).

diesem Grund besitzen Transporter einen *occluded state*, bei dem im Gegensatz zum einfachen geschlossenen Zustand beide *gates* geschlossen sind und Ion(en) im Inneren des Transporters gebunden sind.

In den CLC Ionenkanälen wurde das *gating*-Glutamat als das *gate* identifiziert (Dutzler et al., 2003). Dieses ist zugleich auch das äußere *gate* der CLC Ionentransporter (Dutzler et al., 2002; Accardi und Miller, 2004; Miller, 2006; Jayaram et al., 2008). Das innere *gate* wird vermutlich zumindest zum Teil vom Chlorid-koordinierenden Tyrosin gebildet, da Mutationen dieser Aminosäure ebenso wie Mutationen des *gating*-Glutamates Chlorid- und Protonentransport von EcClC 1 entkoppeln (Accardi et al., 2006; Wal-

den et al., 2007). Es ist jedoch anzumerken, dass es noch andere Restriktionen für den Durchfluss der Chloridionen geben muss, da die Mutation beider Aminosäuren zu Alanin in EcClC-1 zwar zu einem drastischen Anstieg des Chloridleitwertes von ca. 2000 Cl^-/s auf 20000 Cl^-/s führt (Jayaram et al., 2008), diese Doppelmutante aber bei weitem nicht den Leitwert der Chloridkanäle erreicht, der etwa zwei bis drei Größenordnungen über diesem Wert liegt (Miller, 1982; Pusch et al., 1994; Saviane et al., 1999; Weinreich und Jentsch, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass die CLC Ionenkanäle evolutionär aus den CLC Ionentransportern hervorgegangen sind, indem der *occluded state* durchlässig für Chloridionen geworden ist. Diese Annahme stützt sich auf den Fakt, dass auch das *gating* von ClC-0 an die Translokation von Protonen über die Plasmamembran gebunden ist (Lísal und Maduke, 2008).

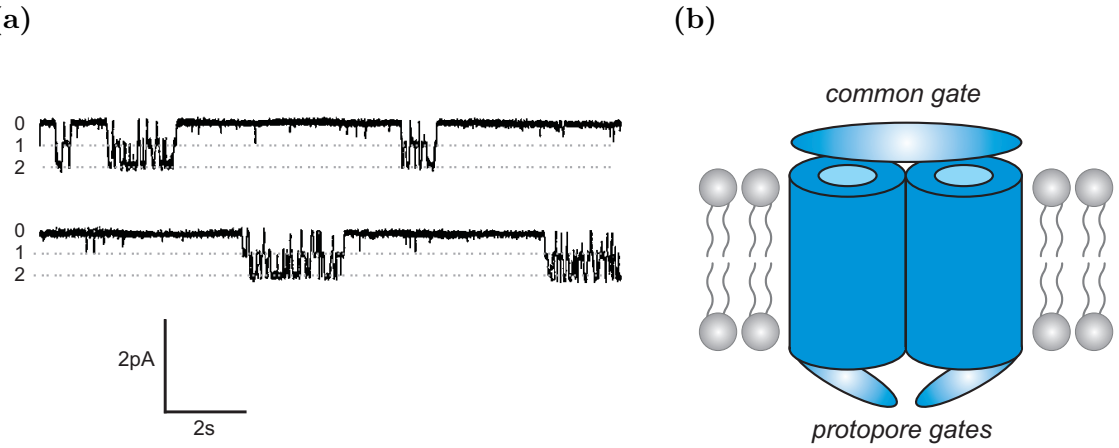


Abbildung 1.6: ClC Ionenkanäle besitzen *protopore* und *common gates*. (a) Einzelkanalmessungen (-20 mV, $[Cl]_{ext}$=4 mM, $[Cl]_{int}$=150 mM) von ClC-0 zeigen drei diskrete Niveaus, wie für einen dimeren Ionenkanal mit zwei unabhängigen Poren erwartet. Die Zahlen geben an wie viele Poren jeweils geöffnet sind, 0 steht demnach für zwei geschlossene Poren, 2 für zwei geöffnete Poren. Erkennbar sind außerdem längere inaktive Phasen und Phasen gehäufter Aktivität, ein Sachverhalt der auf die Existenz eines *common gates* zurückgeführt werden kann. Adaptiert von (Chen und Miller, 1996) (b) Schematische Darstellung eines ClC-Dimers mit zwei *protopore gates* und dem *common gate*.

Das *gating* der CLC's ist jedoch weitaus komplexer als bisher beschrieben und involviert nicht nur das *gating*-Glutamat bzw. das Chlorid-koordinierende Tyrosin. Aus den Einzelkanalmessungen in Abbildung 1.6a ist ersichtlich, dass ClC-0 drei distinkte Zustände unterschiedlicher Leitwerte einnehmen kann: einen geschlossenen Zustand (beide Poren geschlossen), einen Zustand mittleren Leitwerts (eine Pore geöffnet) und einen Zustand mit maximalem Leitwert (beide Poren geöffnet). Beide Poren besitzen also ein unabhängiges *gating*, das sogenannte *protopore gating*. Dieses ist auf die Fluktuation des *gating*-Glutamats zurückzuführen, welches sich sehr schnell zwischen zentraler/externer Chloridbindestelle und Extrazellulärraum bewegen kann und somit

den Durchfluss von Chloridionen verhindert bzw. erlaubt. Des Weiteren sind außerdem längere Phasen kompletter Inaktivität neben den Phasen gehäufter Aktivität erkennbar. Es existiert also, wie in Abbildung 1.6b schematisch dargestellt, zusätzlich zum *protopore gating* ein sogenanntes *common gating*. Dies ist ein Mechanismus, der in der Lage ist, beide Poren gemeinsam zu öffnen oder zu schließen. In ClC-0 ist das *common gating* im Vergleich zum *protopore gating* ein sehr langsamer Prozess, man bezeichnet diese Vorgänge aus diesem Grund auch als *slow* bzw. *fast gating*. Die Ursache für die Langsamkeit des *common gatings* sind im Zuge dessen auftretende größere Sekundärstrukturänderungen, welche diesen Prozess stark temperaturabhängig machen und in einem relativ großen Q_{10}-Wert von ~40 widergespiegelt werden (Pusch et al., 1997). Die Existenz eines *common gates* wurde bis jetzt für ClC-0, ClC-1 und ClC-2 gezeigt (Miller, 1982; Saviane et al., 1999; de Santiago et al., 2005), wobei das *common gating* von ClC-0 am besten untersucht ist. Die Ursache hierfür ist die relativ einfache Unterscheidbarkeit zwischen *protopore* und *common gating*-Prozessen in ClC-0, da das *protopore gate* durch Depolarisation in wenigen Millisekunden, das *common gate* dagegen langsamer (im Bereich von Sekunden) durch Hyperpolarisation aktiviert wird. Mit dieser Information lassen sich Spannungsprotokolle entwickeln, mit denen unter Ausnutzung der verschiedenen Zeitkonstanten und Spannungsabhängigkeiten beider *gates* diese in Isolation voneinander untersucht werden können. Die Separierung beider *gating*-Prozesse in ClC-1 und ClC-2 ist dagegen schwieriger, da die Zeitkonstanten und Spannungsabhängigkeiten beider Prozesse ähnlicher sind (Saviane et al., 1999; de Santiago et al., 2005) als bei ClC-0.

Das *gating* der CLC's ist nicht nur spannungsabhängig, es kann auch von Chloridionen und pH-Wert beeinflusst werden. Eine hohe externe Chloridionenkonzentration verschiebt die Spannungsabhängigkeit des *protopore gates* von ClC-0 zu negativeren Spannungen (Pusch et al., 1995). Eine hohe intrazelluläre Protonenkonzentration erhöht ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit des *protopore gates* bei niedrigeren Spannungen (Hanke und Miller, 1983). Das *common gating* kann ebenfalls von pH-Wert und Chloridionenkonzentration, aber auch von der Temperatur beeinflusst werden (Hanke und Miller, 1983; Chen und Miller, 1996; Pusch et al., 1997, 1999). Für ClC-1 und ClC-2 wurden ähnliche Befunde publiziert (Rychkov et al., 1996; Pusch et al., 1999; Niemeyer et al., 2003). Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Studien ist, dass das *gating* und die Translokation von Chloridionen verbunden sind (Pusch et al., 1995; Chen und Miller, 1996). Dies wurde aus der Tatsache geschlossen, dass sowohl Leitfähigkeit als auch Offenwahrscheinlichkeit von ClC-0 ein ähnliches *anomalous mole fraction*-Verhalten in der Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Nitrationen zeigen. Dies impli-

ziert auch, dass die *gating*-Ladung vom Chloridion selbst dargestellt wird (Pusch et al., 1995).

Die auf molekularer Ebene stattfindenden Prozesse im Zuge des *common gatings* bzw. die Identität des *common gates* sind noch nicht vollständig verstanden, einige Arbeiten geben jedoch Hinweise auf am *common gating* beteiligte Strukturen. So wurde z.B. gezeigt, dass einige dominante Myotonia Congenita-auslösende Mutationen sich an der Dimer-Interaktionsfläche befinden und das *common gating* von ClC-1 verändern (Saviane et al., 1999; Duffield, 2003). Es ist weiterhin eine Punktmutation (C212S in Helix G) bekannt, die das *common gate* von ClC-0 permanent geöffnet hält und die Sensitivität des *common gates* von ClC-0 gegenüber Zinkionen verringert (Lin et al., 1999). Einige Veröffentlichungen bringen die cytoplasmatischen CBS-Domänen mit dem Sitz des *common gates* in Verbindung (Fong et al., 1998; Bykova et al., 2006; Ma et al., 2011). Dies wird genauer im nächsten Abschnitt erläutert.

1.2.4. Aufbau und Funktion der CBS-Domänen

Im Gegensatz zu den bakteriellen CLC's besitzen alle eukaryotischen und auch einige prokaryotische CLC's große cytoplasmatische C-Termini, die aus zwei Kopien von Cystathionin-β-Synthase (CBS)-Domänen bestehen (Bateman, 1997; Ponting, 1997). In Abbildung 1.7 sind der Aufbau und die Lage der CBS-Domänen bezüglich des Transmembranbereiches am Beispiel der Kristallstruktur von CmClC gezeigt.

Die CBS-Domänen sind mit dem Transmembranbereich über einen Linker verbunden der sich an die Helix R anschließt. Dieser Linker kommt in engen Kontakt mit der zweiten CBS-Domäne, die er überspannt und dann in die erste CBS-Domäne übergeht. An die erste CBS-Domäne schließt sich die zweite CBS-Domäne an, die wiederum eine ausgedehnte Interaktionsfläche mit der Transmembrandomäne bildet (Feng et al., 2010). Teil dieser Interaktionsfläche sind auch die C-terminalen Enden der Helices D und R. Diese Helices erstrecken sich bis in die Porenregion und beherbergen dort sowohl das zentrale Serin (S165 in Helix D) als auch das Chlorid-koordinierende Tyrosin (Y515 in Helix R).

Es ist bekannt, dass CBS-Domänen oft regulatorische Funktionen besitzen (Ignoul und Eggermont, 2005), jedoch ist die genaue Funktion dieser Domänen nicht für alle CLC's geklärt. Es wurde gezeigt, dass in ClC-0 und ClC-1 eine Trunkation nach der ersten CBS-Domäne zu nicht-funktionellen Kanälen führt (Maduke et al., 1998; Schmidt-Rose und Jentsch, 1997). Die Koexpression des löslichen C-Terminus führt jedoch zur

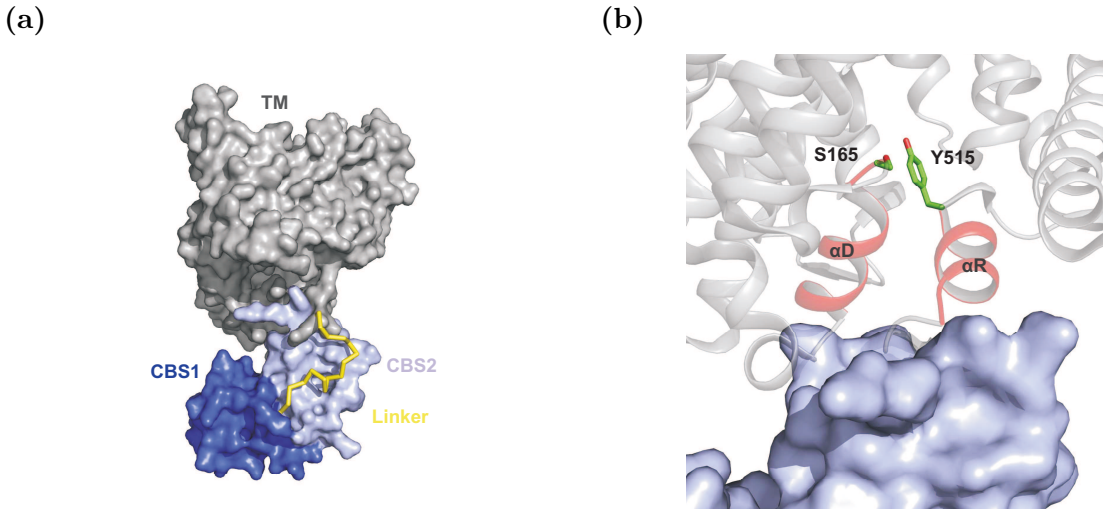


Abbildung 1.7: Lokalisation und Struktur der CBS-Domänen (a) Übersicht über die Lage und den Aufbau des C-Terminus von CmClC. An die Helix R des CmClC schließt sich ein Linker (gelb) an, der den Transmembranteil (grau) mit der ersten CBS-Domäne (CBS1, dunkelblau) verbindet. Die zweite CBS-Domäne (CBS2, hellblau) befindet sich in unmittelbarer Nähe des Transmembranbereiches (TM) und bildet mit ihr eine Interaktionsfläche. (b) Nahansicht der Interaktionsfläche zwischen Transmembranbereich und zweiter CBS-Domäne. Die Helices D und R (rot) kommen in engen Kontakt mit der zweiten CBS-Domäne. Zugleich sind das zentrale Serin (S165) und das Chlorid-koordinierende Tyrosin (Y515) Teil dieser beiden Helices.

Wiederherstellung funktioneller Kanäle. Generell führen Deletionen oder Mutationen im C-Terminus häufig zu schlecht exprimierbaren oder nicht-funktionellen Proteinen (Hryciw, 1998; Hebeisen et al., 2004; Estévez et al., 2004) und zu veränderter subzellulärer Lokalisation (Carr et al., 2003). Die physiologische Bedeutung der CBS-Domänen wird weiterhin unterstrichen durch die Vielzahl von bekannten krankheitsauslösenden Mutationen in CBS-Domänen (Koch et al., 1992; Lloyd et al., 1996; Simon et al., 1997; Shan und Kruger, 1998; Milan et al., 2000; Blair et al., 2001; Cleiren et al., 2001; Kornak et al., 2001; Bowne et al., 2002; Kennan et al., 2002).

Wie in Abschnitt 1.2.3 erwähnt, werden die CBS-Domänen einiger CLC's mit dem *common gating* in Verbindung gebracht. Für ClC-0 wurde gezeigt, dass Chimären aus ClC-0 und dem C-Terminus von ClC-2 kein *common gating* mehr zeigen (Fong et al., 1998). Den gleichen Effekt hat auch die Mutation von H736 in der zweiten CBS-Domäne von ClC-0 (Estévez et al., 2004). Ebenso können Mutationen von Aminosäuren der R-Helix von ClC-0 das *common gating* beeinflussen (Ludewig et al., 1997). Weitere Arbeiten haben eine Beteiligung der CBS-Domänen auch am *gating* von ClC-1 und ClC-2 bestätigt (Hebeisen et al., 2004; Bennetts et al., 2005; Niemeyer et al., 2004). Eine Bewegung des C-Terminus im Zuge des *gatings* wurde auch direkt mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) für ClC-0 und ClC-1 gezeigt (Bykova et al., 2006; Ma et al., 2011).

Eine mögliche Erklärung, wie Konformationsänderungen der CBS-Domänen an die Porenregion weitergegeben werden könnten, verbirgt sich im engen Kontakt zwischen der zweiten CBS-Domäne und den Helices D und R mit dem für den Ionentransport wichtigen Serin- und Tyrosinrest. Auch der Loop, der die Helices H und I verbindet und auch Teil der Dimer-Interaktionsfläche ist, befindet sich in unmittelbarer Nähe zu den CBS-Domänen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die CBS-Domänen auch direkt die Dimer-Interaktionsfläche beeinflussen könnten.

CBS-Domänen können verschiedene Moleküle binden und es gibt Nachweise, dass dadurch das *common gating* beeinflusst werden kann. So wurde für ClC-2 und ClC-5 nachgewiesen, dass ihre CBS-Domänen in der Lage sind, Nukleotide zu binden (Scott et al., 2004; Meyer et al., 2006). Allerdings scheint dies nicht selektiv zu geschehen, da sowohl Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) als auch ATP gebunden wird. Bennetts et al. (2005) haben gezeigt, dass Nukleotide das *common gating* von ClC-1 modulieren können. Interessanterweise scheint auch NAD diese Fähigkeit zu besitzen (Bennetts et al., 2012).

1.3. ClC-7, ein lysosomaler $2Cl^-/1H^+$-Austauscher

ClC-7 gehört zusammen mit ClC-6 zum dritten Homologiezweig der CLC-Familie und wurde von Brandt und Jentsch (1995) erstmals kloniert. Da auch ClC-7 ein Protonen-Glutamat besitzt, nahm man früh an, dass es ein Cl^-/H^+-Austauscher ist. Dies konnte in Arbeiten mit Hilfe von Chloridflux-Messungen an isolierten Lysosomen (Weinert et al., 2010) und später auch direkt durch Messungen des Umkehrpotentials von ClC-7 in heterologer Expression bestätigt werden (Leisle et al., 2011).

ClC-7 ist ubiquitär exprimiert und kolokalisiert mit seiner β-Untereinheit Ostm1 in späten Endosomen, Lysosomen und in der dem Knochen aufliegenden Resorptionslakune der Osteoklasten (Kornak et al., 2001; Lange et al., 2006). Man nahm zunächst an, dass ClC-7 wichtig für die Ansäuerung von Lysosomen ist, indem es eine Gegenladung in Form vom Chloridionen bereitstellt, die dem Aufbau eines starken luminal positiven elektrochemischen Gradienten durch die H^+-ATPase entgegenwirkt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass auch ClC-7-freie Lysosomen einen normalen pH-Wert von ca. 4,8 zeigen (Kasper et al., 2005; Lange et al., 2006) und dass die Funktion von ClC-7 in Lysosomen eher in der Akkumulation von Chlorid besteht (Weinert et al., 2010). Im Gegensatz dazu ist ClC-7 jedoch durchaus von Bedeutung für die Ansäuerung der Resorptionslakune (Kornak et al., 2001).Da ClC-7 Knockout-Mäuse aber schon einen

gestörten Aufbau des Bürstensaums der Osteoklasten zeigen, könnte die verminderte Ansäuerung der Resorptionslakune auch darauf zurückzuführen sein.

1.3.1. Die ClC-7 Knockout-Maus

Ein Knockout (KO) von ClC-7 ruft einen Phänotyp hervor, der von schwerer Osteopetrose, lysosomaler Speicherkrankheit, Degeneration des Hippocampus und der Retina und einer verkürzten Lebensdauer gekennzeichnet ist (Kornak et al., 2001; Kasper et al., 2005). Röntgenaufnahmen der Tibia von ClC-7 KO-Mäusen (siehe Abbildung 1.8a) zeigen einen abnorm stark mineralisierten Knochen ohne Knochenmarkshöhle.

Die Ursache der Osteopetrose ist die fehlende Fähigkeit der ClC-7 KO-Osteoklasten zur Knochenresorption, eine Folge von Unterentwicklung und verminderter Ansäuerung der von den Osteoklasten zu diesem Zweck gebildeten Resorptionslakune (Kornak et al., 2001). Die abnorme Struktur und stark erhöhte Dichte der Knochen führt zu einer erhöhten Fragilität und macht ein Durchbrechen der Zähne unmöglich. Die Lebensspanne dieser Tiere beträgt meist nur 6-7 Wochen (Kornak et al., 2001). ClC-7 KO-Mäuse leiden außerdem an einer fortschreitenden Degeneration des optischen Nervs und der Photorezeptoren der Retina (siehe Abbildung 1.8b) und werden aus diesem Grund blind (Kornak et al., 2001). Die Tiere entwickeln außerdem eine Neuronale Ceroid-Lipofuszinose (Kasper et al., 2005), eine lysosomale Speicherkrankheit, die zu neuronaler Degeneration vor allem im Bereich der CA3-Region des Hippocampus führt (siehe Abbildung 1.8c). Die neuronale Degeneration sowie die Degeneration der Retina sind keine sekundären Effekte der Osteopetrose, sondern auf die durch das Fehlen von ClC-7 gestörte Funktion der Lysosomen zurückzuführen (Kasper et al., 2005; Wartosch et al., 2009).

1.3.2. Die β-Untereinheit Ostm1

Ostm1 ist ein ca. 38 kDa großes Typ-I-Transmembranprotein, welches aus einem langen, stark N-glykosilierten N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einem kurzen cytosolischen C-Terminus besteht (Lange et al., 2006). Chalhoub et al. (2003) identifizierten eine Mutation des Ostm1-Gens als Ursache für die schwere Osteopetrose der *grey lethal*-Maus, einer spontanen Mausmutante. Der der ClC-7 KO-Maus verdächtig ähnliche Phänotyp führte zur Identifikation von Ostm1 als β-Untereinheit von ClC-7 (Lange et al., 2006). Die physikalische Interaktion beider Proteine wurde durch Koimmunopräzipitation gezeigt, wobei die Anwesenheit von ClC-7 außerdem für die korrekte

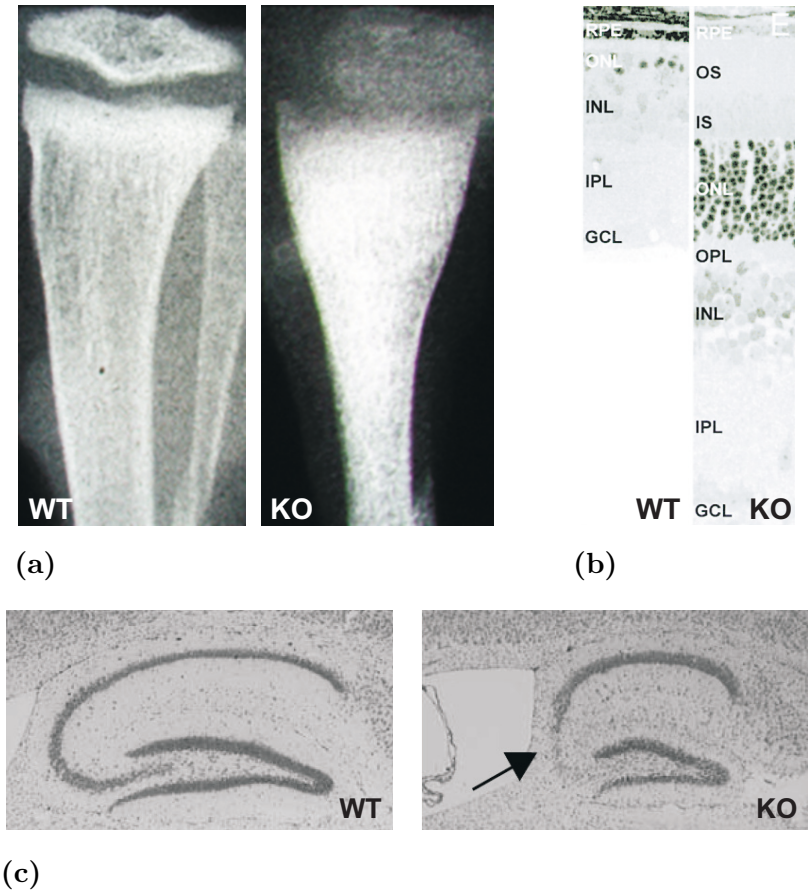


Abbildung 1.8: Der Phänotyp der ClC-7 Knockout-Maus. (a) Röntgenaufnahmen der Tibia von Wildtyp- (WT) und ClC-7 Knockout-Mäusen (KO). Die Knochen der KO-Maus zeigen eine starke Osteopetrose. Aus Kornak et al. (2001). (b) Ultradünnschnitte der Retina von 28 Tage alten WT und KO-Mäusen. Die KO-Maus zeigt eine progrediente Degeneration der Retina, wobei es vor allem zu einem Verlust der Zellkerne der äußeren Körnerschicht kommt. RPE: retinales Pigment-Epithelium; OS: äußere Segmente der Photorezeptoren; IS: innere Segmente der Photorezeptoren; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Adaptiert von Kornak et al. (2001). (c) Nissl-Färbungen von Gewebedünnschnitten des Hippocampus von 30 Tage alten WT und KO-Mäusen. KO-Mäuse zeigen eine progrediente Degeneration der CA3-Region (Pfeil) des Hippocampus. Aus Kasper et al. (2005).

lysosomale Lokalisation von Ostm1 nötig ist (Lange et al., 2006). Im Lysosom wird der N-Terminus von Ostm1 proteolytisch gespalten, beide Teile bleiben jedoch über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Lange et al., 2006). Man nahm an, dass Ostm1 vor allem wichtig für die Stabilität von ClC-7 ist, da in der *grey lethal*-Maus das Proteinlevel von ClC-7 auf unter 10% im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist (Lange et al., 2006). Möglicherweise schützt der glykosilierte N-Terminus von Ostm1 ClC-7, welches selbst nicht glykosiliert ist, vor dem Verdau durch saure Proteasen. Es hat sich gezeigt, dass Ostm1 ebenso für die Transportaktivität von ClC-7 von Bedeutung ist (Leisle et al., 2011). Auch im Menschen sind Fälle von Osteopetrose dokumentiert, welche auf

Mutationen des *OSTM1*-Gens zurückgehen. Diese führen immer zu einem frühen Stop-Codon (Chalhoub et al., 2003; Quarello et al., 2004; Ramírez et al., 2004; Pangrazio et al., 2006; Souraty et al., 2007; Maranda et al., 2007).

1.3.3. *CLCN7/OSTM1*-Mutationen als Ursache humaner Osteopetrose

Humane Osteopetrose kann durch Mutationen einer Reihe verschiedener Gene ausgelöst werden. Diese betreffen entweder Proteine, die wichtig für die Knochen-abbauende Funktion der Osteoklasten sind (z.B. *TCIRG1* (Kornak et al., 2000; Frattini et al., 2000), *CLCN7* (Kornak et al., 2001), *OSTM1* (Chalhoub et al., 2003)) oder Proteine, die von Bedeutung für die Differenzierung und Maturation dieser Zellen sind (z.B. *TNFSF11* (Sobacchi et al., 2007) und *TNFRSF11A* (Guerrini et al., 2008)). Mutationen von *TCIRG1*, dem Gen welches für die a3-Untereinheit der H^+-ATPase kodiert, führen höchstwahrscheinlich zu einer schlechteren oder ausbleibenden Ansäuerung der Resorptionslakune der Osteoklasten.

Die Symptome der von ClC-7 und Ostm1-Mutationen verursachten humanen Osteopetrose sind dem Phänotyp der zuvor beschriebenen ClC-7 KO-Maus sehr ähnlich. Die Patienten weisen eine erhöhte Knochendichte auf, Frakturen treten je nach Schwere der Erkrankung gehäuft auf. Die Knochenmarkshöhle ist in schweren Fällen nicht ausgebildet, es kommt zur extramedullären Blutbildung und in Folge dessen zu Hepatosplenomegalie. Es wurden außerdem in einigen Fällen auch neurologische Probleme (Frattini et al., 2003; Pangrazio et al., 2006; Maranda et al., 2007) und Sehbeeinträchtigungen beschrieben (Steward, 2003; Ramírez et al., 2004).

Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen der autosomal dominanten Osteopetrose TypII (ADO, Albers-Schönberg-Krankheit) und der selteneren autosomal rezessiven (infantil malignen) Osteopetrose (ARO). Während bei der ADO der Krankheitsverlauf milder ist und sich Symptome meist erst im Erwachsenenalter zeigen, entwickeln ARO-Patienten schwere Symptome in den ersten Lebensjahren, ihre Lebensspanne beträgt ohne Behandlung meist nur wenige Monate. Es wurden außerdem einige wenige Fälle einer intermediären autosomalen Osteopetrose (IAO) berichtet, deren Erbgang entweder dominant oder rezessiv sein kann (Campos-Xavier et al., 2003; Frattini et al., 2003; Pangrazio et al., 2010). ARO wird in den meisten Fällen durch *TCIRG1*-Mutationen ausgelöst (Frattini et al., 2000; Kornak et al., 2000; Sobacchi et al., 2001), in einigen Fällen sind aber auch *CLCN7*-Mutationen die Ursache (Frattini et al., 2003). Im Gegensatz dazu haben ADO-Patienten in ca. 70-80% der Fälle *CLCN7*-Mutationen (Frattini et al., 2003; Del Fattore et al., 2006).

Es sind etwa 50 Osteopetrose-auslösende *CLCN7*-Mutationen im Menschen publiziert (Kornak et al., 2001; Cleiren et al., 2001; Campos-Xavier et al., 2003; Frattini et al., 2003; Waguespack et al., 2003; Letizia et al., 2003; Lam et al., 2007; Waguespack et al., 2007; Besbas et al., 2009; Zhang et al., 2009; Pangrazio et al., 2010; Phadke et al., 2010; Wang et al., 2012). Die meisten dieser Mutationen sind *missense*-Mutationen, die zum Austausch einer Aminosäure führen. Es finden sich jedoch auch einige *nonsense*-Mutationen und Deletionen sowie *frameshift*-Mutationen, die oft auch ein frühes Stop-Kodon bedingen. Interessanterweise finden sich auch einige *CLCN7*-Mutationen, die mit einer Varianz der Knochendichte (*Bone Mineral Density* (BMD)-Polymorphismus) in Verbindung gebracht werden (Kornak et al., 2005; Pettersson et al., 2005; Duncan et al., 2011).

Alle bekannten *OSTM1*-Mutationen im Menschen resultieren in einem frühen Stop-Kodon und somit nur zur Synthese eines kurzen Ostm1-Fragmentes und verursachen immer ARO (Chalhoub et al., 2003; Quarello et al., 2004; Ramírez et al., 2004; Pangrazio et al., 2006; Souraty et al., 2007; Maranda et al., 2007). Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist die Instabilität/Inaktivität von ClC-7 in Abwesenheit von Ostm1 (Lange et al., 2006; Leisle et al., 2011), sodass die Osteopetrose der Patienten mit *OSTM1*-Mutationen durch das Fehlen von funktionellem ClC-7 ausgelöst wird.

1.3.4. Biophysikalische Charakterisierung von ClC-7

Die streng lysosomale/spät endosomale Lokalisation von ClC-7 auch bei Überexpression (Lange et al., 2006; Suzuki et al., 2006) verhinderte lange eine elektrophysiologische Charakterisierung. Stauber und Jentsch (2010) analysierten die N- und C-terminalen Motive der intrazellulären CLC's, die die Bindung von Adapterproteinen vermitteln und aus diesem Grund wichtig für den Transport zu Endosomen und Lysosomen sind. ClC-7 besitzt sowohl N- als auch C-terminale Motive (oft Dileucinmotive) für die Bindung einer Reihe von AP-Proteinen (u.a. AP-2 und AP-3), außerdem ist der N-Terminus in der Lage GGA-Proteine zu binden (Stauber und Jentsch, 2010). Die Neutralisation zweier N-terminaler Dileucinmotive in ClC-7 (ClC-$7^{LL23/24AA,LL36/37AA}$ für das ClC-7 der Ratte (rClC-7) bzw. ClC-$7^{LL23/24AA,LL68/69AA}$ für das humane ClC-7 (hClC-7)) ist ausreichend, um die Interaktion mit AP- und GGA-Proteinen zu unterbinden und eine partielle Plasmamembranlokalisation von ClC-7 zu bewirken (Stauber und Jentsch, 2010). Unter Ausnutzung dieser Sortingmutante, die im Weiteren als ClC-7^{PM} bezeichnet wird, konnte die erste biophysikalische Charakterisierung von ClC-7 in heterologer Expression erfolgen (Leisle et al., 2011).

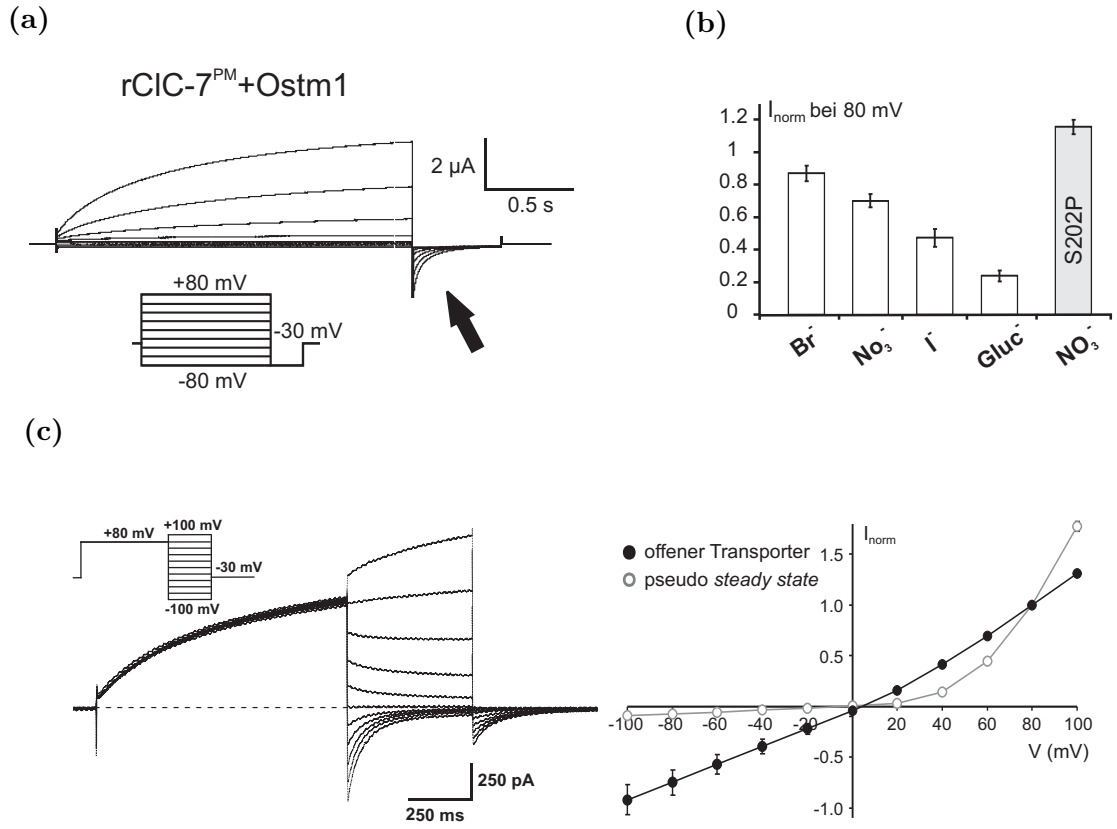


Abbildung 1.9: Biophysikalische Charakterisierung von ClC-7. (a) Typische Ströme von in *X. laevis*-Oozyten überexprimiertem rClC-7^{PM}. Der Pfeil zeigt auf die *tail currents*. (b) Auf Chlorid bei 80 mV normierte Leitfähigkeiten von rClC-7^{PM} für unterschiedliche Ionen. Br^-: Bromid; NO_3^-: Nitrat; I^-: Iodid; $Gluc^-$: Gluconat. Die Nitratleitfähigkeit der S202P-Mutante (grauer Balken) ist höher als die des Wildtyps. (c) *Tail current*-Analyse von ClC-7. Links: Messprotokoll und Ströme zur Untersuchung der Strom-Spannungsbeziehung des offenen Transporters, rechts: lineare Strom-Spannungsbeziehung des offenen Transporters (schwarze Symbole) im Vergleich zur stark rektifizierenden Strom-Spannungsbeziehung des pseudo *steady states* (weiße Symbole). Aus Leisle et al. (2011)

In HeLa-Zellen oder *X. laevis*-Oozyten überexprimiertes ClC-7^{PM} zeigt langsam aktivierte, auswärts rektifizierende Ströme bei Depolarisation der Plasmamembran (siehe Abbildung 1.9a). Beim Sprung zu negativen Spannungen nach dem Öffnen von ClC-7 sind negative Ströme messbar (siehe Pfeil in Abbildung 1.9a), welche die Schließkinetik des Transporters reflektieren. Diese Ströme werden im Folgenden als *tail currents* bezeichnet und sind einzigartig unter den intrazellulären CLC's. ClC-7 kann auch ohne die Koexpression von Ostm1 an der Plasmamembran von *X. laevis*-Oozyten nachgewiesen werden, in diesem Fall sind aber niemals Ströme messbar. Ostm1 ist demnach nicht nur wichtig für die Stabilität von ClC-7, sondern auch für dessen Transportaktivität. Es konnte eine Ionenselektivität von $Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$ ermittelt werden (siehe Abbildung 1.9b), wobei durch die Mutation des zentralen Serins zu Prolin (S202P) die

Nitratleitfähigkeit deutlich größer als die des Wildtyp-Proteins wird.

Durch Analyse der Strom-Spannungsbeziehung der *tail currents* konnte nachgewiesen werden, dass der Ionentransport durch den geöffneten Transporter linear von der Spannung abhängig ist (Kurve mit schwarzen Symbolen in Abbildung 1.9c, rechts). Im Gegensatz dazu zeigt ClC-7 in seinem pseudo *steady state* nach 2s Aktivierung ein stark auswärts rektifizierendes Verhalten. Dies zeigt, dass prinzipiell Ionen in beide Richtungen durch die einmal geöffnete Pore fließen können und die Ursache der Rektifizierung im *gating* von ClC-7 zu finden ist. Es wurde durch die Messung von Umkehrpotentialen der *tail currents* in Anwesenheit verschiedener Chloridkonzentrationen und pH-Werte bestätigt, dass ClC-7 ein Cl^-/H^+-Austauscher mit einer Stöchiometrie von 2:1 ist. Die Mutation des *gating*-Glutamates zu Alanin entkoppelt wie erwartet den Chlorid- vom Protonentransport und macht aus ClC-7 einen konstitutiv geöffneten Chloridkanal. Die Neutralisation des Protonen-Glutamates führt ebenfalls wie erwartet zu einem nicht-funktionellen Protein. Es konnte keine Abhängigkeit der ClC-7-Ströme von intrazellulärem ATP festgestellt werden.

Anzumerken ist, dass auch Costa et al. (2012) eine biophysikalische Charakterisierung von ClC-7 beschrieben haben, allerdings in Vakuolen von *Arabidosis thaliana*. Im Gegensatz zu Leisle et al. (2011) berichten die Autoren dieser Studie von einer Aktivierung von ClC-7 ohne die Anwesenheit von Ostm1. Außerdem zeigen die gemessenen Ströme keine starke Rektifizierung und keine Kinetik sondern eine instantane Aktivierung. *Tail currents* waren ebenfalls nicht messbar.

1.4. Zielstellung dieser Arbeit

Mit Hilfe der ClC-7-Sortingmutante, welche eine partielle Membranlokalisation hervorruft, besteht erstmals die Möglichkeit, die ca. 50 bekannten humanen Osteopetrose-Mutationen in heterologer Expression zu untersuchen. Da die Mehrzahl dieser Mutationen *missense*-Mutationen sind, ist über ihre Auswirkung auf die Funktion von ClC-7 bisher nichts bekannt. Eine ähnliche Charakterisierung wurde bereits mit humanen Mutationen von ClC-1 und ClC-5 durchgeführt. Während ca. 50% der ClC-5 Mutationen *nonsense*-Mutationen sind (Lloyd et al., 1996, 1997; Morimoto et al., 1998) und die verbleibenden Mutationen oftmals zu einer Reduktion oder der Abwesenheit von messbaren Strömen führen, hat die Untersuchung der Myotonia Congenita-auslösenden ClC-1-Mutationen ergeben, dass dominante Mutationen die Spannungsabhängigkeit von ClC-1 durch eine Beeinflussung des *common gates* in Richtung positiver

Spannungen verschieben (Saviane et al., 1999). Sowohl humane ClC-1 als auch ClC-5-Mutationen finden sich oft an der Dimer-Interaktionsfläche (Duffield, 2003; Wu et al., 2003).

Im ersten Teil dieser Arbeit werden Ergebnisse der Untersuchung humaner ClC-7-Mutationen mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two-Electrode Voltage Clamp, TEVC) Messungen vorgestellt, wobei die Charakterisierung der Auswirkungen der Mutationen auf die Ströme von ClC-7 im Vordergrund steht. Resultiert, wie bei ClC-5, die Mehrzahl der ClC-7-Mutationen in einem kompletten Funktionsverlust, gibt es, wie bei ClC-1, Mutationen die die Spannungsabhängigkeit verändern oder sind die Auswirkungen der Osteopetrose-Mutationen völlig andere? Eine weitere interessante Fragestellung war die Lokalisation der von Mutationen betroffenen Aminosäuren im Protein. Diese kann mit Hilfe der kürzlich veröffentlichten CmClC-Kristallstruktur visualisiert werden um festzustellen, ob es Stellen im Protein gibt, an denen diese gehäuft auftreten. Gibt es eine Korrelation zwischen Lokalisation der mutierten Aminosäuren und Auswirkung der Mutation?

Im zweiten Teil der Arbeit wurden, ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen aus der Untersuchung der humanen Mutationen, Struktur-Funktions-Studien an ClC-7 durchgeführt. ClC-7 ist im Gegensatz zu anderen intrazellulären CLC's zu diesem Zweck besonders geeignet, da sein *gating* sehr langsam ist. Dies macht sowohl das Messen von *tail currents* als auch die Untersuchung der *gating*-Kinetik möglich. Ein Schwerpunkt war dabei die Untersuchung des *gatings* von ClC-7, wobei vor allem die Überprüfung der Existenz eines *common gating*-Mechanismus von großem Interesse war. Eine weiterer, noch ungeklärter Sachverhalt ist die molekulare Identität des inneren *gates* der CLC-Transporter. Vermutet wird, dass das Chlorid-koordinierende Tyrosin das innere *gate* darstellt, jedoch stützt sich diese Annahme nur auf Versuche an EcClC-1. In dieser Arbeit wurden daher Versuche an ClC-7 durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen.

2. Ergebnisse

2.1. Elektrophysiologische Charakterisierung humaner ClC-7-Mutationen

Wie in Abschnitt 1.3.3 erläutert, ist eine Vielzahl von *CLCN7*-Mutationen als Auslöser humaner Osteopetrose bekannt. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Funktion von ClC-7 wurden bis jetzt nicht untersucht, so dass eine elektrophysiologische Charakterisierung dieser Mutationen von großem Interesse ist. Hierfür wurde eine repräsentative Auswahl an publizierten Mutationen im Hinblick auf die Position der betroffenen Aminosäuren, sowie den Erbgang getroffen. Die Mehrheit der untersuchten Mutationen sind Punktmutationen, darunter befinden sich zumeist *missense*-Mutationen, welche im Austausch einer einzelnen Aminosäure resultieren. Es wurden jedoch auch zwei *nonsense*-Mutationen (W179X und R712X), welche zum Einbau eines frühen Stopcodons und somit zum Abbruch der Translation führen, untersucht. Weiterhin befinden sich unter den charakterisierten Mutationen eine Deletion einer Aminosäure (ΔL688) und zwei Leseraster (*frameshift*)-Mutationen (G796fs und E798fs), welche zu einem Austausch der letzten zehn gegen 129 neue Aminosäuren bzw. zu einem Austausch der letzten acht gegen 128 neue Aminosäuren führen. Alle Mutationen wurden im Hintergrund der Sortingmutante hClC-7^{PM} (hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA) (Stauber und Jentsch, 2010) untersucht, die im folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnet wird. Jeder Messtag beinhaltete als Kontrolle die Messung von Strömen von mit Wildtyp-RNA injizierten Oozyten. Des Weiteren wurde in allen Experimenten immer Ostm1 koexprimiert, da ohne die Anwesenheit dieser β-Untereinheit von ClC-7 keine Ströme messbar sind (Leisle et al., 2011).

2.1.1. Beobachtete Auswirkungen der Mutationen

Alle in dieser Arbeit mittels TEVC untersuchten humanen Mutationen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Zusätzlich wurde auch die bei der Rinderrasse „Weißblaue Belgier“ auftretende Mutation Y750Q (entspricht Y746Q im humanen ClC-7) einbezogen, sowie eine Mutation (V418M), die mit einer Varianz der Knochenmineraldichte (BMD, *Bone Mineral Density*) in Verbindung gebracht wird. Jede Mutation wurde in mindestens drei unabhängigen Oozyten-Präparationen untersucht, wobei jeweils mindestens drei Oozyten vermessen wurden.

Mutation	Lokalisation	Effekt	Erbgang	Referenz
D145G	Helix B	schnelleres gating	rez.	Campos-Xavier et al. (2003)
W179X	Helix C	kein Strom	dom.	Frattini et al. (2003)
G203D	Loop Helix C-D	wie Wildtyp	rez.	Campos-Xavier et al. (2003)
L213F	Loop Helix D-E	schnelleres gating	dom.	Waguespack et al. (2003)
N214S	Loop Helix D-E	schnelleres gating	rez.	Pangrazio et al. (2010)
G215R	Loop Helix D-E	kein Strom	dom.	Cleiren et al. (2001)
G240R	Helix E	kein Strom	rez.	Frattini et al. (2003)
I261F	Helix F	kleinerer Strom	rez.	Lam et al. (2007)
R286Q	Helix G	schnelleres gating	dom.	Frattini et al. (2003)
S290F	Helix G	schnelleres gating	n. b.	Wang et al. (2012)
V297M	Helix G	kein Strom	rez.	Phadke et al. (2010)
F318L	Loop Helix H-I	kein Strom	dom.	Pangrazio et al. (2010)
R403Q	Loop Helix J-K	kein Strom	rez.	Pangrazio et al. (2010)
V418M	Helix K	wie Wildtyp	BMD	Pettersson et al. (2005)
L490F	Helix M	kein Strom	dom.	Frattini et al. (2003)
G521R	Helix N	kein Strom	rez.	Pangrazio et al. (2010)
G526W	Helix N	kein Strom	rez.	Frattini et al. (2003)
R561Q	Loop Helix O-P	schnelleres gating	rez.	Besbas et al. (2009)
P619L	Loop Helix R-CBS1	schnelleres gating	rez.	Phadke et al. (2010)
L651P	CBS1	kein Strom	rez.	Pangrazio et al. (2010)
G677V	CBS1	kein Strom	dom.	Frattini et al. (2003)
ΔL688	Loop CBS1-CBS2	schnelleres gating	dom.	Cleiren et al. (2001)
R712X	Loop CBS1-CBS2	kein Strom	rez.	Pangrazio et al. (2010)
S744F	Loop CBS1-CBS2	wie Wildtyp	rez.	Frattini et al. (2003)
Y746Q*	CBS2	schnelleres gating	rez.	Sartelet et al. (2013)
F758L	CBS2	schnelleres gating	dom.	Pangrazio et al. (2010)
R762L	CBS2	schnelleres gating	dom.	Waguespack et al. (2003)
R762Q	CBS2	schnelleres gating	rez.	Kornak et al. (2001)
L766P	CBS2	schnelleres gating	rez.	Cleiren et al. (2001)
R767P	CBS2	kein Strom	rez.	Pangrazio et al. (2010)

Mutation	Lokalisation	Effekt	Erbgang	Referenz
R767Q	CBS2	schnelleres gating	rez.	Frattini et al. (2003)
R767W	CBS2	kein Strom	dom.	Cleiren et al. (2001)
A788D	C-Terminus	wie Wildtyp	dom.	Letizia et al. (2003)
G796fs	C-Terminus	schnelleres gating	dom.	Cleiren et al. (2001)
E798fs	C-Terminus	schnelleres gating	dom.	Zhang et al. (2009)

Tabelle 2.1: Mittels TEVC untersuchte humane Mutationen. Aufgelistet sind jeweils die Lokalisation der Mutation im Protein, ihre Auswirkung auf die gemessenen Ströme, der Erbgang (rez.: rezessiv; dom.: dominant; n. b.: nicht bekannt; BMD: Knochendichtepolymorphismus) und die Referenz, in der die entsprechende Mutation das erste Mal beschrieben wurde. X steht für die Einführung eines Stopcodons, fs für eine *frameshift*-Mutation und Δ für die Deletion einer Aminosäure. Die mit * markierte Mutation Y746Q wurde bis jetzt nur in der Rinderrasse „Weißblaue Belgier“ (*Bos taurus*) nachgewiesen. Im *Bos taurus*-ClC-7 entspricht diese Mutation Y750Q, die Untersuchung ihres Effektes erfolgte aber im humanen ClC-7 als Y746Q. Alle Mutationen wurden in mindestens drei unabhängigen Oozyten-Präparationen untersucht.

Auffällig ist die große Anzahl von publizierten Mutationen in den CBS-Domänen, wobei vor allem die zweite CBS-Domäne sowie der Linker zwischen beiden CBS-Domänen betroffen ist. Des Weiteren findet sich eine hohe Anzahl an Mutationen im Bereich der Helices D bis G, wobei vor allem der Bereich des Loops zwischen den Helices D und E eine hohe Dichte aufweist. Dieser Sachverhalt wird auch in der Tabelle der untersuchten Mutationen widergespiegelt. Im Wesentlichen wurden drei verschiedene Auswirkungen der Mutationen auf die gemessenen Ströme beobachtet. Es gibt Mutationen, die zu einem kompletten Verlust der Ströme führen (z. B. F318L), Mutationen. welche das *gating* beschleunigen (z. B. R762Q), und Mutationen ohne offensichtlichen Effekt (z. B. S744F). In Abbildung 2.1 ist für jede Gruppe ein repräsentatives Beispiel dargestellt. Es scheint keinen Zusammenhang zwischen Erbgang und Auswirkung der Mutation zu geben, da es sowohl rezessive als auch dominante Mutationen gibt, die das *gating* von ClC-7 beschleunigen bzw. die zu einem Funktionsverlust von ClC-7 (keine Ströme messbar) führen.

Um zu überprüfen, ob Mutationen, bei denen kein Strom gemessen werden konnte, den Transport des Proteins zum Lysosom beeinflusst, wurde die lysosomale Lokalisation einiger dieser Mutanten untersucht. Dazu wurde jeweils die betreffende Mutante (ohne Sortingmutation) mit Ostm1-GFP koexprimiert und die Kolokalisation mit LAMP-2 (*Lysosome-associated membrane protein 2*) bestimmt. Diese Experimente zeigen, dass der Transport von ClC-7 zum Lysosom nur in ca. 30% der Fälle durch die Osteopetrose-Mutation gestört wird (Leisle et al., 2011). Western-Blots von Oozyten, welche Mutan-

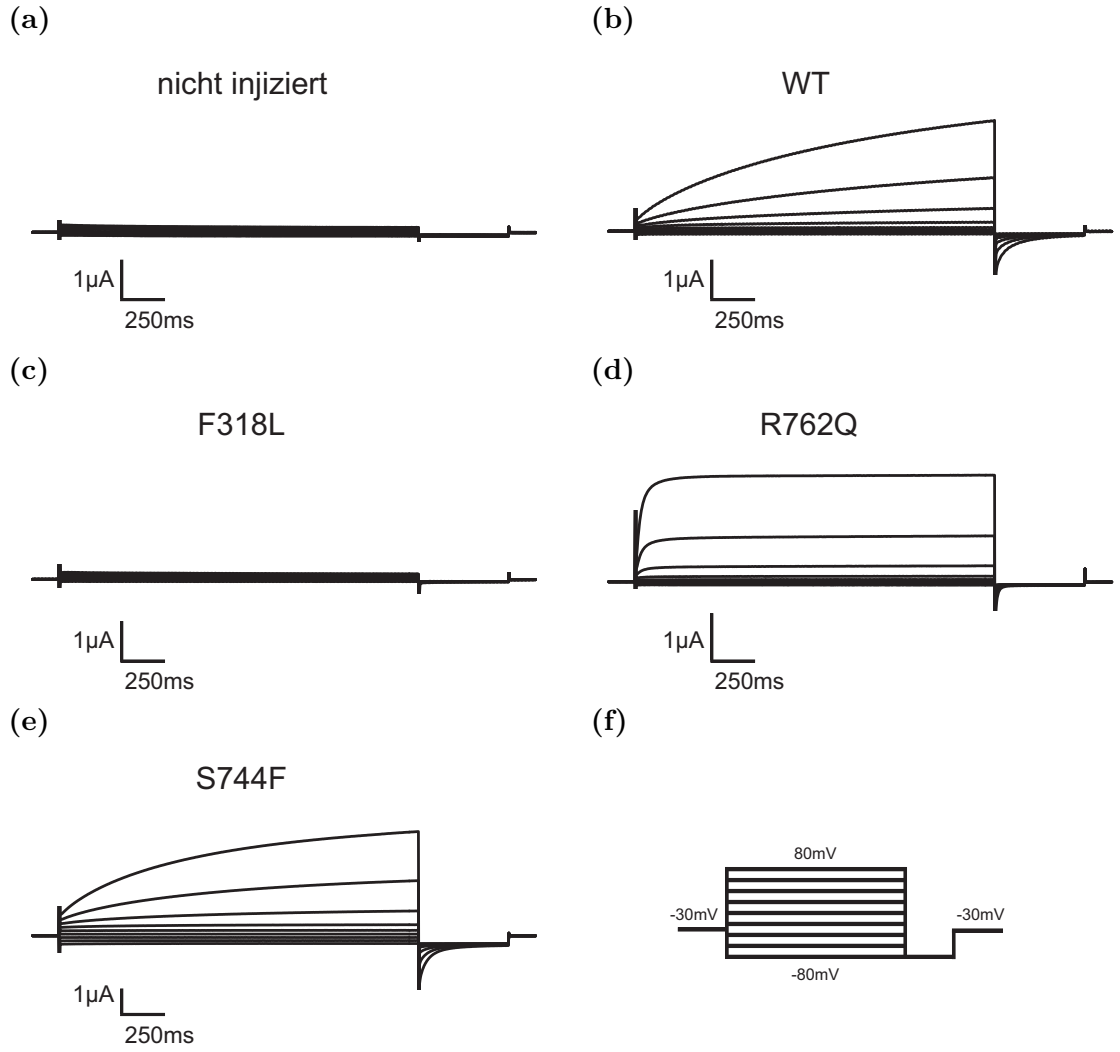


Abbildung 2.1: Auswirkungen humaner Mutationen auf ClC-7-Ströme. Gezeigt sind Ströme einiger ausgewählter humaner Mutationen im Vergleich zu (a) Strömen nicht injizierter Oozyten, und (b) Strömen des Wildtyps. Im Wesentlichen gibt es drei Gruppen humaner Mutationen: (c) Mutationen, die keine Ströme zeigen, (d) Mutationen, welche das *gating* beschleunigen und (e) Mutationen, die keinen offensichtlichen Unterschied zum Wildtyp zeigen. (f) Für alle gezeigten Messungen verwendetes Spannungsprotokoll, sofern nicht anders angegeben.

ten exprimierten, die das Trafficking nicht verändern, zeigten zum Teil eine verringerte Expression des mutierten Proteins im Vergleich zum Wildtyp (Leisle et al., 2011). Sowohl die Assays zur lysosomalen Lokalisation als auch die Western-Blots wurden von Tobias Stauber durchgeführt. Im Wesentlichen zeigen diese Versuche, dass Mutationen, welche zu einem Funktionsverlust von ClC-7 führen, nicht in allen Fällen die lysosomale Lokalisation von ClC-7 stören. Möglicherweise beeinträchtigen diese Mutationen zum Teil tatsächlich die Funktion des Proteins.

Mutationen, die das *gating* von ClC-7 beschleunigen, tun dies in einem verschieden star-

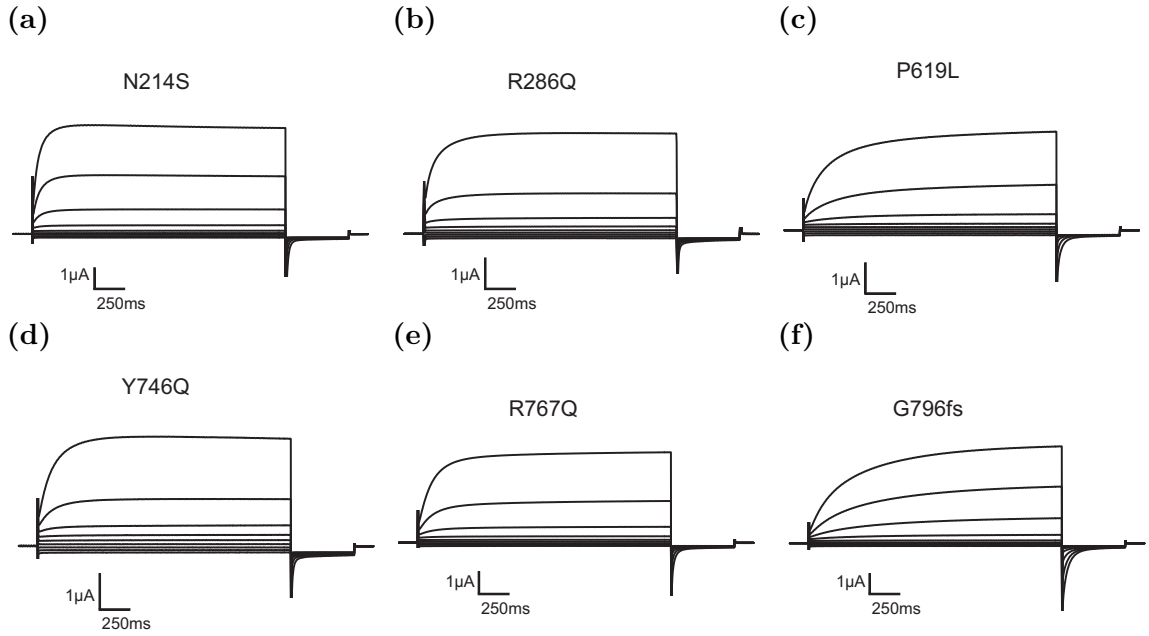


Abbildung 2.2: Eine Vielzahl humaner Mutationen beschleunigt das *gating* von ClC-7. Gezeigt sind Stromkurven einiger ausgewählter Mutationen, die das *gating* beschleunigen. Deutlich zu erkennen ist der unterschiedliche Grad der Beschleunigung durch die jeweilige Mutation.

ken Ausmaß. Es gibt Mutationen (z. B. G796fs), welche zu einer moderaten Beschleunigung führen, sowie Mutationen die das *gating* stark beschleunigen (z. B. R767Q). Eine Auswahl einiger Ströme dieser Mutationen ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Die durch einen monoexponentiellen Fit der Ströme bei 80 mV ermittelten Zeitkonstanten der Aktivierung aller untersuchten „schnellen Mutationen“ im Vergleich zum Wildtyp sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst und verdeutlichen diesen Sachverhalt. Keine der untersuchten Mutationen scheint das *gating* zu verlangsamen. Da das *gating* von ClC-7 schon vergleichsweise langsam ist, könnte eventuell eine weitere Verzögerung auch dazu führen, dass keine Ströme in den ersten 2 s messbar wären.

Mutation	τ_{Akt} in ms	n
WT	261 (± 26)	40
D145G	166 (± 26)	7
L213F	79 (± 19)	7
N214S	70 (± 12)	13
R286Q	81 (± 17)	39
S290F	51 (± 17)	11
R561Q	222 (± 21)	13
P619L	181 (± 31)	12
ΔL688	147 (± 12)	10

Mutation	τ_{Akt} in ms	n
Y746Q	102 (± 21)	16
F758L	56 (± 7)	13
R762L	58 (± 16)	23
R762Q	45 (± 14)	25
L766P	90 (± 12)	17
R767Q	83 (± 15)	18
G796fs	197 (± 35)	9
E798fs	175 (± 32)	9

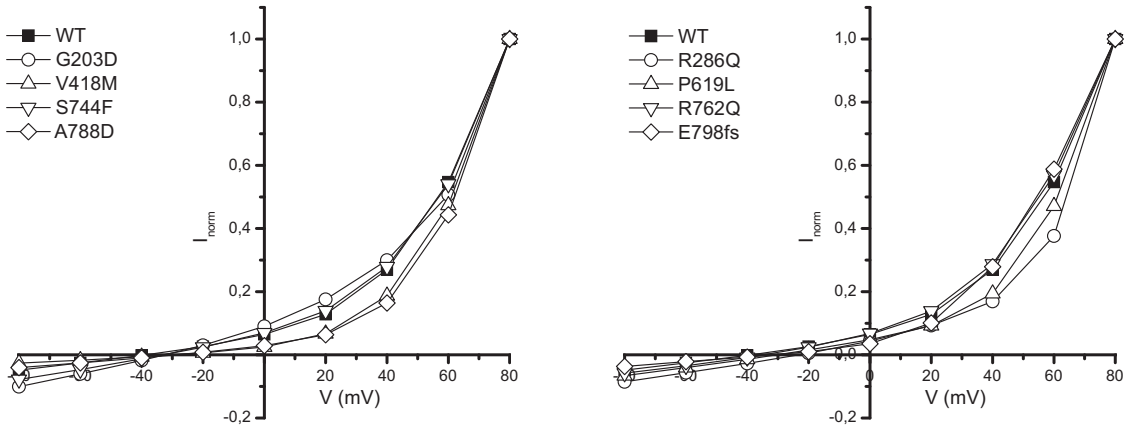
Tabelle 2.2: „Schnelle“ Mutationen beschleunigen das *gating* unterschiedlich stark. Zeitkonstanten der Aktivierung mit Standardabweichung für alle Mutationen, die das *gating* beschleunigen, im Vergleich zum Wildtyp. Die Werte wurden mit einem monoexponentiellen Fit der Stromantwort bei 80 mV ermittelt (siehe Abschnitt 4.2.5.2). Zum Vergleich sind die Werte für den Wildtyp ebenfalls in die Tabelle eingefügt. n ist die Anzahl der für die Bestimmung der Zeitkonstanten ausgewerteten Messungen.

Bei einigen Mutationen konnte keine offensichtliche Auswirkung auf die Ströme festgestellt werden. Eine statistische Auswertung ergab, dass die Mutationen G203D, V418M und S744F weder die Kinetik noch die Amplitude der Ströme signifikant verändern. Die Mutation A788D allerdings erhöht die Stromamplitude auf 5,3 µA signifikant im Vergleich zum Wildtyp, der mit 2,9 µA in den untersuchten Oozyten-Präparationen eine geringere Stromamplitude aufwies. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf eine höhere Plasmamembran-Expression der Mutante zurückzuführen ist.

2.1.2. Einfluss der humanen Mutationen auf die Spannungsabhängigkeit von ClC-7

ClC-7 ist ein stark auswärts rektifizierender Ionentransporter, der nur bei positiven Spannungen ab ca. 20 mV geöffnet ist (Leisle et al., 2011). Die physiologische Bedeutung der Rektifizierung von ClC-7 ist noch nicht untersucht, es gibt aber andere Vertreter der ClC-Familie, bei denen es Hinweise auf eine Bedeutung einer bestimmten Spannungsabhängigkeit gibt. Für ClC-1 wurde bereits gezeigt, dass einige Mutationen, welche Myotonia Congenita auslösen, eine veränderte Spannungsabhängigkeit haben. Wollnik et al. (1997) publizierten zum Beispiel, dass die Mutation G200R eine im Vergleich zum Wildtyp um ca. 65 mV in Richtung positiver Spannungen verschobene halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit hat. Speziell bei Mutationen, deren Ströme dem

Wildtyp änhlich sind, ist nicht klar warum auch diese Osteopetrose verursachen. Die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit von ClC-7 kann aufgrund der starken Rektifizierung nur mit speziellen Protokollen bestimmt werden, die - von einem *steady state* bei verschiedenen Spannungen ausgehend - die *tail currents* bei einer Spannung messen. Da ClC-7 aufgrund des langsamen *gatings* kein Gleichgewicht (*steady state*) erreicht, konnte die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit nur unter Ausnutzung der „schnellen“ Mutante R762Q bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Offenwahrscheinlichkeiten weiterer humaner Osteopetrose-Mutationen zu bestimmen. Alle getesteten Mutanten zeigten jedoch bei heterologer Expression in HeLa-Zellen im Vergleich zu Oozyten insgesamt viel kleinere Ströme, die eine Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit unmöglich machten. Aus diesem Grund konnte die Spannungsabhängigkeit aller ClC-7-Mutanten nur anhand ihrer Strom-Spannungs-Beziehung untersucht werden, das Ergebnis ist anhand einiger ausgewählter Mutationen in Abbildung 2.3 dargestellt.



(a) **(b)**

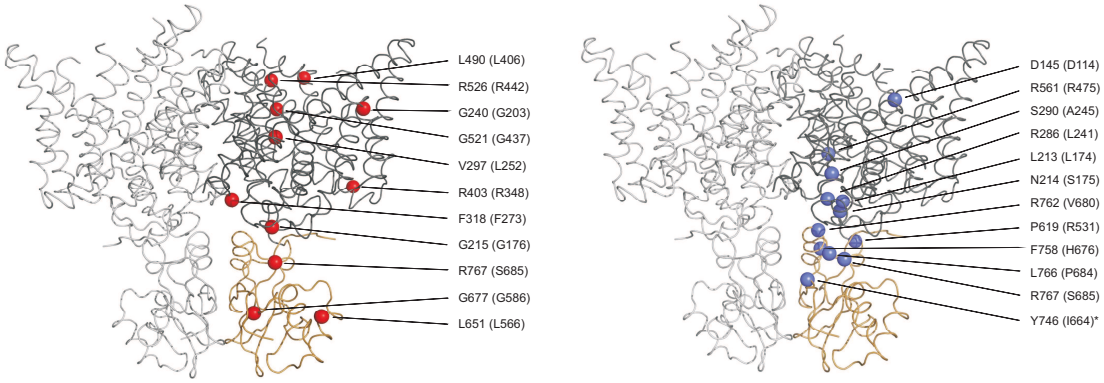
Abbildung 2.3: Humane Mutationen verändern die Spannungsabhängigkeit von ClC-7 nicht. Strom-Spannungs-Kurven von (a) allen Mutationen, deren Ströme dem WT ähnlich sind und (b) einiger ausgewählter „schneller“ Mutationen. Es wurden dafür eine Mutation aus der Transmembrandomäne (R286Q), eine Mutation im Linker zwischen Helix R und erster CBS-Domäne (P619L), eine Mutation der zweiten CBS-Domäne (R762Q), sowie eine C-terminale Mutation (E798fs) ausgewählt. Dargestellt sind die auf den Wildtyp bei 80 mV normierten Werte. Es wurden die Werte von mindestens sieben Oozyten aus mindestens zwei unabhängigen Präparationen gemittelt. Die Standardfehler sind kleiner als die Symbole und aus diesem Grund nicht gezeigt.

Deutlich zu erkennen ist, dass keine der gezeigten Strom-Spannungs-Kurven grob von der des Wildtyps abweicht. Es gibt einige Mutationen (z. B. neben A788D und R286Q auch F758L, R561Q und L766P), deren Strom-Spannungs-Kennlinie etwas steiler verläuft, was auf eine Änderung der Offenwahrscheinlichkeit bei einigen Spannungen hindeutet; allerdings ist der Unterschied zum Wildtyp sehr gering. Weder Mutationen, die

dem Wildtyp ähnliche Ströme zeigen, noch die *gating*-beschleunigenden Mutationen zeigen also eine grob veränderte Spannungsabhängigkeit.

2.1.3. Zusammenhang zwischen Lokalisation und Auswirkung der Mutationen

Die Lokalisation aller *missense*-Mutationen, bei denen keine Ströme messbar waren oder die das *gating* beschleunigen, wurde mittels des Sequenzvergleichs aus Abbildung A.2 in die Kristallstruktur von CmClC übertragen und jeweils das Cα-Atom der betroffenen Aminosäure markiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.4 dargestellt.



(a) **(b)**

Abbildung 2.4: Lokalisation der humanen Mutationen in der Kristallstruktur von CmClC. (a) Lokalisation der *missense*-Mutationen, die keine Ströme zeigen (rote Sphären) und (b) die das *gating* beschleunigen (blaue Sphären). Markiert ist jeweils das Cα-Atom der betroffenen Aminosäure. Die Lokalisation der Mutationen ist nur in einer Untereinheit gezeigt. Die Transmembrandomäne dieser Untereinheit ist in dunkelgrau, die CBS-Domänen sind in orange und die zweite Untereinheit ist in hellgrau dargestellt. In Klammern ist jeweils die entprechende Aminosäure des CmClC angegeben.

Mutationen, die zu einem Funktionsverlust führen, treten sowohl in der Transmembrandomäne (z. B. G240R und V297M) als auch in den CBS-Domänen (z. B. L651P und R767P) auf. (Anzumerken ist, dass wahrscheinlich einige dieser Mutationen die Lokalisation von ClC-7 und nicht dessen Ionentransport beeinflussen.) Im Gegensatz dazu liegt die Mehrzahl der *gating*-beschleunigenden Mutationen an der Interaktionsfläche zwischen Transmembrandomäne und zweiter CBS-Domäne (z. B. L213F und R286Q) sowie in der zweiten CBS-Domäne (z. B. F758L und R767Q) selbst. Alle Aminosäuren, die sich im Transmembranbereich befinden, sind in oder nahe den intrazellulären Loops zwischen den Helices zu finden. So liegen L213 und N214 im Loop, der die Helices D und E verbindet, R651 im Loop zwischen den Helices O und P und R286 und S290 befinden sich im N-Terminus von Helix G. Einzige Ausnahme bildet die Mutation

D145G, welche sich innnerhalb von Helix B befindet und somit im Transmembranbereich lokalisiert ist. Auffällig ist außerdem der Fakt, dass Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von ClC-7 führen, in fast allen Fällen zwischen CmClC und ClC-7 konservierte oder zumindest konservativ substituierte Aminosäuren (L252 → V297) betreffen. Die einzige Ausnahme ist in diesem Fall R767, hier befindet sich im CmClC ein Serin. Im Gegensatz dazu sind Aminosäuren, deren Mutation das *gating* beeinflusst, seltener konserviert. Anzumerken ist, dass Mutationen von R767 je nach Substitution sowohl zu einem Funktionsverlust (R767P, R767W) als auch zu beschleunigtem *gating* (R767Q) führen können.

2.1.4. Untersuchung der Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche von ClC-7

Mutationen, die das *gating* beeinflussen, betreffen oft die Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche. Außerdem findet, wie in Abschnitt 1.2.4 erläutert, im Zuge des *gatings* eine Bewegung der CBS-Domänen relativ zur Transmembrandomäne statt. Die Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche ist daher interessant für eine nähere Betrachtung des *gatings*. Die geringe Konservierung der *gating*-beeinflussenden Aminosäuren zwischen CmClC und ClC-7 macht die CmClC-Kristallstruktur unbrauchbar für die genauere Untersuchung dieser Region. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des I-TASSER-Servers - einer voll automatisierten Modeling-Plattform - ein Homologie-Modell für ClC-7 auf Grundlage der CmClC-Kristallstruktur erstellt (siehe Abschnitt 4.2.6). Da der extreme N-Terminus von I-TASSER nicht mit zufriedenstellender Genauigkeit modelliert werden konnte, beginnt das in Abbildung 2.5 gezeigte Homologiemodell bei Aminosäure F119.

Das Homologiemodell besitzt einen C-Score von -0.33 und einen TM-Score von ca. 0.67±0.13; es ist also von hinreichender Qualität und besitzt eine korrekte Topologie. (Eine genauere Beschreibung dieser Werte und ihrer Aussagekraft findet sich in Abschnitt 4.2.6). Die Nahansicht der Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche in Abbildung 2.5 rechts zeigt die Lage der Aminosäuren R286, R762 und R767, die sich in der Nähe des Loops zwischen den Helices D und E befinden. Die Reste L213 und N214 sind in ebendiesem Loop lokalisiert aber zur besseren Übersicht nicht gezeigt. Die Reste R286, R762 und R767 sind aus mehreren Gründen von Interesse: Alle drei R→Q-Mutationen (R286Q, R762Q und R767Q) neutralisieren eine positive Ladung, sie beschleunigen das *gating* drastisch (von τ_{Akt}=261 ms für den Wildtyp auf 45-83 ms für die Mutanten, genaue Werte siehe Tabelle 2.2) und sie könnten potentiell aufgrund ihrer Lage wichtige Eckpunkte für die Interaktion zwischen Transmembrandomäne und

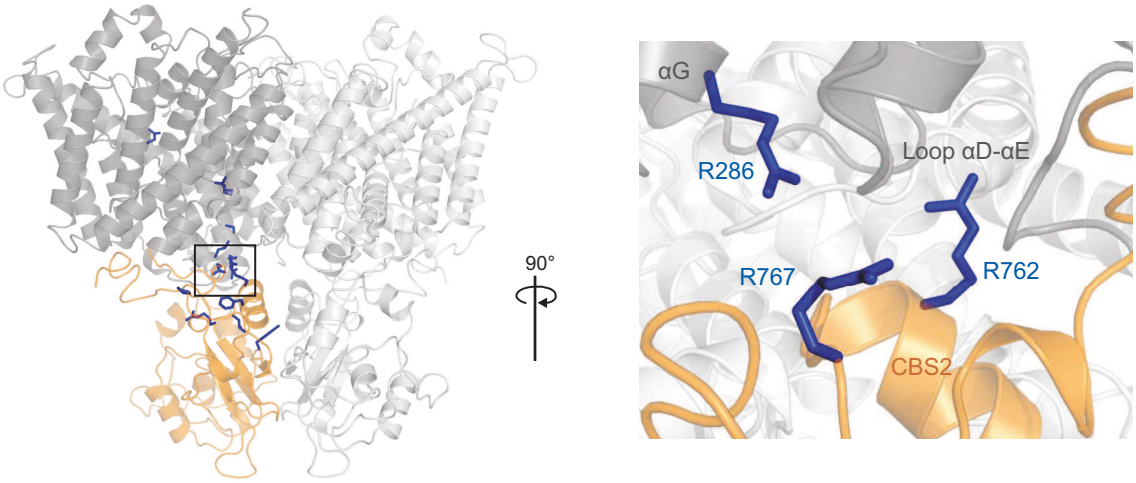


Abbildung 2.5: „Schnelle“ Mutationen im Homologie-Modell für ClC-7. Links: Das mit I-TASSER erstellte Homologie-Modell für ClC-7 (ab Aminosäure F119) mit den Aminosäuren , die bei Mutation das *gating* beschleunigen (blaue Stäbchen). Mutationen sind nur in einer Untereinheit gezeigt. Der Transmembranbereich dieser Untereinheit ist dunkelgrau, die CBS-Domänen sind orange und die andere Untereinheit ist hellgrau gefärbt. Das Rechteck zeigt den im rechten Teil der Abbildung vergrößert dargestellten Bereich. Rechts: Nahansicht der Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche um 90° in der Ebene der Membran gedreht. Zur besseren Übersicht sind nur die Aminosäuren R286, R762 und R767 gezeigt, es befinden sich aber auch L213 und N214 im Loop zwischen den Helices D und E.

CBS-Domänen bilden.

Aufgrund des stark basischen Charakters der Arginin-Seitenkette und der damit verbundenen positiven Ladung bestand die Vermutung, dass diese möglicherweise für die Interaktion von Transmembranbereich und CBS2 von Bedeutung ist. Aus diesem Grund wurden die drei Mutationen R286H, R762H und R767H eingefügt, die jeweils eins der drei zuvor genannten Arginine durch ein Histidin ersetzt. Die Seitenkette des Histidins besitzt in wässriger Lösung einen pK von 6,0 und liegt somit in Form eines Gleichgewichts bei niedrigerem pH-Wert positiv geladen, bei höheren pH-Werten aber eher neutral vor. Im Protein kann der pK-Wert durch die Interaktion und damit einhergehende Beeinflussung der Histidin-Seitenkette durch andere Reste abweichen, wobei sich eine Vorhersage im konkreten Fall schwierig gestaltet. Aus diesem Grund wurden hier unter der Vermutung, dass Protonen von der intrazellulären Seite her die Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche erreichen können, zunächst in *patch clamp*-Versuchen die internen pH-Werte 6,4, 7,4 und 8,4 getestet. Im Gegensatz zur Mutante R286H, die in *patch-clamp*-Versuchen keine messbaren Ströme zeigte, konnten von R762H als auch R767H die in Abbildung 2.6 gezeigten Ströme gemessen werden.

Die Mutante R762H zeigt bei allen getesteten internen pH-Werten Ströme, die etwas

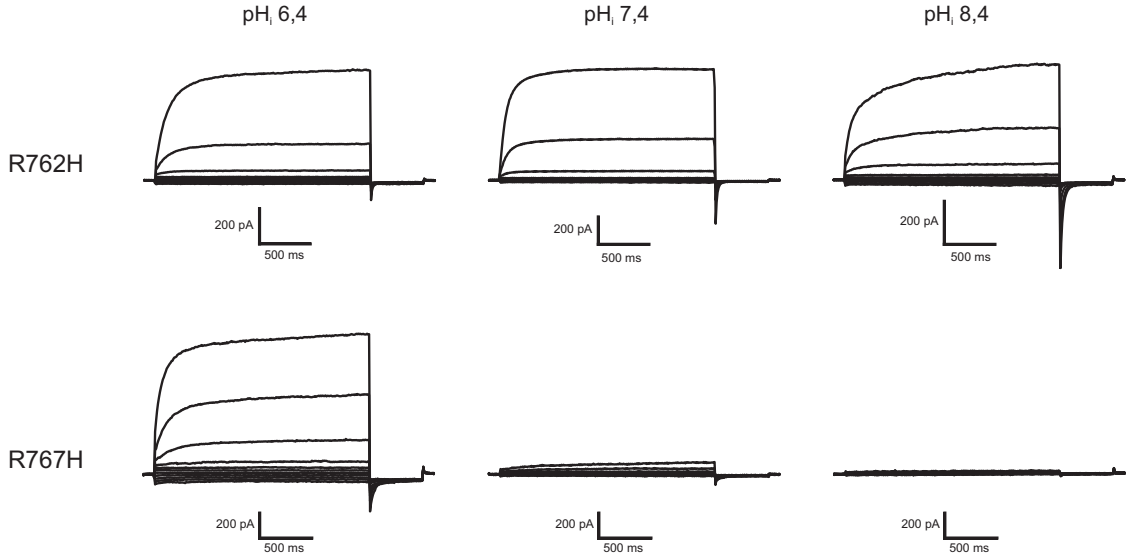


Abbildung 2.6: Ströme der Mutante R767H sind im Gegensatz zu R762H abhängig vom internen pH-Wert. Respäsentative *patch-clamp*-Messungen der beiden Mutanten R762H und R767H bei einem internen pH-Wert von 6,4, 7,4 bzw. 8,4. Es wurden je mindestens drei Zellen pro Mutante und pH-Wert gemessen, von denen alle das hier dargestellte Verhalten zeigten. Nicht transfizierte Zellen zeigten weder bei einem internen pH von 6,4, 7,4 noch 8,4 endogene Ströme.

schneller aktivieren als der Wildtyp. Die schnellere Aktivierung ist kein spezifischer Effekt der Ersetzung des Arginins durch ein Histidin, da auch die humanen Mutationen R762Q und R762L ein schnelles *gating* zeigen. Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die getesteten pH-Werte den pK-Wert des Histidins abdecken und somit wirklich kein Unterschied zwischen einem neutralen und positiv geladenen Histidin an dieser Stelle besteht. Die zuvor untersuchten humanen Mutationen R762Q und R762L zeigen aber, dass ClC-7 an dieser Position prinzipiell auch polare und sogar hydrophobe Aminosäuren toleriert, da diese nicht zu einem kompletten Funktionsverlust führen. Alle untersuchten R762-Mutanten weisen aber ein schnelleres *gating* auf; ein Arginin an dieser Stelle scheint daher wichtig für das langsame *gating* des Wildtyp-Proteins zu sein. Im Gegensatz dazu ist die Mutante R767H stark vom intrazellulären pH abhängig. Nur bei einem internen pH-Wert von 6,4 sind Ströme dieser Mutante messbar, was darauf hindeutet, dass der pK-Wert dieses Histidins zwischen pH 6,4 und pH 7,4 liegt und eine positive Ladung an dieser Position notwendig für die Funktion von ClC-7 sein könnte. Allerdings zeigt auch die Mutante R767Q schnelle Ströme; R767P und R767W führen aber zu einem kompletten Funktionsverlust (siehe Abschnitt 2.1). Scheinbar kann also auch eine ungeladene, aber polare Aminosäure das Arginin teilweise ersetzen. Interessanterweise kann das langsame *gating* des Wildtyps durch ein Lysin an dieser Stelle wiederhergstellt werden, die Histidin-Mutante dagegen zeigt ein schnelles *gating*.

Offenbar ist eine relativ lange, positiv geladene Aminosäure-Seitenkette an dieser Stelle essentiell für das langsame *gating* von ClC-7.

2.2. Untersuchung des gemeinsamen Schaltens von ClC-7

Wie in Abschnitt 1.2.3 ausführlich erläutert, wurde für ClC-0, ClC-1 und ClC-2 die Existenz eines *common gates* nachgewiesen. Für die intrazellulären CLC's ist bis jetzt nicht klar, ob diese ebenfalls zusätzlich zum schnellen *protopore gating* ein *common gating* besitzen. Die Untersuchung eines möglichen *common gating*-Prozesses wird erschwert durch die generell sehr niedrige Leitfähigkeit von Ionentransportern, welche detaillierte Einzelkanalmessungen unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde hier eine andere Strategie verfolgt, welche den *gating*-beschleunigenden Effekt einiger der zuvor beschriebenen Mutationen ausnutzt.

2.2.1. Strategie

Ausgangspunkt für die Untersuchungen zur Existenz des *common gatings* in ClC-7 war die Hypothese, dass Mutationen, die das *gating* beschleunigen, dies über die Beeinflussung des *common gates* tun. Eine Beeinflussung des *protopore gates* scheint unwahrscheinlich, da die zuvor genannten Aminosäuren R286, R762 und R767 nicht innerhalb oder nahe der Porenregion liegen. Ist diese Annahme wahr, so müsste eine Untereinheit, welche eine „schnelle“ Mutation trägt, über das *common gate* auch das *gating* der anderen Untereinheit des Dimers beschleunigen. Leiten jedoch beide Untereinheiten Ionen, so kann der Beitrag jeder individuellen Untereinheit zum Gesamtstrom nur schwer aufgelöst werden. Aus diesem Grund wurde die schon zuvor beschriebene Protonen-Glutamat-Mutation (E314A, siehe Abschnitt 1.2.2) benutzt, um jeweils eine Untereinheit transportdefizient (im Folgenden als „td“ bezeichnet) zu machen. Diese Mutation liegt unmittelbar im Protonentransportweg und eine Auswirkung auf das *common gate* ist daher unwahrscheinlich, eine entsprechende Kontrolle wurde jedoch einbezogen.

Das Schema in Abbildung 2.7 veranschaulicht die Kombinationen verschiedener Untereinheiten, welche in *X. Laevis*-Oozyten exprimiert wurden, um die gegenseitige Beeinflussung beider Untereinheiten durch das *common gate* nachzuweisen. Wird nur Wildtyp-RNA in die Oozyte injiziert, so erhält man Wildtyp-Homomere (WT/WT), injiziert man sowohl Wildtyp-RNA als auch RNA, welche die Protonen-Glutamat-Mutation enthält, so erhält man neben Wildtyp-Protonen-Glutamat-Heteromeren (WT/td)

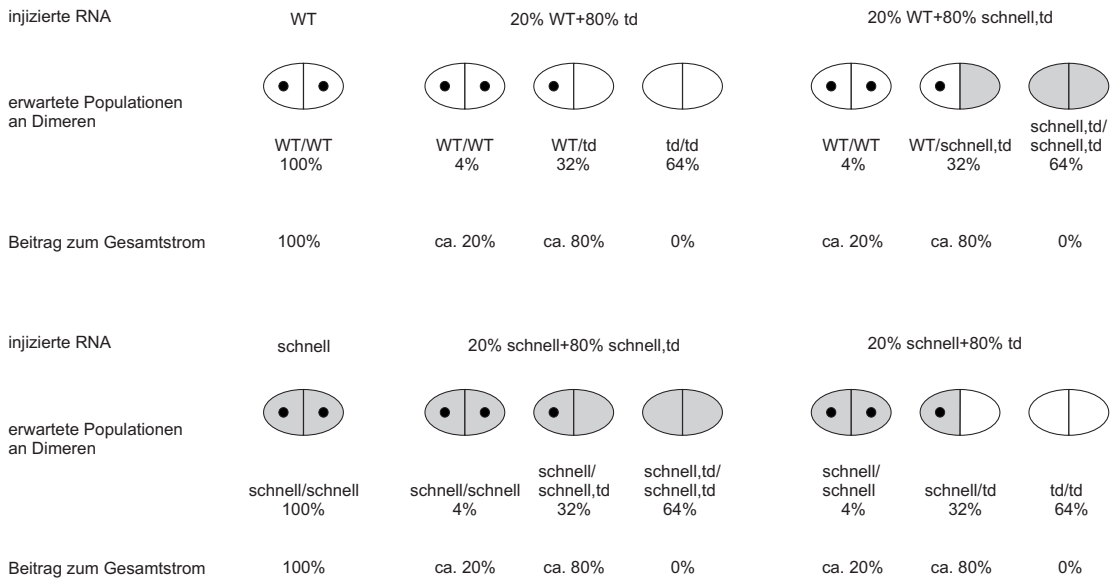


Abbildung 2.7: Strategie für die Untersuchung des *common gatings* in ClC-7. Jede Untereinheit wird durch eine Halbellipse repräsentiert. Weiße Halbellipsen stehen für Wildtypuntereinheiten, graue Halbellipsen für Untereinheiten mit einer schnellen Mutation. Intakter Ionentransport durch eine Untereinheit wird durch einen schwarzen Punkt (Pore) angezeigt. Fehlt dieser, so befindet sich in dieser Untereinheit eine Protonen-Glutamat-Mutation, welche den Transport von Protonen und Chloridionen unterbindet. Bei der Koinjektion verschiedener RNAs werden diese durch ein „+“ getrennt, die beiden Untereinheiten eines Dimers werden durch einen „/“ symbolisiert. Mehrere Mutationen in der selben Untereinheit werden mit Hilfe eines „,“ aufgezählt. WT: Wildtyp; td: transportdefizient

auch Wildtyp-Homomere (WT/WT) und Protonen-Glutamat-Homomere (td/td). Protonen-Glutamat-Homomere sind vollständig transportdefizient, sie tragen also nicht zum Gesamtstrom bei. Die Bildung von Wildtyp-Homomeren wurde minimiert, indem ein vierfacher Überschuss an Protonen-Glutamat-RNA injiziert wurde, sodass der Anteil gemischter Dimere (WT/td) bei ca. 89 % und der Anteil der WT/WT-Homomere bei ca. 11 % liegt. (Eine genaue Auflistung der injizierten RNA-Mengen findet sich in Abschnitt 4.2.3.4). Da allerdings WT/td-Heteromere aufgrund nur einer leitenden Untereinheit nur ca. halb so viel Strom leiten wie WT/WT-Homomere ergibt sich ein Anteil der WT/td-Heteromere am Gesamtstrom von ca. 80 %. Das gleiche gilt für die Koinjektion von Wildtyp-RNA mit RNA, die für eine Untereinheit mit schneller Mutation und Protonen-Glutamat-Mutation kodiert (WT+schnell/td) beziehungsweise für die Koinjektion von RNA der schnellen Mutante mit der Protonen-Glutamat-RNA (schnell+td). Die Koinjektion von Wildtyp-RNA mit RNA, welche die Protonen-Glutamat-Mutation enthält (WT+td) beziehungsweise die Koinjektion von RNA der schnellen Mutante mit der RNA die für die schnelle aber transportdefiziente Untereinheit kodiert (schnell+schnell/td) dient als Kontrolle, ob die Protonen-Glutamat-

Mutation selbst einen Einfluss auf das *gating* hat. Da die Vermutung bestand, dass die Aminosäuren, die die Interaktion zwischen Transmembrandomäne und der zweiten CBS-Domäne vermitteln, zumindest einen Teil des *common gates* darstellen, wurden schnelle Mutationen sowohl aus der Transmembrandomäne als auch der zweiten CBS-Domäne ausgewählt. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit den Mutationen R762Q und R767Q, die beide in der zweiten CBS-Domäne liegen, sowie R286Q, welche sich am N-terminalen Ende von Helix G befindet, durchgeführt.

2.2.2. Verifizierung der Strategie

Zunächst wurde überprüft ob Untereinheiten, welche die Protonen-Glutamat-Mutation tragen, auch in Heteromeren transportdefizient sind; d.h. ob Ströme in WT/td-Heteromeren tatsächlich nur von der Untereinheit, welche nicht die Protonen-Glutamat-Mutation enthält, vermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde die erhöhte Nitratleitfähigkeit der bereits beschriebenen Mutation des zentralen Serins (S204P in hClC-7; siehe Abschnitt 1.2.2 und 1.3.4) ausgenutzt. Diese Kontrolle hat den Vorteil, dass sie direkt den möglichen Einfluss einer Untereinheit auf die Pore der anderen Untereinheit aufzeigt, da sich das zentrale Serin innerhalb der Porenregion befindet. Somit würde sich eine eventuell auftretende Beeinflussung der Pore wahrscheinlich in einer veränderten Nitratleitfähigkeit widerspiegeln. Wie bereits beschrieben, wird der messbare Strom der Koinjektion von S204P-RNA und td-RNA zu ca. 80% von den S204P/td-Heteromeren vermittelt, sodass, falls eine Beteiligung der transportdefizienten Untereinheit am Gesamtstrom des Heteromers bestünde, diese detektierbar wäre.

Wie aus Abbildung 2.8 ersichtlich, ist die Nitratleitfähigkeit bei der Koexpression von S204P und E314A (S204P+td) im Vergleich zu S204P unverändert. Die Protonen-Glutamat-Mutation sorgt also nur dafür, dass die Untereinheit, die diese Mutation besitzt, keine Ströme leitet; die Eigenschaften der anderen Untereinheit werden davon aber nicht beeinflusst. Koexprimiert man dagegen Wildtyp und S204P (WT+S204P) so liegt die Nitratleitfähigkeit zwischen der von WT/WT-Homomeren und der von S204P/S204P-Homomeren, wobei sie weitaus näher an der Nitratleitfähigkeit der WT/WT-Homomere liegt. Dies ist sogar von Vorteil, da sich die Nitratleitfähigkeit sehr sensitiv gegenüber der Präsenz von leitenden Untereinheiten ohne S204P-Mutation verhält. Würde demnach E314A doch im Heteromer Ionen leiten, so wäre dies anhand dieses Versuchs nachweisbar.

Des Weiteren muss überprüft werden, ob die Protonen-Glutamat-Mutation auch in Kombination mit einer schnellen Mutation in der selben Untereinheit zu einer trans-

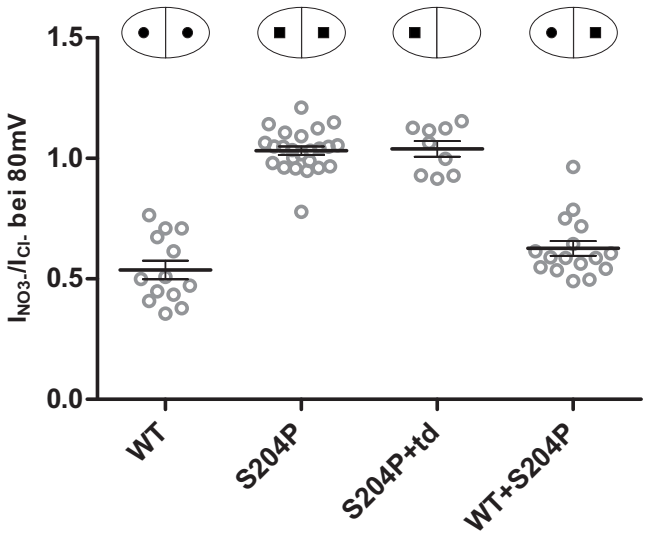


Abbildung 2.8: Untereinheiten mit Protonen-Glutamat-Mutation sind auch im Heteromer transportdefizient. In Oozyten gemessene, auf Chlorid normierte Nitratleitfähigkeiten bei der Injektion von Wildtyp-RNA (WT), S204P-RNA (S204P), einer 1:4 Mischung aus S204P und E314A-RNA (S204P+td) bzw. einer 1:4 Mischung aus Wildtyp- und S204P-RNA (WT+S204P) zeigen keine Veränderung der Nitratleitfähigkeit bei Vorhandensein einer Untereinheit mit Protonen-Glutamat-Mutation. Untereinheiten mit S204P-Mutation werden durch Halbellipsen mit eckiger „Pore“ symbolisiert. Die Schemata zeigen jeweils nur die vorherrschende Dimer-Population. Graue Kreise repräsentieren einzelne Messungen, schwarze Balken zeigen den Mittelwert sowie den Fehler des Mittelwertes (SEM) an.

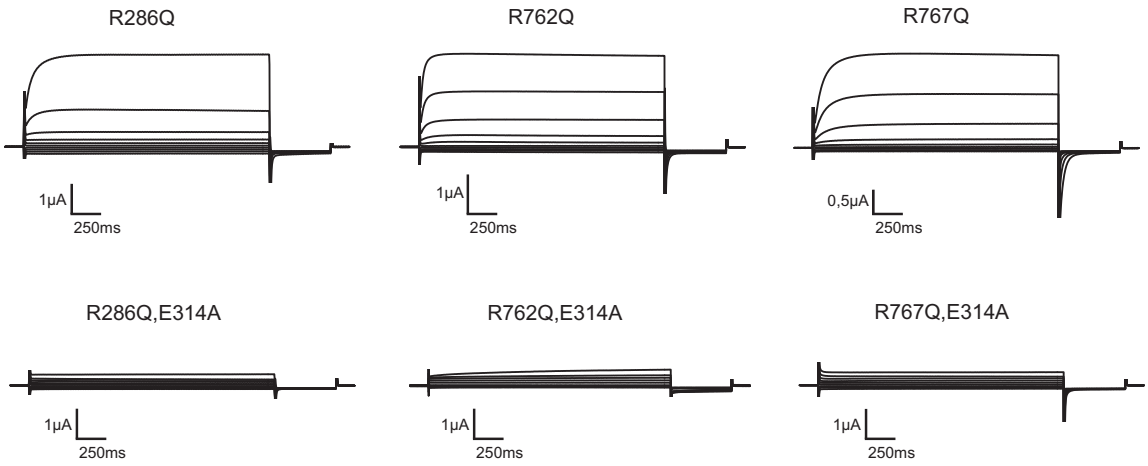


Abbildung 2.9: „Schnelle“ Untereinheiten mit Protonen-Glutamat-Mutation sind ebenfalls transportdefizient. Repräsentative Ströme der Doppelmutanten hClC-7^{PM} R286Q,E314A, R762Q,E314A und R767Q,E314A im Vergleich zu den Einzelmutanten. Alle drei Mutanten zeigen keine Ströme und sind daher transportdefizient (td).

portdefizienten Untereinheit führt. Repräsentative Stromkurven der Einzel- und Doppelmutanten sind in Abbildung 2.9 zu sehen. Wie deutlich erkennbar ist, führt die Einführung der Protonen-Glutamat-Mutation auch in Untereinheiten, die bereits eine

schnelle Mutation besitzen, zum Verlust der Ströme. Die Doppelmutanten R286Q,E314A, R762Q,E314A und R767Q,E314A sind also ebenfalls transportdefizient und werden daher im Folgenden als R286Q,td, R762Q,td und R767Q,td bezeichnet.

2.2.3. Der Einfluss „schneller“ Mutationen auf das *common gate* von CIC-7

Um zu untersuchen, ob in einer Untereinheit vorhandene „schnelle“ Mutationen das *gating* der anderen Untereinheit eines Dimers beeinflussen, wurden Oozyten sowohl mit WT-RNA, R762Q-RNA, einer 1:4 Mischung von WT und R762Q,td-RNA und einer 1:4 Mischung von R762Q und E314A-RNA injiziert und die Ströme mittels TEVC gemessen. Als Kontrolle dienten Messungen an Oozyten, die mit einer 1:4 Mischung von WT und E314A-RNA bzw. einer 1:4 Mischung von R762Q und R762Q,td-RNA injiziert wurden.

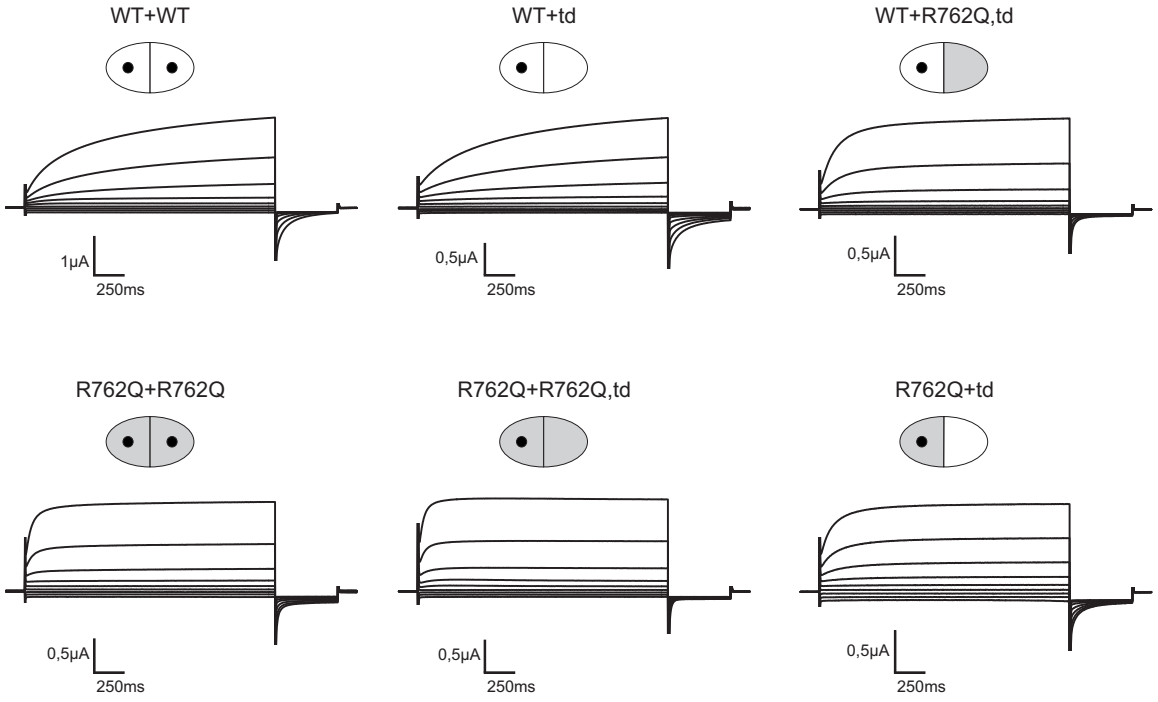


Abbildung 2.10: Die „schnelle Mutation“ R762Q beeinflusst das *gating* der anderen Untereinheit. Repräsentative TEVC-Messungen von mit WT-RNA, R762Q-RNA, einer 1:4 Mischung von WT und R762Q,td-RNA und einer 1:4 Mischung von R762Q und td-RNA injizierten Oozyten. Als Kontrolle dienten Messungen an Oozyten, die mit einer 1:4 Mischung von WT und td-RNA bzw. einer 1:4 Mischung von R762Q und R762Q,td-RNA injiziert wurden. Die Schemata zeigen jeweils nur die vorherrschende Dimer-Population.

In Abbildung 2.10 sind repräsentative TEVC-Messungen für alle genannten Kombinationen gezeigt. Die Symbole über den Messungen verdeutlichen jeweils die vorherrschende Population an Dimeren. Wie sofort aus diesen Beispielmessungen ersichtlich,

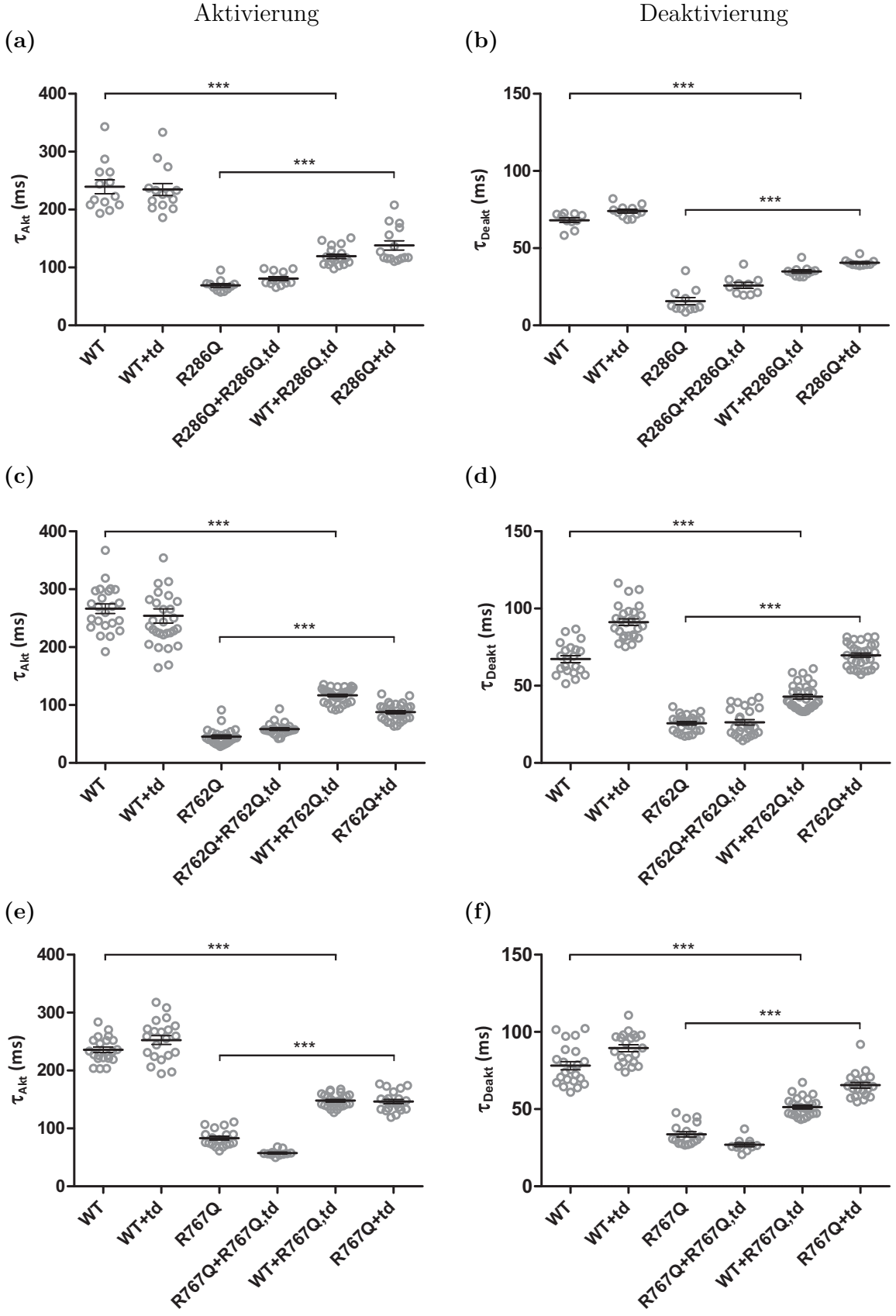


Abbildung 2.11

Abbildung 2.11: „Schnelle“ Mutationen beeinflussen das *gating* der anderen Untereinheit. Zeitkonstanten der (a) Aktivierung und (b) Deaktivierung für R286Q. Zeitkonstanten der (c) Aktivierung und (d) Deaktivierung für R762Q. Zeitkonstanten der (e) Aktivierung und (f) Deaktivierung für R767Q. Graue Kreise repräsentieren einzelne Messungen, dicke Balken zeigen den Mittelwert, dünne Balken den SEM. *** steht für $p<0.001$ in einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test. Zeitkonstanten für die Aktivierung und Deaktivierung stammen jeweils aus den selben Messungen. Die Messungen zu R767Q wurden von Lilia Leisle durchgeführt.

gibt es keinen offensichtlichen Unterschied in der Aktivierungskinetik zwischen WT und WT+td-injizierten Oozyten; das gleiche gilt für R762Q und die Koinjektion von R762Q+R762Q,td. Dies zeigt, dass das Vorhandensein der Protonen-Glutamat-Mutation in einer Untereinheit selbst offenbar keinen Einfluss auf die *gating*-Kinetik hat. Im Gegensatz dazu scheint das *gating* von WT/R762Q,td-Heteromeren im Vergleich zu WT/WT-Homomeren schneller, im Vergleich zu R762Q/R762Q-Homomeren aber langsamer zu sein. Analog dazu scheint das *gating* von R762Q/td-Heteromeren langsamer als das von R762Q/R762Q-Homomeren aber schneller als das von WT/WT-Homomeren. Ein ähnliches Resultat ergibt sich bei Durchführung eines analogen Versuchs mit den Mutationen R286Q und R767Q (dieser Versuch wurde von Lilia Leisle durchgeführt).

Die Quantifizierung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik durch einen monoexponentiellen Fit der ersten 250 ms der Stromantwort bei 80 mV bzw. -80 mV in Abbildung 2.11 belegt die Beeinflussung des *gatings* einer Untereinheit durch eine schnelle Mutation in der anderen Untereinheit. Dargestellt sind jeweils die Zeitkonstanten der Aktivierung, τ_{Akt}, und der Deaktivierung, τ_{Deakt} für den WT, die schnelle Mutante, die beiden Kontrollen WT+td und schnell+schnell,td und die Mischungen WT+schnell,td bzw. schnell+td. Auch anhand der ermittelten Aktivierungszeitkonstanten zeigt sich kein Unterschied in der Kinetik zwischen WT und WT+td bzw. schneller Mutante und schnell+schnell,td. Im Gegensatz dazu beschleunigt das Vorhandensein einer schnellen, aber transportdefizienten Untereinheit das *gating* der WT-Untereinheit im Heteromer signifikant. Dies gilt für alle drei hier getesteten schnellen Mutationen R286Q, R762Q und R767Q. Die Aktivierungszeitkonstanten der Mischungen WT+schnell,td erreichen nicht die von Homomeren aus schnellen Untereinheiten, sondern liegen zwischen denen des Wildtyps und der der schnellen Mutante. Ein möglicher Grund dafür ist das Vorhandensein von WT/WT-Homomeren, welche ca. 20% des Stroms ausmachen. Das umgekehrte Experiment - Koexpression von transportdefizientem ClC-7 und schneller Mutante - zeigt, dass das Vorhandensein einer transportdefizienten Untereinheit mit normalem *gating* das *gating* einer schnellen Untereinheit signifikant verlangsamt. Der gleiche Effekt zeigt sich auch in der Deaktivierungskinetik für alle drei getesteten

Mutationen. Hier muss allerdings angemerkt werden, dass die Qualität der monoexponentiellen Fits der *tail currents* schlechter als die der Fits der Stromantwort bei 80 mV ist. Die Amplituden der *tail currents* sind in der Regel deutlich kleiner und ihre Kinetik ist schneller, sodass nach Ausschluss der kapazitiven Transienten nur ein relativ kurzer Abschnitt zur Erstellung des Fits genutzt werden kann. Aus diesem Grund sollte bei der Interpretation der Daten der Deaktivierungskinetik vorsichtig vorgegangen werden.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schließen, dass ClC-7, so wie auch ClC-0, ClC-1 und ClC-2, ein *common gate* besitzt und dass humane Mutationen, welche das *gating* beschleunigen, diesen Effekt auf das *common gate* von ClC-7 ausüben. Das Vorhandensein eines *common gates* bietet auch eine mögliche Erklärung wie dominante Mutationen die andere Untereinheit des Dimers beeinflussen könnten.

2.2.4. Kombination von „schnellen“ Mutationen beschleunigt das *gating* nicht weiter

Um festzustellen ob der beschleunigende Effekt einzelner „schneller“ Mutationen in derselben Untereinheit additiv ist, wurden die drei Doppelmutanten hClC-7^{PM} R286Q,R762Q, R286Q,R767Q, und R762Q, R767Q untersucht. Es war jedoch nur im Falle von R286Q,R762Q (siehe Abbildung 2.12a) möglich, Ströme zu messen; die Doppelmutationen R286Q,R767Q, und R762Q,R767Q resultierten dagegen in einem Funktionsverlust von ClC-7.

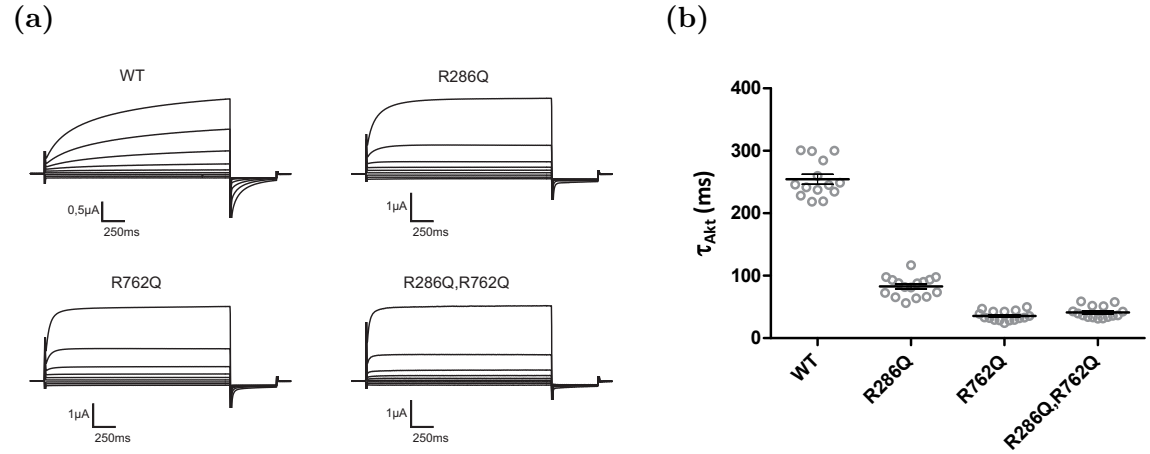


Abbildung 2.12: Kombination von „schnellen“ Mutationen beschleunigt das *gating* nicht weiter. (a) Repräsentative Stromkurven für die Einzelmutanten R286Q und R762Q sowie der Doppelmutante R286Q,R762Q im Vergleich zum Wildtyp. Es wurde das gleiche Messprotokoll wie in Abbildung 2.1 verwendet. (b) Zeitkonstanten der Aktivierung für die Einzelmutanten R286Q und R762Q sowie der Doppelmutante R286Q,R762Q im Vergleich zum Wildtyp . Graue Kreise repräsentieren einzelne Messungen, schwarze Balken zeigen den Mittelwert sowie SEM an.

Wie aus Abbildung 2.12b ersichtlich, sind die Zeitkonstanten der Aktivierung für R762Q und die Doppelmutante R286Q,R762Q nicht verschieden, die Kombination der beiden „schnellen“ Mutationen R286Q und R762Q führt also nicht zu einer weiteren Beschleunigung des *gatings*.

2.3. Untersuchung des Chlorid-koordinierenden Tyrosins als mögliches inneres *gate* von ClC-7

Das in Abschnitt 1.2.2 beschriebene Chlorid-koordinierende Tyrosin ist aus mehreren Gründen interessant. Es befindet sich direkt innerhalb der Pore in unmittelbarer Nähe zur zentralen Chloridbindestelle und ist in allen bekannten CLC-Proteinen konserviert (für eine Auswahl einiger CLC's siehe Alignment in Anhang A.2 auf Seite 77). Studien an EcClC-1 haben gezeigt, dass Mutationen des Tyrosins den Chlorid- vom Protonentransport entkoppeln können (Accardi et al., 2006; Walden et al., 2007). Dabei hängt der Grad der Entkopplung von der Größe der substituierten Aminosäure ab. Kleinere Aminosäuren wie z. B. Glycin oder Alanin führen zu einer fast vollständigen Entkopplung, während größere Aminosäuren wie z. B. Phenylalanin in der Lage sind, das Tyrosin zu ersetzen und einen gekoppelten Transport aufrecht zu erhalten (Accardi et al., 2006; Walden et al., 2007). Unter anderem auf der Grundlage dieser Versuche wurde spekuliert, ob das Chlorid-koordinierende Tyrosin das innere *gate* oder zumindest einen Teil des inneren *gates* darstellt. In ClC-0 und ClC-1 hingegen wurde das Tyrosin mit dem *common gate* in Verbindung gebracht, da Mutationen dieses Rests in beiden Proteinen jeweils zu einer partiellen Öffnung des *common gates* führen (Bennetts und Parker, 2013). Bis jetzt gibt es jedoch keine Studien zur Funktion dieses Rests in den intrazellulären CLC's und überhaupt mit EcClC-1 nur eine Studie an einem Chlorid/Protonen-Austauscher. Da ClC-7 elektrophysiologischen Untersuchungen gut zugänglich ist, sollte überprüft werden, ob Mutationen des Tyrosins auch in ClC-7 den Chlorid- vom Protonentransport entkoppeln und das Tyrosin somit möglicherweise einen Teil des inneren *gates* darstellt.

2.3.1. Einfluss von Mutationen des Chlorid-koordinierenden Tyrosins auf die Kopplung von Chlorid- und Protonentransport

Zur Untersuchung der Funktion des Chlorid-koordinierenden Tyrosins wurden acht Mutationen eingeführt, die zu einer Substituierung des Tyrosins durch Alanin, Serin,

Glutamat, Histidin, Leucin, Lysin, Phenylalanin bzw. Tryptophan führen. Diese Aminosäuren wurden gewählt, da ihre Seitenketten verschiedene chemische Eigenschaften und Größen besitzen. Es waren nur von Y600A und Y600S ausreichend große Ströme in *X. laevis*-Oozyten und transfizierten HeLa-Zellen messbar, alle anderen Mutanten zeigten für die folgenden Untersuchungen zu geringe Ströme.

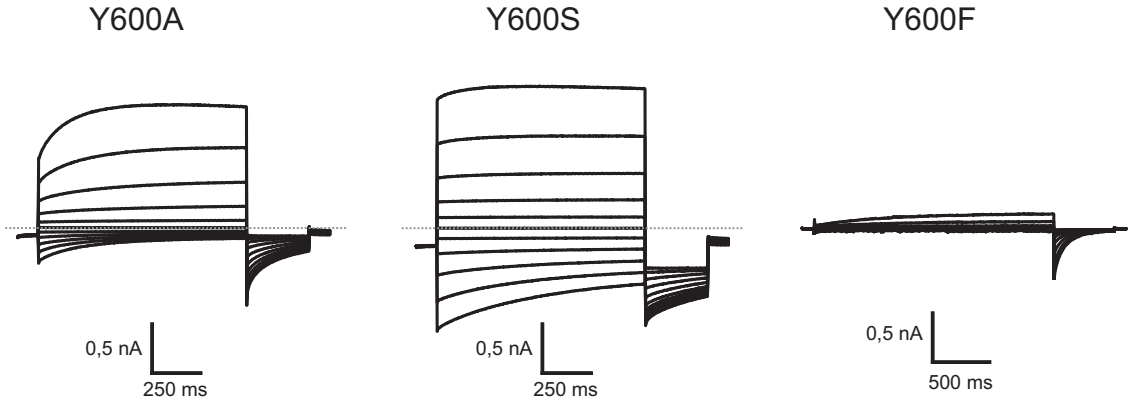


Abbildung 2.13: Repräsentative *patch clamp*-Messungen der Mutanten Y600A, Y600S und Y600F. Alle Messungen wurden an transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Gestrichelte Linien geben die Nulllinie des Stroms an.

In Abbildung 2.13 sind repräsentative *patch clamp*-Messungen von mit Y600A, Y600S und Y600F transfizierten HeLa-Zellen gezeigt. Die Messung der Mutante Y600F ist hier stellvertretend für alle anderen Mutanten dargestellt, die ähnlich geringe Ströme aufwiesen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen sowohl Y600A als auch Y600S ein weniger stark rektifizierendes Verhalten, es sind auch bei negativen Spannungen zunächst Ströme messbar, die langsam deaktivieren. Weiterhin scheinen beide Mutationen das *gating* zu beschleunigen, im Falle von Y600S erscheint das Protein sogar fast instantan geöffnet.

Eine Untersuchung auf die Entkopplung von Chlorid- und Protonentransport konnte aufgrund der geringen Ströme aller anderen Mutanten nur für Y600A und Y600S durchgeführt werden. Die Messung des Umkehrpotentials stellt dabei eine einfache Möglichkeit dar, eine Entkopplung nachzuweisen, da das Umkehrpotential direkt abhängig von den transportierten Substraten und deren Stöchiometrie ist. Es kann außerdem bei bekannter Chloridkonzentration und bekanntem pH-Wert über die Nernstgleichung (siehe Abschnitt 4.2.5.4) für verschiedene Kopplungsverhältnisse berechnet und direkt mit dem Messwert verglichen werden. Es wurden die Umkehrpotentiale der beiden Mutanten bei einer extrazellulären Chloridkonzentration von 139 mM, 39 mM und 19 mM sowie einem extrazellulären pH-Wert von 6,4, 7,4 und 8,4 bestimmt. Als

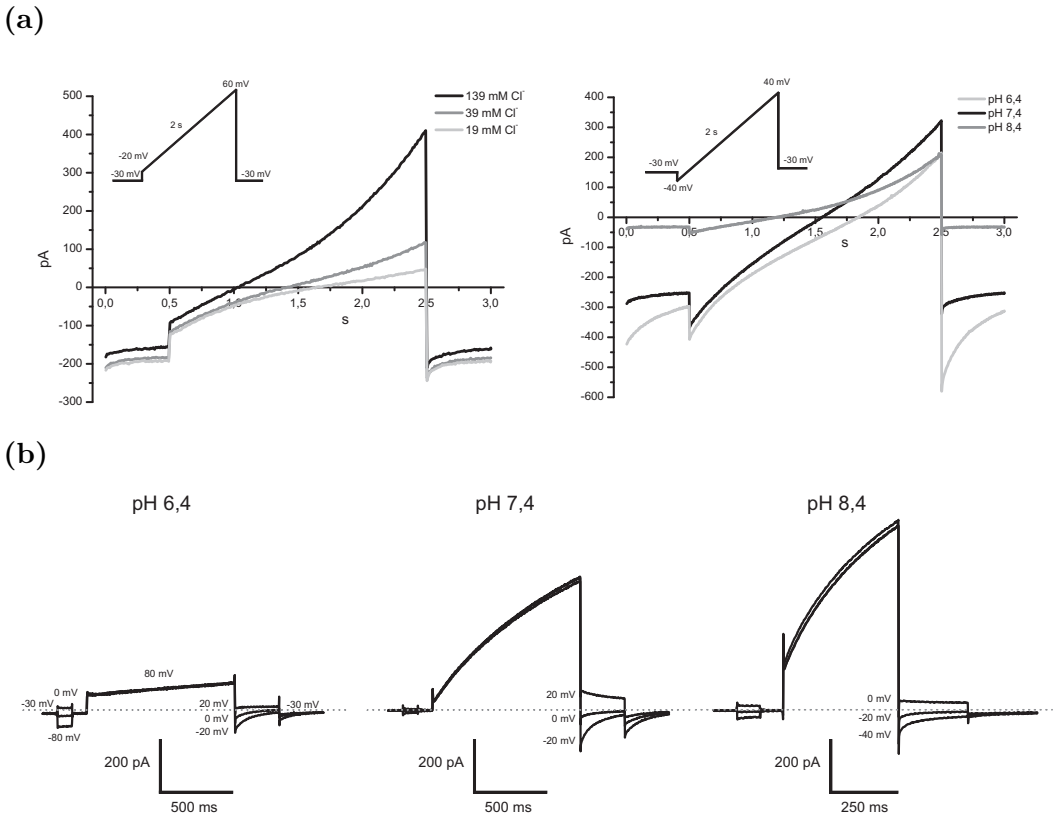


Abbildung 2.14: Bestimmung der Umkehrpotentiale am Beispiel der Mutante Y600S und des Wildtyps (a) Typische Messungen zur Bestimmung des Umkehrpotentials am Beispiel der Mutante Y600S für verschiedene extrazelluläre Chloridkonzentrationen (links) und pH-Werte (rechts). Für die Mutanten Y600A und Y600S sowie die *gating*-Glutamat-Mutante konnten Rampenprotokolle (siehe kleinere Schemata jeweils oben links) verwendet werden. Rampenprotokolle wurden so gewählt, dass die abgedeckten Spannungen den Bereich der möglichen Umkehrpotentiale einschloss. (b) Typische Messungen zur Bestimmung des Umkehrpotentials des Wildtyps für verschiedene extrazelluläre pH-Werte. Aufgrund des starken spannungsabhängigen *gatings* mussten Stufenprotokolle verwendet werden, die für die pH-Werte 6,4 und 7,4 die *tail currents* bei -20 mV, 0 mV und 20 mV und für pH 8,4 bei -40 mV, -20 mV und 0 mV nutzen. Der Beitrag endogener Ströme wurde über kurze (100 ms) Kontrollpulse bei -80 mV, -40 mV und 0 mV vor dem Testpuls abgeschätzt. Diese Messungen stammen von der selben Zelle, die nacheinander für 2 min mit Lösungen entsprechender pH-Werte perfundiert wurde.

Kontrolle diente der Wildtyp von ClC-7 und die *gating*-Glutamat-Mutante E245A, die sich wie eine reiner Chlorid-Kanal verhält. Dabei wurde im Falle des Wildtyps, wie in Abbildung 2.14 dargestellt, aufgrund des starken spannungsabhängigen *gatings* ein Stufenprotokoll verwendet, für die Mutanten jedoch ein Rampenprotokoll. Eine genauere Begründung und Beschreibung dieses Vorgehens findet sich in Abschnitt 4.2.5.4. Die gemessenen Umkehrpotentiale für die verschiedenen Chloridkonzentrationen sind in Tabelle 2.3, die Umkehrpotentiale für die verschiedenen pH-Werte in Tabelle 2.4 zusammengefasst. Zum Vergleich sind jeweils auch die berechneten Werte für einen Chlorid-Kanal bzw. einen 2:1 Chlorid/Protonen-Austauscher eingefügt.

	139 mM Cl^-	39 mM Cl^-	19 mM Cl^-
Cl^--Kanal	-2,7	29,4	47,6
$2Cl^-/1H^+$-Antiporter	-1,8	19,6	31,7
E245A	-1,9 ± 0,6 (8)		47,8 ± 2,2 (4)
WT	-1,8 ± 0,9 (10)		32,6 ± 0,9 (5)
Y600A	-2,0 ± 0,8 (15)	17,8 ± 3,1 (4)	28,5 ± 3,3 (4)
Y600S	-1,4 ± 0,8 (13)	18,3 ± 3,0 (3)	31,0 ± 3,3 (5)

Tabelle 2.3: Gemessene Umkehrpotentiale der Tyrosinmutanten für verschiedene extrazelluläre Chlorid-Konzentrationen. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Chloridkonzentration. Alle gemessenen Werte wurden auf *liquid junction*-Potentiale korrigiert. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Messungen an. Zum Vergleich sind in der Tabelle außerdem die berechneten Werte für einen Chloridkanal und einen 2:1 Chlorid/Protonen-Austauscher sowie die gemessenen Werte für den Wildtyp und die *gating*-Glutamat-Mutante E245A angegeben.

	pH 7,4	pH 6,4	pH 8,4
Cl^--Kanal	-2,7	-2,7	-2,7
$2Cl^-/1H^+$-Antiporter	-1,8	17,6	-21,2
E245A	-1,9 ± 0,6 (8)	-1,1 ± 0,1 (4)	-1,9 ± 0,5 (4)
WT	-1,8 ± 0,9 (10)	10,7 ± 1,4 (7)	-15,0 ± 1,9 (5)
WT korrigiert		17,2 ± 6,9 (7)	-19,3 ± 1,9 (5)
Y600A	-2,0 ± 0,8 (15)	10,7 ± 2,3 (11)	-18,4 ± 3,4 (11)
Y600S	-1,4 ± 0,8 (13)	9,1 ± 1,6 (10)	-12,1 ± 4,2 (8)

Tabelle 2.4: Gemessene Umkehrpotentiale der Tyrosinmutanten für verschiedene extrazelluläre pH-Werte. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung für jeden pH-Wert. Alle gemessenen Werte wurden auf *liquid junction*-Potentiale korrigiert. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Messungen an. Zum Vergleich sind in der Tabelle außerdem die berechneten Werte für einen Chloridkanal und einen 2:1 Chlorid/Protonen-Austauscher sowie die gemessenen Werte für den Wildtyp und die *gating*-Glutamat-Mutante E245A angegeben. In der Zeile „WT korrigiert“ befinden sich die um das Umkehrpotential der endogenen Ströme korrigierten Werte für den WT. Die Werte für pH 7,4 sind die gleichen aus Tabelle 2.3 für 139 mM Cl^-, da diese als Standardkonditionen benutzt wurden.

Die gemessenen Umkehrpotentiale bei verschiedenen extrazellulären Chlorid-Konzentrationen für den Wildtyp und die beiden Mutanten Y600A und Y600S stimmen sehr gut mit den theoretischen Werten für einen 2:1 Austauscher überein, während die Werte für die *gating*-Glutamat-Mutante wie erwartet denen eines reinen Chlorid-Kanals entsprechen. Im Gegensatz dazu zeigen die gemessenen Umkehrpotenziale bei verschiedenen pH Werten für die beiden Mutanten, aber auch den Wildtyp, eine starke Abweichung von den berechneten Werten für einen 2:1 Austauscher in Richtung der Werte für einen Chloridkanal. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Abweichung des tatsächlich vorliegenden pH-Wertes vom nominalen pH-Wert, welche durch den auswärts gerichteten Protonen-Transport von ClC-7 verursacht würde. Dies würde zum Aufbau einer Schicht mit geringfügig niedrigerem pH-Wert zwischen Zelle und Deckgläschen

bewirken und somit zu abweichenden Werten für die Umkehrpotentiale führen. Dieser Verdacht bestätigte sich jedoch in Experimenten mit abgelösten und somit frei in Lösung befindlichen Zellen nicht. Vielmehr scheint die Ursache in der Induzierung von endogenen Strömen durch saure und basische pH-Werte zu liegen. Wie aus Abbildung 2.14 ersichtlich, wurden in die Protokolle zur Bestimmung des Umkehrpotentials von Wildtyp ClC-7 drei kurze (100 ms) Kontrollpulse bei -80 mV, -40 mV und 0 mV vor dem Testpuls eingefügt. Diese Pulse sind zu kurz um ClC-7 selbst zu aktivieren und dienten dazu, Umkehrpotential und Leitwert der endogenen Leitfähigkeiten abzuschätzen. Bei einem extrazellulären pH von 7,4 sind diese endogenen Ströme sehr klein im Vergleich zum durch ClC-7 vermittelten Strom und konnten aus diesem Grund vernachlässigt werden. Dies gilt jedoch nicht bei einem pH von 6,4 oder 8,4. Hier zeigen sich im Vergleich zum ClC-7 vermittelten Strom große endogene Ströme, die das Umkehrpotential maßgeblich mit beeinflussen. Anhand der Kontrollpulse konnten Leitwert und Umkehrpotential der endogenen Leitfähigkeiten abgeschätzt und der gemessene Wert entsprechend korrigiert werden (siehe “WT korrigiert” in Tabelle 2.4). Diese Korrektur kann für die Mutanten nicht durchgeführt werden, da diese sehr schnell aktivieren und somit über die kurzen Testpulse keine Trennung der endogenen Ströme von den durch die Mutanten vermittelten Ströme erfolgen kann. Anzumerken ist, dass bei einem Kontrollversuch mit nicht transfizierten Zellen in ca. 60% der Fälle nach einem Lösungswechsel zu pH 6,4 und pH 8,4 instantan aktivierte endogene Ströme messbar waren. Diese waren in Amplitude und Umkehrpotential außerordentlich variabel, so dass eine Korrektur der Umkehrpotentiale von Y600A und Y600S um die der enodgenen Ströme nicht transfizierter Zellen wenig sinnvoll scheint. Die Variabilität der induzierten endogenen Ströme wäre auch eine Erklärung für die größere Standardabweichung der über die pH-Werte bestimmten Umkehrpotentiale im Vergleich zu den Messungen mit verschiedenen Chlorid-Konzentrationen. Da die Umkehrpotentiale von Y600A und Y600S gut mit den nicht um endogene Ströme korrigierten Werten des Wildtyps für verschiedene pH-Werte übereinstimmen und zugleich die mit verschiedenen Chlorid-Konzentrationen bestimmten Umkehrpotentiale stark für einen 2:1 Chlorid/Protonen-Austauscher sprechen, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Mutationen Y600A und Y600S nicht zu einer Entkopplung des Antiports von Chloridionen und Protonen führen.

2.3.2. Auswirkung der Mutationen Y600A und Y600S auf das *gating* von ClC-7 in Abhängigkeit vom pH-Wert

Da die beiden Mutationen Y600A und Y600S den Chlorid/Protonen-Antiport nicht entkoppeln, muss das stark vom WT abweichende Verhalten dieser Mutanten - insbesondere die Öffnung des Transporters auch bei negativen Spannungen - durch eine Beeinflussung des *gatings* zustande kommen. Unerwarteterweise hat im Gegensatz zum Wildtyp der pH-Wert einen starken Einfluss auf die Kinetik der Mutanten.

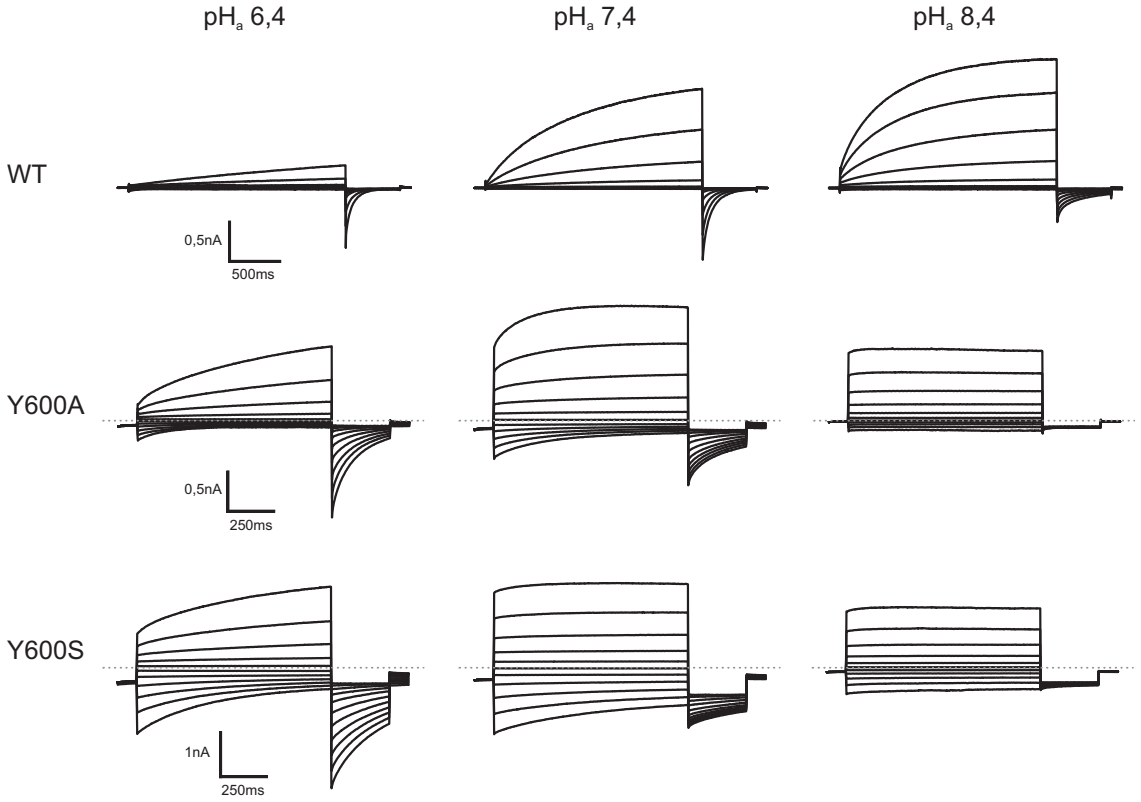


Abbildung 2.15: Mutationen von Y600 beeinflussen das *gating* von ClC-7 pH-abhängig. Repräsentative *patch clamp*-Messungen von mit rClC-7^{PM}, rClC-7^{PM} Y600A und rClC-7^{PM} Y600S transfizierten HeLa-Zellen bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,4, 7,4 und 8,4. Dabei stammen alle Messungen einer Mutante von der gleichen Zelle, die nacheinander für mindestens 2 min mit Lösungen des entsprechenden pH-Wertes perfundiert wurde. Die angegebenen Skalen gelten jeweils für alle Messungen der gleichen Zelle. Gestrichelte Linien geben für die Messungen an Y600A und Y600S die Nulllinie des Stroms an.

Wie aus den in Abbildung 2.15 gezeigten *patch clamp*-Messungen ersichtlich, verlangsamt ein saurer extrazellulärer pH-Wert das spannungsabhängige Aktivierung, während bei einem basischen extrazellulären pH der Transporter instantan geöffnet ist und keine Kinetik mehr aufweist. Beim Wildtyp-Protein dagegen scheint der pH-Wert keine

Auswirkung auf die Kinetik, sondern nur auf die Stromamplitude zu haben. Der gemessene Strom ist im Falle des Wildtyps wie zu erwarten bei saurem extrazellulären pH-Wert geringer, da in diesem Fall Protonen entegen ihres elektrochemischen Gradienten transportiert werden müssen. Interessanterweise zeigen die beiden Mutanten keine deutliche Reduktion der Stromamplitude bei saurem extrazellulärem pH. Die Auswirkung der beiden Mutationen auf das *gating* muss über eine Beeinflussung der Pore geschehen und kann nicht durch periphere protonierbare Reste vermittelt werden, da dann der Wildtyp ein ähnliches pH-abhängiges Verhalten zeigen müsste. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass das Chlorid-koordinierende Tyrosin von zentraler Bedeutung für das spannungsabhängige *gating* und die Aufrechterhaltung der starken Rektifizierung von ClC-7 ist.

3. Diskussion

3.1. Auswirkungen der humanen Osteopetrose-Mutationen auf die Funktion von ClC-7

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde erstmalig eine elektrophysiologische Untersuchung humaner ClC-7-Mutationen vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass zwar wie erwartet einige dieser Mutationen in einem Funktionsverlust des Proteins resultieren, ein großer Anteil der untersuchten Mutationen aber unerwarteterweise dessen *gating* beeinflusst. Außerdem gibt es eine kleine Anzahl von Mutationen, die keinen offensichtlichen Effekt zeigten. Bei Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von ClC-7 führen, kann die Ursache hierfür entweder in einem gestörten *Trafficking* oder aber in einer tatsächlichen Beeinträchtigung des Ionentransportes des Proteins durch die Mutationen liegen. Beide Ursachen wurden für einen Teil dieser Mutationen nachgewiesen. So resultieren z. B. die Mutationen G521R und R526W in transfizierten HeLa-Zellen in einer Retention des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Leisle et al., 2011). Auch die Mutation G215R führte in transfizierten CHO-Zellen zu einer abweichenden subzellulären Lokalisation von ClC-7 (Schulz et al., 2010). Die V297M, F318L, L490F, L651P, R767P und R767W-Mutanten dagegen werden aus dem ER von transfizierten HeLa-Zellen exportiert und ihre Expression ist auch in Oozyten mittels Western-Blots nachweisbar (Leisle et al., 2011). Es scheint daher wahrscheinlich, dass in diesen Fällen tatsächlich eine funktionelle Beeinträchtigung von ClC-7 durch die Mutation selbst vorliegt. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass sich die Funktion von ClC-7 offenbar nicht nur auf den Ionentransport beschränkt, sondern es sehr wahrscheinlich auch an Interaktionen mit anderen Proteinen teilnimmt. Dies wird untermauert durch den Phänotyp einer Knock-in-Maus, die Weinert et al. (2014) generierten. Das ClC-7-Gen dieser Maus besitzt die Protonen-Glutamat-Mutation, welche ClC-7 transportdefizient macht, dessen Expression aber nicht unterbindet. Die ClC-$7^{td/td}$-Maus hat, im Gegensatz zur ClC-7 Knockout-Maus, ein braunes Fell und leidet an einer weniger starken Neurodegeneration. Das ClC-7-Protein selbst, nicht aber dessen Ionenleitfähigkeit, ist demnach für die Haarpigmentierung von Bedeutung. In dieser Arbeit bezieht sich jedoch das Wort “Funktionsverlust” immer auf einen Verlust des Ionentransportes, der entweder aufgrund einer Mislokalisation oder einer funktionellen Beeinträchtigung des Proteins durch die Mutation auftritt.

Völlig unklar ist jedoch, warum auch Mutationen, die in einem beschleunigten *gating* und somit einem Funktionszuwachs (*gain-of-function*, hier: größerer Strom nach kurzer

Depolarisation) resultieren, Osteopetrose verursachen. Auch hier besteht die Möglichkeit eines fehlgeleiteten *Traffickings* und sukzessivem Abbau des Proteins, oder aber das langsame *gating* des Wildtyps hat eine physiologische Bedeutung. Eine ebenfalls mögliche, veränderte Spannungsabhängigkeit dieser Mutanten konnte nicht bestätigt werden. Im Transportassay an transfizierten HeLa-Zellen zeigten zwar alle untersuchten „schnellen“ Mutanten eine normale lysosomale Lokalisation (Leisle et al., 2011), dies muss jedoch nicht zwingenderweise auch für die Situation *in vivo* gelten. So konnten Kornak et al. (2001) in Leukozyten und Fibroblasten eines kombiniert heterozygoten (Mutationen R555X und R762Q in je einem Allel) Osteopetrose-Patienten zwar die cDNA nachweisen, die die R762Q-Mutation trug, in Western-Blots war das Protein jedoch nicht detektierbar. Es gibt jedoch auch ein Beispiel, dass für die Pathologie des schnellen *gatings* dieser Mutanten spricht. So wurde in osteopetrotischen Rindern der Rasse „Weißblaue Belgier“ die „schnelle“ ClC-7 Mutation Y750Q nachgewiesen, die offenbar weder zu einem Abbau noch zu einem fehlgeleiteten *Trafficking* von ClC-7 führt (Sartelet et al., 2013). Diese Studie ist ein Indiz dafür, dass das langsame *gating* von ClC-7 von Wichtigkeit ist und die Beschleunigung desselben durch „schnelle“ Mutationen tatsächlich Osteopetrose verursachen könnte. Interessanterweise wurden keine Mutationen gefunden, die das *gating* von ClC-7 weiter verlangsamen. Es könnte sein, dass in diesem Fall während des 2 s langen Testpulses keine Ströme messbar wären und dafür eine längere Depolarisation erfolgen müsste. Eine andere Erklärung wäre, dass das *gating* von ClC-7 im Hinblick auf dessen Langsamkeit optimiert ist. Dies würde für eine physiologische Bedeutung des langsamen *gatings* von ClC-7 sprechen.

Sowohl Mutationen, welche das *gating* beschleunigen, als auch Mutationen, die zu einem Funktionsverlust führen, können einen rezessiven oder dominanten Erbgang aufweisen. Es konnte keinerlei Korrelation zwischen Erbgang und Auswirkung der Mutation gefunden werden, es ist aber wahrscheinlich dass eine noch nicht gefundene Korrelation besteht. Heterozygote *Clcn7*$^{+/-}$-Mäuse zeigen keinerlei Osteopetrose (Kornak et al., 2001), was darauf hindeutet, dass Haploinsuffizienz nicht den Auslöser der dominanten Osteopetrose ADOII darstellt. Eine mögliche Erklärung für den dominanten Effekt dieser Mutationen wäre eine ER-Retention der Dimere, in denen mindestens eine Untereinheit die entsprechende Mutation trägt. Dies würde die Menge funktionellen Proteins auf 25% reduzieren. Allerdings zeigen alle getesteten „schnellen“ Mutationen *in vitro* eine normale lysosomale Lokalisation. Im Falle einer heterozygot vorliegenden „schnellen“ Mutation würden 25% Homodimere mit zwei mutierten Untereinheiten, 50% Heterodimere und 25% Wildtyp-Homomere erwartet. Die Beschleunigung des *gatings* der Wildtyp-Untereinheit durch die mutierte Untereinheit in Heteromeren wäre

eine weitere mögliche Erklärung. Allerdings würde diese, durch das gleichzeitige Vorhandensein der Wildtyp-Untereinheit, in einer milden Auswirkung auf das *gating* des Dimers resultieren.

3.2. Was ist die physiologische Funktion des langsamen *gatings* von ClC-7?

Über die Funktion des langsamen *gatings* von ClC-7 kann bis jetzt nur spekuliert werden, da das Wissen über die lysosomale Physiologie noch lückenhaft ist. So ist zum Beispiel noch nicht klar, welchen Wert das lysosomale Transmembranpotential hat. Messungen des lysosomalen Membranpotentials an Makrophagen mittels FRET haben ein lumenal positives Potential von etwa 19 mV ergeben (Koivusalo et al., 2011). ClC-7 wäre allerdings laut den Messungen in heterologer Expression bei einem lumenal positiven Potential nicht aktiv (Leisle et al., 2011). Im Gegensatz dazu zeigten vereinfachte Modellrechnungen, dass die Transportaktivität von ClC-7 selbst ein leicht negatives lumenales Potential hervorbringen könnte (Weinert et al., 2010) und somit ClC-7 seine eigene Funktion unterstützen würde.

Im Prinzip bewirkt das sehr langsame Öffnungsverhalten des Wildtyps eine gewisse Insensitivität gegenüber schnellen Spannungsänderungen - im Gegensatz zu den „schnellen“ Mutanten. Unklar ist allerdings, ob es in Lysosomen solche schnellen Spannungsänderungen gibt. Denkbar wären eventuell Prozesse, die lysosomales Calcium freisetzen. Die lysosomale Calcium-Konzentration beträgt etwa 0,5 mM (Christensen et al., 2002) und ist damit um etwa vier Größenordnungen höher als im Zytosol, in dem Calcium nur in einer Konzentration von ca. 100 nM vorliegt (Tsien et al., 1982). Seit einiger Zeit mehren sich die Hinweise auf Lysosomen als potentielle Calcium-Speicher (Galione und Churchill, 2002) und es wurde gezeigt, dass Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) eine Freisetzung von Calcium aus dem Lysosom durch Aktivierung von TPC-Kanälen bewirken kann (Calcraft et al., 2009). Möglicherweise könnte der Ausstrom von positiv geladenen Calciumionen kurzzeitig ein lumenal negatives lysosomales Membranpotential verursachen und dadurch ClC-7 aktivieren. Bis jetzt gibt es dafür allerdings keine direkten Beweise.

Des Weiteren muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass das *gating* von ClC-7 in nativen Lysosomen von dem hier gezeigten Verhalten in heterologer Expression abweicht. Gründe hierfür wären z. B. eine andere Lipidzusammensetzung der Plasmamembran im Vergleich zur lysosomalen Membran. So besitzt

die Plasmamembran z. B. einen größeren Anteil an Cholesterol und andere Phosphatidylinositolphosphate als die lysosomale Membran. Für eine Reihe von verschiedenen Kanälen wurde bereits eine Sensitivität gegenüber der Präsenz von Cholesterol gezeigt. Dies betrifft z. B. nAChr (den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor), Kir-Kanäle (einwärts rektifizierende Kalium-Kanäle), den BK-Kanal (ein Ca^{2+}-aktivierter Kalium-Kanal) und TRPV-Kanäle (Ca^{2+}-Kanäle) (Barrantes, 2004; Romanenko et al., 2004; Crowley et al., 2003; Picazo-Juárez et al., 2011; Levitan et al., 2014). Kir-, TRP- und einige Calcium-Kanäle sind zudem in der Lage, das in der Plasmamembran vorkommende Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu binden (Whorton und MacKinnon, 2011; Hansen et al., 2011; Suh und Hille, 2008; Gamper und Shapiro, 2007), welches auch regulatorische Funktionen haben kann. Auch für TPC-Kanäle wurde kürzlich eine Aktivierung durch PIP_2 beschrieben (Wang et al., 2012). Entsprechende Studien zur Modulation der Funktion der CLC-Proteine durch Lipide gibt es bis jetzt allerdings nicht. Eigene *patch clamp*-Versuche, bei denen sich PIP_2, das in späten Endosomen und Lysosomen vorkommende Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat ($PI(3,5)P_2$) oder Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) in der Pipettenlösung befand, zeigten keine Veränderung der Ströme von ClC-7. Natürlich kann ein Einfluss anderer Bestandteile lysosomaler Membranen aber nicht ausgeschlossen werden.

3.3. Die Rolle der Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche für das *common gating*

Die Lokalisation der von Mutationen betroffenen Aminosäuren scheint mit deren Auswirkung zu korrelieren. Aminosäuren, die bei Mutation in einem Funktionsverlust resultieren, finden sich im gesamten Protein und scheinen in etwa gleich verteilt zwischen Transmembrandomäne und CBS-Domänen zu sein. Im Gegensatz dazu befinden sich Aminosäuren, die von „schnellen“ Mutationen betroffen sind, meist in der Interaktionsfläche zwischen Transmembrandomäne und zweiter CBS-Domäne sowie in der zweiten CBS-Domäne selbst. Einzige Ausnahme bildet hier D145, das sich im Transmembranbereich befindet. Interessanterweise zeigen ClC-3, ClC-4, ClC-5, und ClC-6, völlig im Gegensatz zu ClC-7, in heterologer Expression ein schnelles *gating* mit fast instantaner Öffnung des Transporters (Li et al., 2000; Friedrich et al., 1999; Neagoe et al., 2010). Bei einem Vergleich der bei „schnellem“ *gating* mutierten Aminosäuren von hClC-7 (siehe Alignment im Anhang A.2 auf Seite 77) mit den entsprechenden Resten von hClC-5 fällt jedoch auf, dass diese meist zwischen diesen beiden CLC's konserviert sind. So besitzt z. B. hClC-5 genauso wie ClC-7 die drei Arginine R240, R704 und R709 (R286,

R762 und R767 in hClC-7). Das langsame *gating* von ClC-7 lässt sich also nicht einfach anhand einiger weniger veränderter Reste der Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche erklären. Trotzdem sprechen mehrere Studien dafür, dass diese Region in den Prozess des *common gatings* involviert ist. Der erste Hinweis auf eine Beteiligung der CBS-Domänen am *common gating* kam von Fong et al. (1998) und stützte sich auf Experimente an einer Chimäre aus dem Transmembranbereich von ClC-0 und dem zytoplasmatischen C-Terminus von ClC-2, welche kein *common gating* mehr aufweist. In Versuchen mit C-terminal YFP- oder CFP-fluoreszenzmarkiertem ClC-0 und ClC-1 wurde FRET beobachtet, der mit einer Öffnung des *common gates* korreliert (Bykova et al., 2006; Ma et al., 2011). Dies suggeriert eine Bewegung des C-Terminus relativ zur Transmembrandomäne im Zuge der Aktivierung des *common gates*. Bykova et al. (2006) berichteten dabei von zurückgelegten Distanzen von ca. 20 Å, dies würde also eine größere Änderung der Tertiärstruktur bedeuten. Auch die starke Temperaturabhängigkeit des *common gatings* von ClC-0 mit einem Q_{10}-Wert von ~40 spricht für eine größere Konformationsänderung im Zuge dieses Prozesses (Pusch et al., 1997). Für ClC-7 wurde ein Q_{10}-Wert der Aktivierung von ca. 3 ermittelt (Leisle et al., 2011), allerdings war eine Bestimmung der separaten Q_{10}-Werte für *protopore gating* und *common gating* nicht möglich, da sich beide Prozesse hier nicht trennen lassen. Weiterhin wurde von Feng et al. (2010) eine außerordentlich hohe Formkomplementarität - ähnlich einer Antigen-Antikörper-Wechselwirkung - der dem Zytosol zugewandten Seite der Transmembrandomäne und der zweiten CBS-Domäne in der Kristallstruktur des CmClC beschrieben und eine hoch spezifische Interaktion beider Domänen vorgeschlagen. Unterstützt wird diese Hypothese durch *split transporter*-Experimente, bei denen der C-Terminus von ClC-7 nach der R-Helix trunkiert wurde. Dieses Konstrukt zeigt keinerlei Ströme bei Expression in *X. laevis*-Oozyten, allerdings kann die Funktion bei einer Koexpression des löslichen C-Terminus widerhergestellt werden (Ludwig et al., 2013). Wurde jedoch die Mutation R762L in den löslichen C-Terminus eingefügt, so funktionierte dies nur, wenn der mutierte C-Terminus mit Ostm1 fusioniert und somit in die Nähe des trunkierten ClC-7 gebracht wurde. Offenbar destabilisiert also die Mutation R762L die Interaktion der zweiten CBS-Domäne mit dem Transmembranbereich. Dies bekräftigt die Hypothese, dass das genaue Zusammenspiel von Transmembranbereich und zweiter CBS-Domäne von Bedeutung für das *common gating* ist und dass die untersuchten humanen Mutationen dieses stören.

Ebenfalls noch weitgehend im Unklaren ist, auf welche Weise das *common gate* auf beide Untereinheiten wirkt. Zu diesem Zweck muss es eine Interaktion beider Untereinheiten geben. Eine Vielzahl dominanter Mutationen von ClC-1, welche Myotonia

Congenita auslösen, verändern die Spannungsabhängigkeit des *common gates* und betreffen Aminosäuren der Helices H und I, aber auch P und Q, welche einen Teil der Dimer-Interaktionsfläche bilden (Saviane et al., 1999; Duffield, 2003). In ClC-7 finden sich dagegen, mit Ausnahme von F318L im Linker zwischen den Helices H und I, keine Mutationen in den entsprechenden Helices. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Interaktion der C-Termini beider Untereinheiten. In der Kristallstruktur des CmClC kommen sich die CBS2-Domänen beider Untereinheiten an zwei Stellen sehr nahe, der Abstand zwischen den Cα-Atomen beträgt an der engsten Stelle nur ca. 5 Å. Die bei osteopetrotischen Rindern von der „schnellen“ Mutation betroffene Aminosäure Y746 befindet sich in unmittelbarer Nähe einer der beiden Stellen. Dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen Kontakt der CBS2-Domänen beider Untereinheiten sein.

3.4. Physiologische Funktion des *common gatings* der CLC's

Einige humane Mutationen von ClC-1 und ClC-7, die zur Entstehung von Myotonia Congenita bzw. Osteopetrose führen, haben nachweislich Auswirkungen auf das *common gating* dieser CLC's (Pusch, 2002; Ludwig et al., 2013). Die eigentliche Funktion des *common gates* und der zugrundeliegenden dimerischen Natur der CLC's ist noch weitgehend unverstanden. Allgemein akzeptiert ist jedoch die Tatsache, dass beide Untereinheiten der CLC's auch alleine eine funktionelle Einheit darstellen. Diese Erkenntnis stützt sich unter anderem auf Versuche an EcClC-1, die zeigten, dass auch über *crosslinks* kovalent verbundene, in ihrer Bewegung gegeneinander eingeschränkte Untereinheiten normalen Transport zeigen (Nguitragool und Miller, 2007). Weiterhin ist es Robertson et al. (2010) gelungen, EcClC-1-Monomere mit Hilfe von Mutationen der Dimerinteraktionsfläche zu stabilisieren und nachzuweisen, dass diese ebenfalls funktionell sind. Die zweite Untereinheit wird für die Funktion des Dimers also nicht zwingend benötigt. Da *common gating* eine simultane Konformationsänderung beider Untereinheiten darstellt, würde dies bedeuten, dass das *common gating* von EcClC-1 nicht nötig für die Funktion des Transporters ist. Dies würde auf eine eventuelle regulatorische Funktion hindeuten. Allerdings gibt es keine Studien zu *common gating* in EcClC-1, die Existenz eines *common gates* ist also für dieses CLC nicht gesichert. Dennoch wäre eine regulatorische Funktion des *common gatings* gut mit den Erkenntnissen zur Modulation einiger CLC's durch zytosolische Nukleotide wie ATP oder NAD vereinbar. Ein Beispiel hierfür ist die Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit des *common gates* von ClC-1 hin zu positiveren Spannungen in der Präsenz von AMP und ATP (Bennetts et al., 2005). Mit Hilfe von Mutagenesestudien haben Bennetts et al. (2005)

außerdem gezeigt, dass dies über eine Bindung der Nukleotide an die CBS-Domänen von ClC-1 geschieht. Auch NAD hat offenbar einen inhibierenden Effekt auf das *common gate* von ClC-1, wobei die oxidierte Form (NAD^+) stärker als die reduzierte Form (NADH) wirkt (Bennetts et al., 2012). Das *common gating* könnte also eine Art übergeordneten Regulationsmechanismus darstellen, der die Aktivität der CLC's an den metabolischen Zustand der Zelle koppelt. Dabei könnte die Weiterleitung der Information über die Bindung von Nukleotiden an die CBS-Domänen durch die Interaktion mit den Helices D und R geschehen. Diese beherbergen die für den Ionentransport wichtigen Reste des zentralen Serins und das Chlorid-koordinierende Tyrosin. Auf diese Weise würden eventuelle Bewegungen des *common gates* direkt an die Pore weitergeleitet und könnten so auch das *protopore gate* beeinflussen. Im Fall von ClC-7 konnte allerdings kein offensichtlicher Effekt von ATP auf die Ströme festgestellt werden (Leisle et al., 2011). Eigene Versuche mit NAD in oxidierter sowie reduzierter Form blieben ebenfalls ergebnislos.

Weiterhin wurde vor kurzem ein aktivierender Effekt von GlialCAM, einem Zelladhäsionsprotein der Gliazellen, auf ClC-2 publiziert (Jeworutzki et al., 2012). Interessanterweise zeigte sich in Folgestudien, dass GlialCAM auch mit ClC-0, ClC-1 und ClC-Ka interagieren kann und offenbar die Offenwahrscheinlichkeit des *common gates* von ClC-0 und ClC-1 erhöht. Es ist außerdem in der Lage, die Deaktivierung von ClC-Ka/Barttin zu verlangsamen (Jeworutzki et al., 2014). Aufgrund dieser Erkenntnisse scheint es plausibel, dass die Aktivierung von ClC-2 durch GlialCAM ebenfalls auf eine erleichterte Öffnung des *common gates* zurückzuführen ist. Eine direkte Untersuchung des *common gates* von ClC-2 ist schwierig, da *protopore* und *common gating* aufgrund ihrer ähnlichen Zeit- und Spannungsabhängigkeit kaum in Isolation untersucht werden können. Natürlich hat die gezeigte Interaktion von GlialCAM und ClC-0 keinerlei physiologische Funktion, sie zeigt aber, dass prinzipiell auch andere Proteine in der Lage sein können, die Aktivität der CLC's zu regulieren und dass dies über einen Einfluss auf das *common gate* geschehen kann. Ein solcher Mechanismus wäre daher auch für ClC-7 denkbar.

3.5. Was ist die Funktion des Chlorid-koordinierenden Tyrosins in ClC-7?

Laut dem derzeit gebräuchlichen Modell besitzen Ionentransporter, im Gegensatz zu Ionenkanälen, zwei *gates* (Csanády und Mindell, 2008; Gadsby, 2009). Das *gating*-Glutamat stellt das *gate* der CLC-Kanäle und ebenso das äußere *gate* der CLC-Trans-

porter dar. Die molekulare Identität des inneren *gates* der Transporter ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Auf Grundlage der aus der Kristallstruktur ersichtlichen Lage des hochkonservierten Chlorid-koordinierenden Tyrosins wurde vermutet, dass dieser Rest das innere *gate* oder zumindest einen Teil desselben darstellt. Versuche an EcClC-1, die eine Entkopplung von Chlorid- und Protonentransport als Folge von Mutationen dieses Restes zeigten (Accardi et al., 2006; Walden et al., 2007), schienen diese Theorie zu bestätigen. Dabei schien allein die Größe der substituierten Aminosäure über den Grad der Entkopplung zu entscheiden. Ein Austausch durch kleinere Aminosäuren wie Alanin oder Serin führte zu einem fast vollständig entkoppelten Transport, während größere Aminosäuren wie z. B. Phenylalanin in der Lage sind, einen gekoppelten Chlorid/Protonen-Antiport aufrecht zu erhalten (Accardi et al., 2006; Walden et al., 2007). Interessanterweise führt auch die Mutation des zentralen Serins zu einem Glycin zu einer Entkopplung (Jayaram et al., 2008). Zusätzlich zu einer Entkopplung des Transports müsste, falls das Tyrosin tatsächlich das innere *gate* der Transporter darstellt, die Transportrate durch die Entfernung dieses Rests ansteigen. Werden beide *gates* entfernt, so sollte das Resultat ein Ionenkanal mit einer deutlich erhöhten Transportrate sein. Jayaram et al. (2008) haben gezeigt, dass dies für EcClC-1 tatsächlich der Fall ist. In Versuchen mit rekonstituiertem EcClC-1 zeigt die Doppelmutante E148A/Y445A eine, im Vergleich zum Wildtyp mit ≈2000 Cl^-/s, etwa 10-fach erhöhte Transportrate von ca. 20000 Cl^-/s. Anzumerken ist, dass diese immer noch mindestens zwei Größenordnungen kleiner als die für Ionenkanäle typischerweise geltenden Transportraten von 10^6-10^8 Ionen/s ist. Für EcClC-1 scheint demnach wahrscheinlich, dass das innere *gate* vom Chlorid-koordinierenden Tyrosin, eventuell in Verbindung mit dem zentralen Serin, dargestellt wird.

Abgesehen von den Versuchen an EcClC-1 gibt es bis jetzt keine Veröffentlichungen von Studien am Chlorid-koordinierenden Tyrosin anderer CLC-Transporter. Eine Überprüfung dieser Theorie in ClC-7 schien aus diesem Grund sinnvoll, zumal die Bestimmung von Umkehrpotentialen für ClC-7 im Vergleich zu den anderen intrazellulären CLC-Transportern einfach ist. Die eingefügten Mutationen des Chlorid-koordinierenden Tyrosins in ClC-7 zeigten allerdings mehrheitlich weder in Oozyten noch in HeLa-Zellen Ströme, so dass sich alle hier getroffenen Aussagen nur auf die Ergebnisse der Untersuchungen der Alanin und Serin-Mutanten stützen. Die gemessenen Umkehrpotentiale bei verschiedenen extrazellulären Chlorid-Konzentrationen zeigen für beide Mutanten deutlich einen gekoppelten Chlorid/Protonen-Transport. Die Messungen bei verschiedenen pH-Werten zeigen zwar eine deutliche Abweichung vom theoretischen Umkehrpotential eines 2:1 Chlorid/Protonen-Antiporters, diese besteht aber auch bei Messungen

mit dem Wildtyp-Protein und kann auf den Beitrag endogener Ströme zurückgeführt werden. Das Chlorid-koordinierende Tyrosin scheint also nicht das innere *gate* von ClC-7 zu sein. Mutationen desselben zeigen dennoch starke Auswirkungen auf ClC-7. So zeigen die Mutanten eine instantane Öffnung bei allen Spannungen und somit eine weniger starke Rektifizierung. Auch die Aktivierungskinetik erscheint schneller als beim Wildtyp. Unerwarteterweise war das *gating* dieser Mutanten stark vom extrazellulären pH-Wert abhängig. Während bei saurem pH eine dem Wildtyp ähnliche, eher langsame Aktivierung zu beobachten war, zeigten beide Mutanten bei einem basischen pH, ähnlich der *gating*-Glutamat-Mutante, eine instante Aktivierung ohne jede Kinetik.

Eine mögliche Erklärung hierfür ergibt sich beim Blick auf die CLC-Ionenkanäle, in denen dieser Tyrosin-Rest interessanterweise ebenfalls konserviert ist. Dies ist überraschend, da Ionenkanäle kein zweites *gate* besitzen. Die starke Konservierung dieses Rests deutet daher auf eine wichtige, von der Funktion in Transportern verschiedene Funktion in den Kanälen hin. In ClC-0 sind *protopore* und *common gate* nicht unabhängig, sondern aneinander gekoppelt. Mutationen des *gating*-Glutamats zu Alanin oder Aspartat beeinflussen nicht nur das *protopore gate*, sie führen auch zu einer permanenten Öffnung des *common gates* unabhängig von der anliegenden Spannung (Traverso et al., 2006). Mutationen des Chlorid-koordinierenden Tyrosins haben in ClC-0 den gleichen Effekt und erhöhen auch in ClC-1 die Offenwahrscheinlichkeit des *common gates* (Bennetts und Parker, 2013). Weiterhin heben Mutationen des Tyrosins zu hydrophoben oder negativ geladenen Aminosäuren die Sensitivität des *common gates* gegenüber Zn^{2+} auf (Bennetts und Parker, 2013). Bennetts und Parker (2013) vermuteten aufgrund dieser Ergebnisse, dass die Carboxylgruppe des *gating*-Glutamats und die Hydroxylgruppe des Chlorid-koordinierenden Tyrosins bei geschlossenem *common gate* eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen. Wie auch aus der CmClC-Kristallstruktur ersichtlich, kommen sich beide Reste sehr nahe, der Abstand zwischen Carboxyl- und Hydroxylgruppe beträgt nur etwa 2,6 Å und liegt damit im für Wasserstoffbrücken möglichen Bereich. Auch für ClC-7 wäre denkbar, dass das Chlorid-koordinierende Tyrosin wichtig für die Kopplung von *protopore* und *common gate* ist. Ist dies der Fall, so könnte der Effekt der Tyrosin-Mutanten auf das *gating*, speziell die instantane Öffnung und die Ströme bei negativen Spannungen, mit einem nicht funktionellen und somit permanent ganz oder teilweise geöffneten *common gate* erklärt werden. Die pH-Abhängigkeit des *gatings* dieser Mutanten ist hingegen schwieriger zu verstehen. Da mit einem Alanin bzw. Serin keine titrierbaren Reste in das Protein eingefügt wurden, scheint dies ein indirekter Effekt der Mutationen zu sein. Ist die Theorie der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Tyrosin und dem *gating*-Glutamat korrekt,

so würde diese bei Mutation des Tyrosins zu Alanin oder Serin unterbrochen und das *gating*-Glutamat würde seinen Interaktionspartner verlieren. Eventuell ist also die Ursache für das pH-abhängige *gating* der Mutanten der Protonierungszustand des freien *gating*-Glutamats, welcher sich mit dem anliegenden äußeren pH-Wert ändert. Dies ist allerdings rein spekulativ und müsste experimentell überprüft werden.

3.6. Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund der strikt lysosomalen Lokalisation von ClC-7 war es bis vor Kurzem nicht möglich, ClC-7 elektrophysiologisch zu untersuchen. Alle Annahmen über die Funktion dieses Transporters gründeten sich auf die Ergebnisse biochemischer Versuche an isolierten Lysosomen oder auf die strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Vertretern der CLC-Familie. Erst mit der genaueren Untersuchung der endolysosomalen Sortingmotive der intrazellulären CLC's (Stauber und Jentsch, 2010) und der Einführung entsprechender Mutationen gelang die erste elektrophysiologische Charakterisierung von ClC-7 (Leisle et al., 2011). Ziel dieser Arbeit war, das gewonnene Wissen über die biophysikalischen Eigenschaften von ClC-7 zu erweitern, wobei das *gating* von zentralem Interesse war. Begonnen wurde hierfür mit einer elektrophysiologischen Untersuchung von bekannten humanen Mutationen, die mit der Entstehung von Osteopetrose in Verbindung stehen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil dieser Mutationen das *gating* von ClC-7 beschleunigt und dass dieser Effekt das *common gate* betrifft. Bis jetzt war die Existenz eines *common gates* nur für ClC-0, ClC-1 und ClC-2 gesichert. Dass ClC-7 ebenfalls *common gating* zeigt, ist eine neue Erkenntnis dieser Arbeit. Des Weiteren wurde widerlegt, dass das Chlorid-koordinierende Tyrosin - wie bisher anhand von Untersuchungen an EcClC-1 vermutet - das innere *gate* von ClC-7 darstellt. Stattdessen scheint dieser Rest ebenfalls eine wichtige Rolle für das *gating* zu spielen. Diese Arbeit erweitert daher das Wissen über das *gating* der intrazellulären CLC-Transporter, das bis jetzt nicht sehr gut untersucht war und eröffnet neue Ansatzpunkte für die künftige Forschung.

Interessante Fragestellungen wären z. B. der genaue Mechanismus des *common gatings* von ClC-7. Bekannt ist, dass die Transmembran-CBS2-Interaktionsfläche hierfür eine Rolle spielt und offenbar eine Bewegung der CBS-Domänen stattfindet. Allerdings ist noch nicht verstanden, was genau auf molekularer Ebene bei einer Öffnung des *common gates* passiert. Die Untersuchung dieses Prozesses mittels Mutagenese ist schwierig und wenig aussichtsreich, da sehr viele Mutationen das *gating* von ClC-7 beschleunigen und der Erkenntnisgewinn daher gering ist. *Crosslinking*-Versuche an der Transmembran-

CBS2-Interaktionsfläche wären eine Möglichkeit, um genauer zu untersuchen, welche Aminosäuren an der Bewegung, die vermutlich bei der Öffnung des *common gates* geschieht, beteiligt sind.

Auch die physiologische Rolle des *common gatings* von ClC-7 ist noch völlig unklar. Jeworutzki et al. (2012) haben gezeigt, dass GlialCAM die Funktion von ClC-2 modulieren kann und dass dies über eine Beeinflussung des *common gates* geschieht (Jeworutzki et al., 2014). Möglicherweise sind unbekannte Interaktionspartner oder Moleküle in der Lage, auch die Aktivität von ClC-7 über eine Beeinflussung des *common gates* zu regulieren. Es gibt bereits eine Veröffentlichung, die einen optischen Assay zur Messung der Transportaktivität von ClC-7 beschreibt (Zanardi et al., 2013). Auf Grundlage dieses Assays könnte ein gezieltes *screening* nach Interaktionspartnern durchgeführt werden. Eventuell lassen sich auf diese Weise auch Substanzen finden, welche an die CBS-Domänen von ClC-7 binden und - ähnlich wie bei ClC-1 - das *common gate* beeinflussen können. Wird in der Tat die Funktion von ClC-7 auf diese Weise über das *common gate* moduliert, so könnte möglicherweise auch erklärt werden, warum ClC-7 - trotz den Ergebnissen aus den Untersuchungen in heterologer Expression - bei den in Lysosomen herrschenden Bedingungen aktiv sein könnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Chlorid-koordinierende Tyrosin nicht das innere *gate* von ClC-7 ist. Somit stellt sich die Frage nach der Funktion dieses in allen CLC's hochkonservierten Rests. Offenbar spielt dieser ebenfalls eine Rolle für das *gating*, da Mutationen des Tyrosins die Rektifizierung von ClC-7 aufheben.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von Sigma, Roth, Fluka oder Merck mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ verwendet. Restriktionsenzyme wurden von Fermentas oder New England Biolabs (NEB) bezogen, Primer wurden bei MWG geordert. Dulbecco's modified minimal Eagle's medium (DMEM), Fötales Bovines Serum (FBS), Dulbecco's PBS und 100x Penicillin/Streptomycin wurden von Pan Biotech, OPTIMEM und 0.05% Trypsin/EDTA von Invitrogen bezogen.

4.1.2. Lösungen

Alle Lösungen für elektrophysiologische Experimente wurden mit deionisiertem Wasser (Milli-Q, Millipore) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. Gluconsäure eingestellt und die Osmolarität mit dem Gefrierpunktosmometer OSMOMAT 030 (Gonotec) bestimmt. Wenn nötig wurde die Osmolarität durch die Zugabe von Sucrose eingestellt. Die Osmolarität aller Lösungen für Oozyten betrug ca. 200 mOsmol/kg, die Osmolarität der intrazellulären Lösungen für *patch clamp*-Versuche 280-290 mOsmol/kg und der extrazellulären Lösungen 290-300 mOsmol/kg. Alle Lösungen wurden durch eine PES-Membran (0,22 mm, TPP) sterilfiltriert.

4.1.2.1. Lösungen für Oozytenpräparation, -haltung und TEVC-Messungen

Lösung	Zusammensetzung
ORII	82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7,5
ND-96 Oozytenlagerung	96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 50 µg/l Gentamycin, pH 7,5
ND-96 Messlösung	96 mM NaCl, 2 mM K-Glukonat, 1,8 mM Ca-Glukonat, 1 mM Mg-Glukonat, 5 mM HEPES, pH 7,5
ND-96 Nitrat	96 mM $NaNO_3$, 2 mM K-Glukonat, 1,8 mM Ca-Glukonat, 1 mM Mg-Glukonat, 5 mM HEPES, pH 7,5

Tabelle 4.1: Verwendete Lösungen für die Lagerung und die Messungen an Oozyten.

4.1.2.2. Lösungen für *patch clamp*-Messungen

Lösung	Zusammensetzung
intrazelluläre Lösung pH 7,4	110 mM CsCl, 10 mM NaCl, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 40 mM HEPES, pH 7,4
intrazelluläre Lösung pH 6,4	110 mM CsCl, 10 mM NaCl, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 40 mM MES, pH 6,4
intrazelluläre Lösung pH 8,4	110 mM CsCl, 10 mM NaCl, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 40 mM Tris, pH 8,4
extrazelluläre Lösung 139 mM Cl^-	130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,4
extrazelluläre Lösung 39 mM Cl^-	30 mM NaCl, 100 mM NaGlukonat, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,4
extrazelluläre Lösung 19 mM Cl^-	10 mM NaCl, 120 mM NaGlukonat, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,4
extrazelluläre Lösung pH 6,4	130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glucose, 20 mM MES, pH 6,4
extrazelluläre Lösung pH 8,4	130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glucose, 20 mM Tris, pH 8,4

Tabelle 4.2: Verwendete intra- und extrazelluläre Lösungen für *patch clamp*-Versuche.

4.1.2.3. Sonstige Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
DNA Ladepuffer (6x)	40% (w/v) Sucrose, 0,25% (w/v) Orange G
DEPC-Wasser	1% Diethylpyrocarbonat (v/v) in ddH_2O
LB Medium	0,5% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,1% (w/v) Glukose, pH 7
TAE Puffer (50x)	200 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,4
TE-Puffer	20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)
Medium für HeLa-Zellen	DMEM, 5% (v/v) FBS, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin

Tabelle 4.3: Sonstige verwendete Lösungen.

4.1.3. Plasmide

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt. Der Vektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) wurde für die Expression in HeLa-Zellen benutzt, während linearisierte pTLN-Konstrukte (Lorenz et al., 1996) für die RNA-Synthese zur Oozyteninjektion dienten. Mittels des pEGFP-Vektors erfolgte die Expression eines Fusionsproteins aus Ostm1 und GFP, welches die Identifizierung transfizierter Zellen mit Hilfe von UV-Licht (488 nm) am *patch clamp*-Messplatz ermöglichte. Die Vektoren pcDNA3.1(+) und pTLN tragen ein Ampicillin-Resistenzgen, pEGFP N3 ein Kanamycin-Resistenzgen.

Name	Vektor	Insert	Nr.
rClC-7^{PM}	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA	4384
	pTLN		4643
rClC-7^{PM} S202P	pTLN	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, S202P	4651
hClC-7^{PM}	pcDNA3.1(+)	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA	4472
	pTLN		4566
hClC-7^{PM} E314A	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, E314A	4578
mOstm1	pEGFP N3	mOstm1	4278
	pTLN		4669
hClC-7^{PM} D145G	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, D145G	4567
hClC-7^{PM} W179X	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, W179X	4568
hClC-7^{PM} G203D	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, G203D	4569
hClC-7^{PM} L213F	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, L213F	4570
hClC-7^{PM} N214S	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, N214S	4660
hClC-7^{PM} G215R	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, G215R	4571
hClC-7^{PM} G240R	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, G240R	4572
hClC-7^{PM} I261F	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, I261F	4574
hClC-7^{PM} R286Q	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R286Q	4575
hClC-7^{PM} S290F	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, S290F	4576
hClC-7^{PM} V297M	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, V297M	4577
hClC-7^{PM} F318L	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, F318L	4579
hClC-7^{PM} R403Q	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R403Q	4581
hClC-7^{PM} V418M	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, V418M	4582
hClC-7^{PM} L490F	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, L490F	4583
hClC-7^{PM} G521R	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, G521R	4584
hClC-7^{PM} G526W	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, G526W	4585

Name	Vektor	Insert	Nr.
hClC-7^{PM} R561Q	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R561Q	4586
hClC-7^{PM} P619L	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, P619L	4587
hClC-7^{PM} L651P	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, L651P	4605
hClC-7^{PM} G677V	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, G677V	4588
hClC-7^{PM} ΔL688	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, ΔL688	4589
hClC-7^{PM} R712X	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R712X	4590
hClC-7^{PM} S744F	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, S744F	4592
hClC-7^{PM} Y746Q	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, Y746Q	4593
hClC-7^{PM} F758L	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, F758L	4594
hClC-7^{PM} R762L	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R762L	4595
hClC-7^{PM} R762Q	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R762Q	4596
hClC-7^{PM} L766P	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, L766P	4598
hClC-7^{PM} R767P	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R767P	4599
hClC-7^{PM} R767Q	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R767Q	4600
hClC-7^{PM} R767W	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R767W	4601
hClC-7^{PM} A788D	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, A788D	4602
hClC-7^{PM} G796fs	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, G796fs	4603
hClC-7^{PM} E798fs	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, E798fs	4604
hClC-7^{PM} (R286Q, td)*	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, E314A, R286Q	5649
hClC-7^{PM} (R762Q, td)*	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, E314A, R762Q	5650
hClC-7^{PM} (R767Q, td)	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, E314A, R767Q	4641
hClC-7^{PM} R286Q, R762Q*	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R762Q, R767Q	5798
hClC-7^{PM} R286Q, R767Q*	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R286Q, R762Q	5799
hClC-7^{PM} R762Q, R767Q*	pTLN	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R286Q, R767Q	5800
hClC-7^{PM} R762H*	pcDNA3.1(+)	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R762H	5576
hClC-7^{PM} R767H*	pcDNA3.1(+)	hClC-7 LL23/24AA, LL68/69AA, R767H	5577
rClC-7^{PM} Y600A*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600A	5586
rClC-7^{PM} Y600E*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600E	5587
rClC-7^{PM} Y600F*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600F	5593

Name	Vektor	Insert	Nr.
rClC-7^{PM} Y600H*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600H	5588
rClC-7^{PM} Y600K*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600K	5590
rClC-7^{PM} Y600L*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600L	5591
rClC-7^{PM} Y600S*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600S	5589
rClC-7^{PM} Y600W*	pcDNA3.1(+)	rClC-7 LL23/24AA, LL36/37AA, Y600W	5592

Tabelle 4.4: Für TEVC und *patch clamp*-Versuche verwendete Plasmide. rClC-7 steht für das ClC-7 Protein aus *R. norvegicus*, hClC-7 bezeichnet das Homolog aus *H. sapiens* und mOstm1 ist das Ostm1 der Maus (*M. musculus*). Einträge in der Spalte „Nr." beziehen sich auf die Nummer des Eintrags in der internen Plasmid-Datenbank der AG Jentsch. Alle mit * markierten Plasmide wurden im Zuge der Arbeit eigenständig kloniert, mOstm1 im pEGFP-Vektor wurde von Florian Wagner und alle anderen Konstrukte von Tobias Stauber kloniert und bereitgestellt.

4.1.4. Zellen

4.1.4.1. Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA und für Klonierungen wurden die *Escherichia coli*-Stämme XL1-Blue (Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ*Δ*M15 Tn10 (Tet^{r})]*) und ET-10 (Genotyp Δ*(mcrA)183* Δ*(mcrCB-hsdSMRmrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kanr [F' proAB lacIqZ* Δ*M15 Tn10 (Tet^{r})]*) verwendet.

4.1.4.2. Säugerzellen

Für alle *patch clamp*-Versuche wurden HeLa-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), eine aus einem Zervixkarzinom hervorgegangene, humane Zelllinie verwendet.

4.1.4.3. *Xenopus laevis* Oozyten

Für TEVC-Experimente wurden Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (NASCO) in den Entwicklungsstadien V und VI verwendet.

4.1.5. Software

TEVC-Messungen wurden mit dem Programm pCLAMP 9.2 (Axon Instruments) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit Clampfit 10.2 (Axon Instruments). Für *patch*

clamp-Messungen wurde das Programm Patchmaster (HEKA) verwendet und die Aufnahmen mit IGORPro 4.0 (WaveMetrics) ausgewertet. Für Abbildungen und statistische Berechnungen wurden Origin 7.5 (Origin Labs) und GraphPad PRISM 5 (Graphpad Software) verwendet. Kristallstrukturen wurden mit PyMOL 1.3 (DeLano Scientific LLC) analysiert und Abbildungen mit dem gleichen Programm erzeugt. Zum Visualisieren und Manipulieren von DNA-Sequenzen wurde das Lasergene 10 Software-Paket (DNASTAR) verwendet.

4.2. Methoden

4.2.1. Mikrobiologische Standardmethoden

Bakterien wurden auf LB-Platten oder in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Für die Transformation von DNA wurden je ca. 50 µl elektrokompetente *E. coli* verwendet. Diese wurden mit 1 µg des zu transformierenden Plasmids versetzt und mit dem GenePulser (Bio-Rad) und der Einstellung 2,5 kV elektroporiert. Nach ca. 45 min Inkubation bei 37°C in 750 µl antibiotikafreiem LB-Medium wurden 50-100 µl der Suspension auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in 3 ml (Mini) bzw. 100 ml LB-Medium (Midi) über Nacht bei 37°C und 240 rpm als Suspensionskultur herangezogen. Die Präparation von Plasmid-DNA aus diesen Kulturen erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel) für Minikulturen und dem PureLink Kit (Invitrogen) für Midikulturen. Die Ausbeute betrug ca. 5-10 ng bzw. 100-150 µg. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 (PEQLAB). DNA wurde in TE-Puffer oder MilliQ-Wasser bei -20°C gelagert.

4.2.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1. Behandlung und Manipulation von DNA

Restriktionsverdaue von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten mit den entsprechenden Restriktionsenzymen folgten den Angaben der Hersteller. Die Aufreinigung der Produkte erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Agarose-Gele wurden aus UltraPure Agarose (Invitrogen) in TAE Puffer hergestellt. Proben für die Gelelektrophorese wurden mit 6x DNA Ladepuffer oder RNA Ladepuffer (Ambion) versetzt und bei 100-140 mV für ca. 45-60 min aufgetrennt. Die Mutagenese zum Zweck

der Einführung von Punktmutationen erfolgte mit rekombinanter PCR unter Einsatz von Phusion DNA Polymerase (Finnzymes). Die Ligation erfolgte mit T4 DNA Ligase (Invitrogen) und einem Insert:Vektor-Verhältnis von 3:1 bei 17-22℃ für 3-24 h. Nach der Transformation erfolgte die Selektion positiver Klone über einen Restriktionsverdau. Die ORF´s aller neu klonierten Plasmide wurden vor Benutzung sequenziert. DNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop ND-1000 (PEQLAB) überprüft.

4.2.2.2. *In vitro* RNA-Synthese für die Injektion von Oozyten

Zur Synthese von RNA erfolgte zunächst ein Verdau des pTLN-Vektors mit dem Enzym MluI. Die auf diese Weise linearisierte cDNA wurde über ein TAE-Gel mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt. Danach erfolgte die RNA-Synthese mit dem mMessage mMachine SP6 Kit (Ambion) nach den Angaben des Herstellers, wobei die linearisierte cDNA in cRNA transkribiert wurde. Die fertige cRNA wurde in RNase freiem Wasser gelöst, auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und mit Hilfe eines TAE-Gels auf Degradation überprüft. Die Lagerung der cRNA erfolgte bei -20℃.

4.2.3. Zellbiologische Methoden

4.2.3.1. Kultur von HeLa-Zellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte bei 37℃ und 5% CO_2 in einem Inkubator (Heraeus) bis zu einer Konfluenz von ca. 90%. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert und in einer 1:4 bis 1:5 Verdünnung erneut ausgesäht. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well oder 24-Well Platten in einer Konfluenz von ca. 40-50% ausgesäht.

4.2.3.2. Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Die transiente Transfektion von HeLa-Zellen wurde mit FuGENE 6 (Promega) nach den Anweisungen des Herstellers in 6-Well oder 24-Well Platten durchgeführt. Sie erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 50-80% und einem 3:1 Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA-Menge. Es wurden dabei ClC-7 (pcDNA3) und Ostm1-GFP (pEGFP N3) in einem Verhältnis von 10:1 transfiziert um mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erreichen, dass Ostm1-positive Zellen gleichzeitig auch ClC-7 exprimieren. Die *patch-clamp*-Messungen folgten ca. 40-72 h nach der Transfektion.

4.2.3.3. Präparation von *Xenopus laevis* Oozyten

Die Präparation von *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte durch die Isolation von Ovargewebe aus weiblichen *Xenopus laevis*-Fröschen. Zu diesem Zweck wurden diese für 15-20 min in 0,1%-iger Tricainlösung betäubt und danach mit einem Skalpell ein kleiner ventraler Einschnitt vorgenommen. Mit einer Pinzette wurde etwas Ovargwebe entnommen und in ORII-Lösung überführt. Nach vorsichtigem Auseinanderzupfen des Gewebes erfolgte der Verdau mit 2 mg/ml Collagenase Typ II (Roche) zur Vereinzelung der Oozyten. Dieser erfolgte für 1-2 h bei Raumtemperatur, wobei der Fortschritt des Verdaus regelmäßig überprüft und die Lösung gewechselt wurde. Nach Ende des Verdaus wurden die Oozyten in ND-96 überführt und Oozyten der Entwicklungsstadien V und VI manuell mit Hilfe eines Binokulars selektiert.

4.2.3.4. RNA-Mikroinjektion und Haltung von *Xenopus laevis* Oozyten

Soweit nicht anders beschrieben erfolgte die Lagerung der Oozyten immer in ND-96 Lagerlösung. Die Injektion von RNA in die Oozyten erfolgte am Tag ihrer Präparation mittels des Mikroinjektors Nanoliter 2000 (Drummond). Dazu wurden Injektionspipetten aus Glaskapillaren (Drummond) mit einem Pipettenziehgerät (Sutter Instruments, Typ L9P) hergestellt und mit Silikonöl DC 200 (Sigma) befüllt. Es wurden ca. 3 µl einer 1:1 Mischung aus ClC-7-RNA und Ostm1-RNA aufgenommen und in jede Oozyte 46 nl der RNA-Mischung injiziert. Für den Versuch zur Existenz des *common gatings* mussten andere Mischungsverhältnisse verwendet werden, da die für transportdefiziente Untereinheiten kodierende RNA im Überschuss injiziert werden sollte. Die Injektion erfolgte hier nach dem folgenden Schema: WT+Ostm1: 23 ng+23 ng; schnell+Ostm1: 23 ng+23 ng; WT+schnell,td+Ostm1: 7 ng+28 ng+12 ng; schnell+td+Ostm1: 7 ng+ 28 ng+12 ng. Für die Bestimmung der Nitratleitfähigkeiten der S204P/td- und WT/ S204P-Heteromere wurden die gleichen Mischungsverhältnisse verwendet. Injizierte Oozyten wurden in eine 6-Well Platte überführt und bei 17°C für drei Tage inkubiert. Es wurden täglich tote Oozyten entfernt und die ND-96 Lagerlösung gewechselt.

4.2.4. Elektrophysiologie

Um Ionenkanäle und -transporter elektrophysiologisch zu untersuchen existieren zwei Methoden: *Two Electrode Voltage-Clamp* (TEVC) und *patch clamp*. Beide Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit im Spannungsklemm-Modus angewendet. Dies bedeutet, dass die Membranspannung vorgegeben wird und die dafür notwendige Stromstärke an injizierten Ladungsträgern stellt die eigentliche Messgröße dar.

4.2.4.1. *Two Electrode Voltage-Clamp* (TEVC)

Der schematische Aufbau eines TEVC-Messplatzes ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Oozyte befindet sich in einem Bad, welches mit ND-96 Messlösung gefüllt ist und mit Hilfe von zwei Agarbrücken mit zwei kleineren, KCl enthaltenden, Bädern verbunden ist.

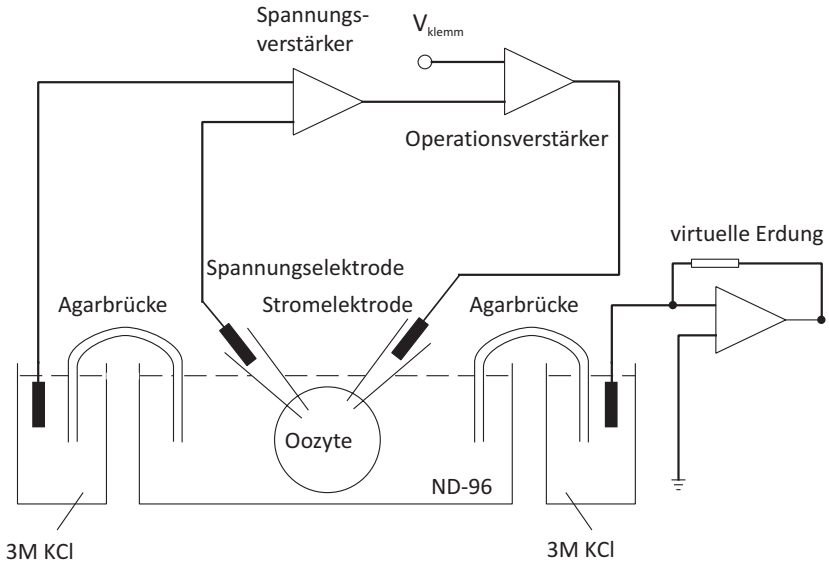


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau eines TEVC-Messplatzes. Aus Dascal (2000), bearbeitet.

Diese dienen dazu, die Referenzelektrode für die Messung der Membranspannung und die Badelektrode, welche für eine virtuelle Erdung des Bades sorgt, aufzunehmen. Sowohl die Spannungs- als auch die Stromelektrode werden durch die Vitellinmembran hindurch in die Oozyte eingeführt, so dass ein geschlossener Stromkreis (Spannungselektrode-Oozytenmembran-Badlösung-Agarbrücke-Referenzelektrode) entsteht, welcher zum Messen der Potentialdifferenz zwischen Innen- und Außenseite der Oozytenmembran dient. Die gemessene Membranspannung wird kontinuierlich mit der vorgegebenen Klemmspannung V_{Klemm} über einen negativ rückgekoppelten Operationsverstärker verglichen. Dieser gibt ein Signal an die Stromelektrode um die entsprechende Menge Ladungsträger in die Oozyte zu injizieren und somit die Membranspannung konstant auf dem Wert von V_{Klemm} zu halten.

Der gemessene Gesamtstrom I_{ges} über eine biologische Membran setzt sich aus einem ionischen Anteil I_i und einem kapazitiven Anteil I_c zusammen:

$$I_{ges} = I_i + I_c \tag{4.1}$$

Der kapazitive Anteil ist proportional zur Kapazität C der Zellmembran und zur Änderung der an der Membran anliegenden Spannung V:

$$I_{ges} = I_i + C \frac{dV}{dt} \tag{4.2}$$

Dieser Zusammenhang erklärt die „Stromspitzen“, die sogenannten kapazitiven Transienten, welche nur bei Spannungsumschwüngen entstehen. Da sich diese Arbeit mit einem sehr langsam öffnenden und schließenden Ionentransporter beschäftigt, gibt es keine Beeinträchtigung der Messungen durch die kapazitiven Transienten und diese konnten vernachlässigt werden. Oozyten besitzen nur einige wenige endogene Ionenkanäle, daher kann davon ausgegangen werden, dass bei genügend hoher Expression der überwiegende Anteil des gemessenen Stroms durch die Expression des von der injizierten RNA kodierten Ionentransporters hervorgerufen wird.

In dieser Arbeit wurden Strom- und Spannungselektrode aus Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg) mit einem horizontalen Pipettenziehgerät Typ L9P (Sutter Instruments) gezogen. Diese wurden etwa zur Hälfte mit 3 M KCl befüllt und in Pipettenhalter eingespannt, wobei ein Kontakt zwischen dem chlorierten Silberdraht des Pipettenhalters und dem KCl hergestellt wurde. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurden die Elektroden in die Badlösung (ND-96 Messlösung) bewegt und in die Nähe der Oozyte gebracht. Zur besseren Visualisierung wurde ein Binokular (Zeiss) verwendet. Zwei Agarbrücken (1% Agarose, 3 M KCl) verbanden das Messbad mit den beiden Referenzbädern, welche mit 3 M KCl gefüllt waren. Die Abtrennung dieser beiden Elektroden vom Messbad vermindert dabei Messartefakte und garantiert stabile Potentiale an Referenz- und Badelektrode auch bei wechselnden Messlösungen. Die Widerstände von Strom- und Spannungselektrode wurden vor der Messung mit dem Verstärker (TurboTEC, NPI Instruments) überprüft, diese sollten im Bereich von 0,5-1 MΩ liegen. Es wurden weiterhin die an den beiden Elektroden anliegenden Potentiale genullt bevor diese vorsichtig in die Oozyte eingeführt wurden. Das Membranpotential der Oozyte konnte nun abgelesen werden, wobei nur Oozyten mit einem Membranpotential zwischen -25 mV und -50 mV weiter verwendet wurden. Es wurde in den Spannungsklemmmodus geschaltet und der Leckstrom überprüft, wobei dessen Betrag nicht größer als 0,003 µA sein sollte. Beide Werte wurden protokolliert und die Messung gestartet. Die Datenakquisition erfolgte mit einem Computer, welcher über das Digidata-1320-Interface (Molecular Devices) mit dem Verstärker verbunden ist, über die pCLAMP 9.2 Software (Axon Instruments). Mit dieser Software wurden auch die Messprotokolle erzeugt. Alle Messungen wurden an mindestens drei unabhängigen Oo-

zytenpräparationen durchgeführt. Gezeigte Einzelmessungen sind repräsentativ für die Gesamtheit aller Messungen, quantitative Auswertungen erfolgen unter Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung oder des Standardfehlers aller Messwerte. Bei Lösungswechsel-Experimenten wurde die gleiche Oozyte zuerst in ND-96 gemessen, danach ca. 2 min mit der zu untersuchenden Lösung perfundiert und nochmals gemessen. Es erfolgte ein Lösungswechsel zurück zu ND-96 und eine erneute Messung. Alle Messungen an Oozyten wurden bei Raumtemperatur (21°C) durchgeführt.

Vorteile der TEVC-Messungen bestehen im Wesentlichen in der einfachen Handhabung der Oozyten und der damit verbundenen Möglichkeit eine große Anzahl von Messungen in relativ kurzer Zeit durchzuführen. Ein großer Nachteil dieser Messungen ist jedoch die fehlende Möglichkeit die intrazellulären Ionenkonzentrationen zu manipulieren. Dies kann im Gegenzug durch die *patch clamp*-Technik realisiert werden, die unter anderem aus diesem Grund zur Anwendung kam.

4.2.4.2. *Patch clamp*

Die *patch-clamp*-Technik geht auf Arbeiten von Erwin Neher und Bert Sakmann zurück und ist der *Two electrode voltage clamp*-Technik sehr ähnlich, da sie ebenfalls auf dem Prinzip der Spannungsklemme basiert. Sie ermöglicht das Messen von Strömen über Zellmembranen von (Säuger-) Kulturzellen, Neuronen aus Gehirnschnitten und einer Vielzahl weiterer Zelltypen oder Organellen. Im Unterschied zur TEVC-Technik erfordert die *patch clamp*-Technik nur eine Elektrode, welche sowohl das Membranpotential misst als auch Ladungen injiziert. Dies ist aufgrund des relativ großen Eingangswiderstandes von Kulturzellen, welcher sich in der Größenordnung von einigen GΩ befindet, möglich.

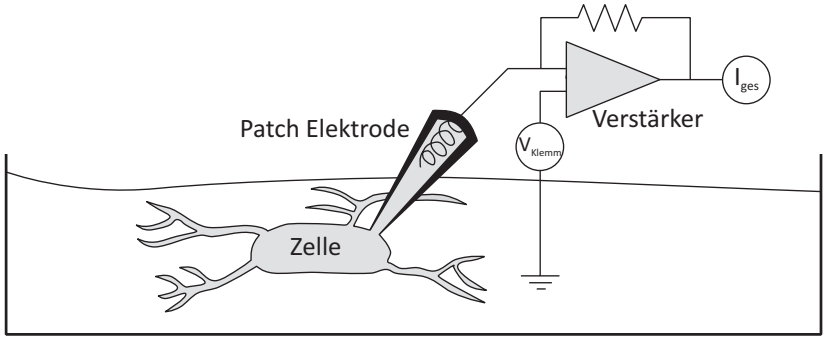


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau eines patch clamp-Messplatzes. Aus Jackson (2001), bearbeitet.

Abbildung 4.2 zeigt eine schematische Darstellung eines *patch clamp*-Messplatzes. Die

Zelle befindet sich in einem Bad, welches mit extrazellulärer Lösung gefüllt ist. Eine Glaselektrode wird auf die Zelle aufgesetzt und ein elektrischer Zugang zur Zelle wird durch eine Ruptur der Zellemembran an dieser Stelle hergestellt. Die Potentialdifferenz zwischen dem Zellinneren und der Badlösung wird kontinuierlich mit der Klemmspannung V_{Klemm} verglichen und bei Abweichung wird eine entsprechende Menge Ladungsträger in die Zelle injiziert, welche die Mesgröße I_{ges} darstellt.

Auf Deckgläschen gezogene Kulturzellen wurden in ein Bad mit der gewünschten extrazellulären Messlösung gelegt. Dieses war an einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) befestigt und Zellen und Messelektrode konnten durch das Mikroskop beobachtet werden. Messelektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Aussendurchmesser 1,5 mm; Wandstärke 0,241 mm, mit Filament) mit Hilfe eines horizontalen Pipettenziehgeräts Typ L9P (Sutter Instruments) gezogen und mit einem List Medical L/M-CPZ-101 Polierer an einem inversen Mikroskop (Zeiss) poliert. Die so gezogenen Glaspipetten wurden mit der intrazellulären Lösung ca. 1-2 cm tief befüllt und in den Elektrodenhalter eingespannt. Mit einem Drucksystem (MPCU-3, Lorenz) wurde ein leichter Überdruck an die Elektrode angelegt und diese ins Bad bewegt. Die Potentialdifferenz zwischen Elektrode und Bad wurde mit Hilfe einer in das Bad eintauchenden Referenzelektrode (chlorierter Silberdraht) gemessen. Für Lösungswechselexperimente wurde zusätzlich eine Agarbrücke verwendet (3 M KCl, 1% Agarose), um das Potential an der Referenzelektrode auch bei wechselnder Chloridionenkonzentration stabil zu halten. Der Widerstand der Elektrode wurde mit einem kurzen Testpuls (5 mV) überprüft und sollte im Bereich von 2-4 MΩ liegen. An der Phasengrenze von intrazellulärer Lösung und Badlösung auftretende *liquid junction*-Potentiale wurden korrigiert. Danach wurde die Elektrode vorsichtig unter optischer Kontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators (SM8, Luigs & Neumann) zur Zelle bewegt und auf diese aufgesetzt. Nun wurde ein Unterdruck angelegt und eine hochohmige Verbindung (Gigaseal) zwischen Elektrode und Zellmembran hergestellt, der sogenannte *cell attached*-Modus. Durch kurze, starke Unterdruckspulse wurde ein Loch in die Plasmamembran gerissen und der *whole cell*-Modus erreicht. Es bestand nun ein elektrischer Zugang zum Zellinneren und das Zytoplasma wurde durch die intrazelluläre Lösung in der Messelektrode dialysiert. Diesem Vorgang wurde etwas Zeit (1-2 min) gelassen um einen vollständigen Austausch des Zytoplasmas zu gewährleisten und die Stabilität des Seals zu beobachten. Es wurde die Kapazität der Zellmembran und der Zugangswiderstand jeder Zelle protokolliert und die Messung gestartet.

4.2.5. Auswertung von elektrophysiologischen Daten

4.2.5.1. Ermittlung von Strom-Spannungs-Kurven

Zur Ermittlung von Strom-Spannungs-Kennlinien aus TEVC-Messungen wurde der Gesamtstrom 1,99 s nach Beginn der Testpulse zwischen -80 mV und 80 mV gegen die Spannung aufgetragen. Da der Wildtyp (und auch einige ClC-7-Mutanten) in dieser Zeit keinen *steady state* erreicht haben, kommen diese Strom-Spannungs-Kennlinien aus einem nicht stationären Zustand. In dieser Arbeit gezeigte Strom-Spannungs-Kurven zeigen Mittelwerte aus mehreren Oozyten unabhängiger Präparationen und gegebenenfalls den Standardfehler.

4.2.5.2. Analyse der Kinetik

Um die Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung zu ermitteln wurde die Stromantwort bei 80 mV $I_{80\ mV}$ monoexponentiell mit einer Funktion der Form

$$I_{80mV}(t) = A\ e^{-t/\tau} + C \tag{4.3}$$

gefittet. A bezeichnet hierbei die Amplitude, τ die Zeitkonstante und C eine additive Konstante. Der zu fittende Bereich wurde so gewählt, dass die kapazitiven Transienten außerhalb dieses Bereiches liegen. Außerdem konnte nicht über die gesamte Zeit (2 s) gefittet werden, da dann ein einfach exponentieller Fit nicht mehr möglich war. Aus diesem Grund wurde für die Aktivierung der Bereich von 25 ms bis 275 ms nach der kapazitiven Transienten, für die Deaktivierung der Bereich von 17 ms bis 267 ms nach der kapazitiven Transienten gefittet. Der Fitbereich der Deaktivierung wurde etwas näher an der kapazitiven Transienten gewählt, da die *tail currents* eine schnellere Kinetik aufweisen und deren Strom somit schneller abfällt.

4.2.5.3. Ermittlung der relativen Nitratleitfähigkeit

Für die Bestimmung der relativen Nitratleitfähigkeit wurde die Stromantwort der Oozyte zuerst in ND-96 gemessen, danach 2 min mit ND-96 Nitrat perfundiert und erneut gemessen. Es erfolgte eine erneute Perfusion und Messung mit ND-96, um den *run down*-Effekt (die Verminderung der Stromamplitude bei mehreren aufeinander folgenden Messungen) in der entsprechenden Oozyte abzuschätzen. Die Stromantwort bei 80 mV in ND-96 Nitrat wurde normiert auf den Mittelwert der Stromantworten bei 80 mV in ND-96 vor und nach der Messung in ND-96 Nitrat. Auf diese Weise konnte dem Einfluss des *run down*-Effekts auf die Messung Rechnung getragen werden. Aus

allen auf diese Weise bestimmten Nitratleitfähigkeiten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und in die erstellten Diagramme eingetragen.

4.2.5.4. Ermittlung der Stöchiometrie des Ionenaustauschs

Die Ermittlung der Stöchiometrie kann bei konstitutiv offenen Ionenkanälen direkt über die Messung der Umkehrpotentiale bei verschiedenen Chlorid- und pH-Gradienten erfolgen. Dazu können Protokolle verwendet werden, in denen die Klemmspannung sich stetig mit einer festgelegten Rate ändert (sogenannte Rampen), das Umkehrpotential kann dann als Nullstelle aus der Rampe abgelesen werden. Im Falle von stark rektifizierenden Kanälen und Transportern verhindert jedoch das ebenfalls spannungsabhängige *gating* die korrekte Bestimmung des Umkehrpotentials über ein Rampenprotokoll. Aus diesem Grund haben Leisle et al. (2011) das Umkehrpotential von ClC-7 über ein Protokoll bestimmt, welches nach Öffnung des Transporters das Umkehrpotential der *tail currents* durch Sprünge zu diskreten Spannungen abschätzt. In dieser Arbeit wurden die Umkehrpotentiale von noch rektifizierenden ClC-7-Mutanten über ein *tail current*-Protokoll abgeschätzt, während für Mutanten ohne *gating* wie z. B. die *gating*-Glutamat-Mutante das Rampenprotokoll verwendet wurde.

Das gemessene Umkehrpotential V_{rev} von ClC-7 ist eine Funktion der inneren und äußeren Chlorid- und Protonenkonzentrationen:

$$V_{rev} = -\frac{R\ T}{(m+n)\ F}\ ln\ \frac{[Cl^-]_a{}^m\ [H^+]_i{}^n}{[Cl^-]_i{}^m\ [H^+]_a{}^n} \tag{4.4}$$

wobei R, T und F die Gaskonstante, Temperatur und Faraday-Konstante, $[Cl^-]_a$ und $[Cl^-]_i$ die Chloridkonzentration außerhalb bzw. innerhalb der Zelle, $[H^+]_a$ und $[H^+]_i$ die Protonenkonzentration außerhalb bzw. innerhalb der Zelle bezeichnen und m:n gibt die Stöchiometrie von transportierten Chloridionen zu Protonen an. Unter Kenntnis von V_{rev}, $[Cl^-]_a$, $[Cl^-]_i$, $[H^+]_a$ und $[H^+]_i$ lässt sich so das Kopplungsverhältnis m:n zwischen Chloridionen und Protonen ermitteln. Alle zur Berechnung verwendeten Umkehrpotentiale wurden außerdem um den Wert des mit JPCalcW von Clampex 9.2 (pClamp 9.2) berechneten *liquid junction*-Potentials unter den gegebenen Bedingungen korrigiert.

Endogene Ströme waren in den Messungen mit verschiedenen extrazellulären Chloridkonzentrationen sehr klein im Vergleich zum ClC-7-Strom und wurden aus diesem Grund veranchlässigt. Für die Korrektur der Umkehrpotentiale des Wildtyps bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten wurde das Umkehrpotential und der Leitwert der endogenen Leitfähigkeiten bestimmt. Die Korrektur, um das reine ClC-7-

Umkehrpotential $V_{rev,ClC-7}$ zu erhalten, erfolgte dann nach folgender Formel:

$$V_{rev,ClC-7} = \frac{V_{rev,ges} - V_{rev,endo} * \gamma_{endo}/\gamma_{ges}}{1 - \gamma_{endo}/\gamma_{ges}} \tag{4.5}$$

wobei $V_{rev,ges}$ das gemessene Gesamtumkehrpotential, $V_{rev,endo}$ das Umkehrpotential der endogenen Leitfähigkeiten, γ_{endo} der Leitwert der endogenen Leitfähigkeiten und γ_{ges} der Leitwert des Gesamtstroms sind.

4.2.6. Erstellung des Homologiemodells mit Hilfe des I-Tasser Servers

Der I-TASSER-Server ist eine vollautomatisierte Plattform zur Erstellung von Homologiemodellen (Zhang, 2008; Roy et al., 2010). Nach Einreichen der Aminosäuresequenz des zu modellierenden Proteins sucht I-TASSER nach einer homologen Sequenz mit bekannter Kristallstruktur, alignt beide Sequenzen und erstellt mehrere Homologiemodelle. Die Ausgabe beinhaltet verschiedene Parameter (u. a. C-Score, RMSD und TM-Score), auf deren Basis sich die Qualität der erstellten Modelle abschätzen lässt. Die beiden aussagekräftigsten Werte sind hierbei C-Score und TM-Score. Anhand des C-Score kann eine generelle Aussage über die Qualität des Modells getroffen werden. Dieser Wert sollte zwischen -5 und 2 liegen, wobei größere Werte für ein Modell mit besserer Qualität sprechen. Der TM-Score ist in diesem Fall ein Maß für die strukturelle Ähnlichkeit zwischen vorhandener Kristallstruktur und Modell und ist im Gegensatz zum RMSD insensitiv gegenüber lokalen Modeling-Fehlern. Ein TM-Score von >0.5 steht für ein Modell mit korrekter Topologie, während ein Wert <0.17 eine zufällige Ähnlichkeit des Modells mit der zur Modellierung benutzten Kristallstruktur signalisiert.

Der Versuch, das gesamte humane ClC-7 zu modellieren, resultierte in Modellen mit schlechten C-Scores und TM-Scores, der Grund hierfür schien im Problem des Servers zu liegen den N-Terminus zu modellieren. Da der N-Terminus von ClC-7 für die hier durchgeführten Studien nicht von Relevanz ist, wurden die ersten 118 Aminosäuren aus der eingereichten Sequenz entfernt. Das in dieser Arbeit gezeigte Homologiemodell beginnt aus diesem Grund bei Aminosäure F119. I-TASSER war von dieser Sequenz ausgehend in der Lage fünf Homologiemodelle zu erstellen, wobei das beste Modell einen C-Score von -0.33 und einen TM-Score von 0.67 ± 0.13 besitzt. Beide Werte bestätigen, dass dieses Modell eine korrekte Topologie aufweist und dessen Qualität zufriedenstellend ist. Im Folgenden wurde nur mit diesem Modell weiter gearbeitet. Die

vier anderen Modelle wurden nicht betrachtet, da deren Scores im Vergleich zu denen des verwendeten Mdells weitaus schlechter waren.

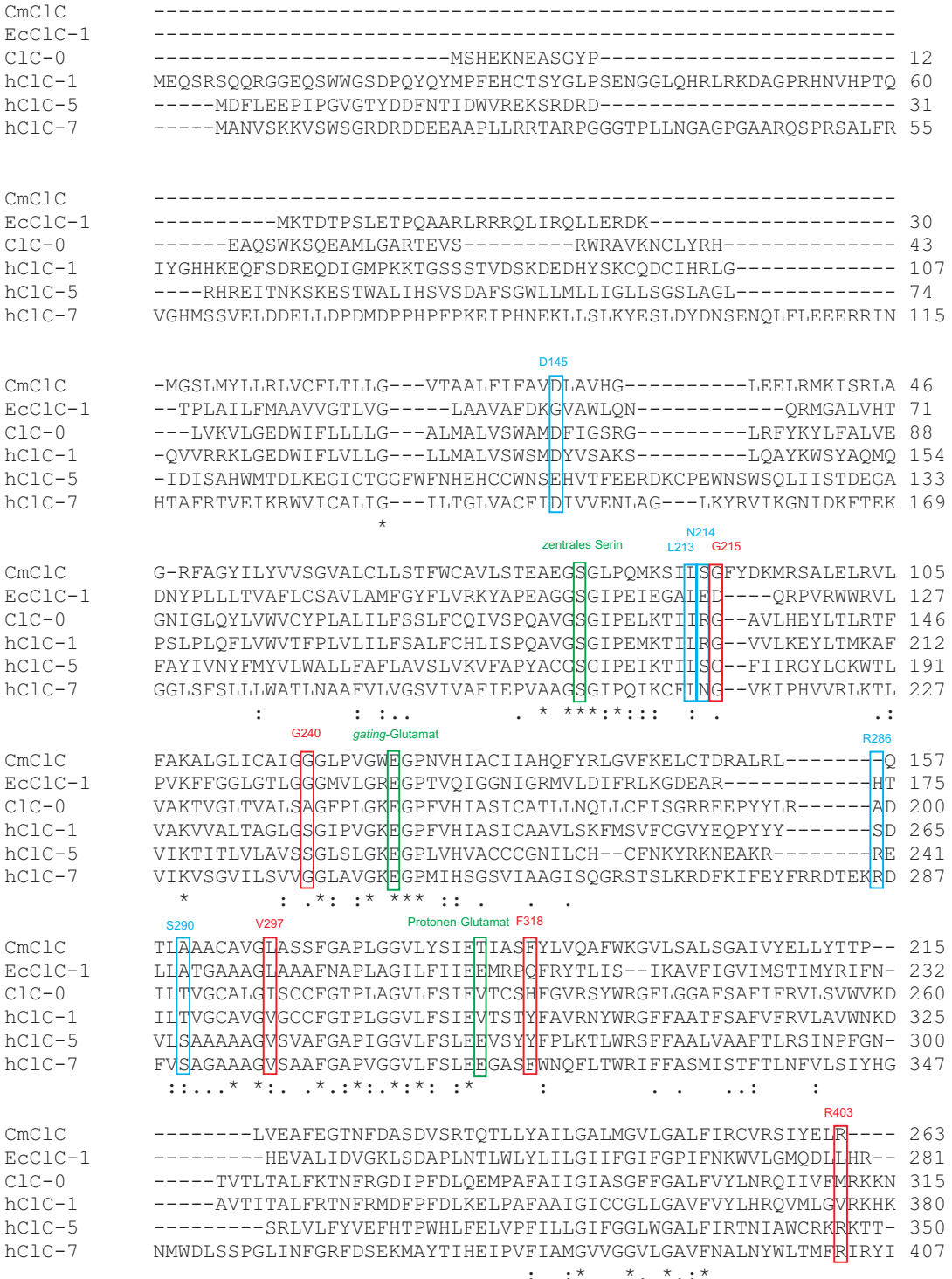
A. Anhang

A.1. Sequenzvergleich zur Erstellung des Homologiemodells

```
hClC-7 119  FRTVEIKRWVICALIGILTGLVACFIDIVVENLAGLKYRVIKGNIDKFTEKGGLS
CmClC  89   LM-YLLRLVCFLTLLGVTAALFIFAVDLAVHGLEELRMKISRLA--------GRF

hClC-7 174  FSLLLWATLNAAFVLVGSVIVAFIEPVAAGSGIPQIKCFLNGVKIPHVVRLKTLV
CmClC  135  AGYILYVVSGVALCLLSTFWCAVLSTEAEGSGLPQMKSILSGFKMRSALELRVLF

hClC-7 229  IKVSGVILSVVGGLAVGKEGPMIHSGSVIAAGISQGRSTSLKRDFKIFEYFRRDT
CmClC  190  AKALGLICAIGGGLPVGWEGPNVHIACIIAHQFYRLGV--------FKELCTDRA

hClC-7 284  EKRDFVSAGAAAGVSAAFGAPVGGVLFSLEEGASFWNQFLTWRIFFASMISTFTL
CmClC  237  LRLQTLAAACAVGLASSFGAPLGGVLYSIETIASFYLVQAFWKGVLSALSGAIVY

hClC-7 339  NFVLSIYHGNMWDLSSPGLINFGRFDSEKMAYTIHEIPVFIAMGVVGGVLGAVFN
CmClC  292  E----------------------------LDVSRTQTLLYAILGALMGVLGALFI

hClC-7 394  ALNYWLTMFRIRYIHRPCLQVIEAVLVAAVTATVAFVLIYSSRDCQPLQGGSMSY
CmClC  319  RCVRSIYELRMRHYPGT-NRYFLVGVVALFASALQY-------------------

hClC-7 449  PLQLFCADGEYNSMAAAFFNTPEKSVVSLFHDPPGSYNPLTLGLFTLVYFFLACW
CmClC  354  -------------------PFPRATINDLFKAVTE------LILMPIIKFILVAL

hClC-7 504  TYGLTVSAGVFIPSLLIGAAWGRLFGISLSYLTGAAIWADPGKYALMGAAAQLGG
CmClC  384  SIGLPLPAGVFVPSFLIGAGFGRLYGELMRVVFGN--AIVPGSYAVVGAAAFTAG

hClC-7 559  IVRMTLSLTVIMMEATSNVTYGFPIMLVLMTAKIVGDVFIEGLYDMHIQLQSVPF
CmClC  437  VTR-ALSCAVIIFEVTGQIRHLVPVLISVLLAVIVGNAFNRSLYETLVLMKHLPY

hClC-7 614  LHWEAPVTSHSLTAREVMSTPVTCLRRREKVGVIVDVLSDTASNHNGFPVVEHAD
CmClC  491  MPILRRDRSPEMTAREIMHPGEPHLFPDSEPQHIKGILEKF-PNRLVFPVID---

hClC-7 669  DTQPARLQGLILRSQLIVLLKHKVFVERSNLGLVQRRLRLKDFRDAYPRFPPIQS
CmClC  542  --ANGYLLGAISRKEIVDRL-----------------------------------

hClC-7 724  IHVSQDERECTMDLSEFMNPSPYTVPQEASLPRVFKLFRALGLRHLVVVDNRNQV
CmClC  560  ----QHVVVPC-------DVSPIVVTSYSLVRQLHFLFVMLMPSMIYVTE-RGKL

hClC-7 779  VGLVTRKDLARYRLGKRGLEELSLAQT
CmClC  604  VGIVEREDVAYGYSN------------
```

Abbildung A.1: Von I-TASSER erstelltes Alignment von hClC-7 und CmClC. Zwischen beiden Proteinen konservierte oder konservativ substituierte Aminosäuren sind fett gedruckt.

A.2. Sequenzvergleich ausgewählter CLC's



```
CmClC       -MRHYPGTNRYFLVGVVALFASALQYP-----FRLFALDPR--ATINDLFK--------- 306
EcClC-1     -VHGGNITKWVLMGGAIGGLCGLLGFVAPATSGGGFNLIPI------------------- 321
ClC-0       FVTKILKKQRLIYPAVVTFVLATLRFPPGVGQFFGAGLMPR--ETINSLFDNYTWTKTI- 372
hClC-1      ALSQFLAKHRLLYPGIVTFVIASFTFPPGMGQFMAGELMPR--EAISTLFDNNTWVKHAG 438
hClC-5      QLGKYPVIEVLVVTAITAILAFPNEYTRMSTSELISELFND--CGLLDSSKLCDYENRFN 408
hClC-7      HRPCLQVIEAVLVAAVTATVAFVLIYSSRDCQPLQGGSMSYPLQLFCADGEYNSMAAAFF 467
                    .   .   .     .     :

                                L490                                                  G521      R526
CmClC       -------AVPLYQTDHF-GWTELILMPIIKFILVALSIGLPLPAGVFVPSFLIGAGFGRL 358
EcClC-1     ------------ATAGNFSMGMLVFIFVARVITTLLCFSSGAPGGIFAPMLALGTVLGTA 369
ClC-0       DPRGLGNSAQWFIPHLN-IFIVMALYFVMHFWMAALAVTMPVPCGAFVPVFNLGAVLGRF 431
hClC-1      DPESLGQSAVWIHPRVN-VVIIIFLFFVMKFWMSIVATTMPIPCGGFMPVFVLGAAFGRL 497
hClC-5      TSKGGELPDRPAGVGVYSAMWQLALTLILKIVITIFTFGMKIPSGLFIPSMAVGAIAGRL 468
hClC-7      NTPEKSVVSLFHDPPGSYNPLTLGLFTLVYFFLACWTYGLTVSAGVFIPSLLIGAAWGRL 527
                             : :  :  .           . * * * : :*:  *

                                                    R561
CmClC       YGELMRVVFGN----------------AIVPGSYAVVGAAAFTAGVTR-ALSCAVIIFEV 401
EcClC-1     FGMVAVELFPQY----------------HLEAGTFAIAGMGALLAASIRAPLTGIILVLEM 414
ClC-0       VGELMALLFPDGLVSNGN-------LYHILPGEYAVIGAAAMTGAVTH-AVSTAVICFEL 483
hClC-1      VGEIMAMLFPDGILFDDI-------IYKILPGGYAVIGAAALTGAVSH-TVSTAVICFEL 549
hClC-5      LGVGMEQLAYYHQEWTVFNSWCSQGADCITPGLYAMVGAAACLGGVTRMTVSLVVIMFEL 528
hClC-7      FGISLSYLTGAAIWAD--------------PGKYALMGAAAQLGGIVRMTLSLTVIMMEA 573
             *     :                        .* :*: * .*  ..     .::  :: :*

                                  Chlorid-koordinierendes Tyrosin      P619
CmClC       TGQIRHLVPVLISVLLAVIVGNAFNR-SLYETLVLMKHLPYMPILRRDRSPEMTAREIMH 460
EcClC-1     TDNYQLILPMIITGLGATLLAQFTGGKPLYSAILAR-TLAKQEAEQLARSKAASASENT- 472
ClC-0       TGQISHVLPMMVAVILANMVAQGLQP-SLYDSIIQIKKLPYLPELSWSSANKYNIQVGDI 542
hClC-1      TGQIAHILPMMVAVILANMVAQSLQP-SLYDSIIQVKKLPYLPDLGWNQLSKYTIFVEDI 608
hClC-5      TGGLEYIVPLMAAAMTSKWVADALGREGIYDAHIRLNGYPFLEAKEEFAHKTLAMDVMKP 588
hClC-7      TSNVTYGFPIMLVLMTAKIVGDVFIE-GLYDMHIQLQSVPFLHWEAPVTSHSLTAREVMS 632
            *.     .*::   : :  :.:      :*.  :     .

                          L651                                  G677
CmClC       PIEG---EPHLFPDSEPQHIKGILEKFPNRLVFPVIDAN-GYLLGAISRKEIVDRLQHVL 516
EcClC-1     ------------------------------------------------------------ 
ClC-0       MVRD---VTSIASTSTYGDLLHVLRQTKLKFFPFVDTPDTNTLLGSIDRTEVEGLLQRRI 599
hClC-1      MVRD---VKFVSASYTYGELRTLLQTTTVKTLPLVDSKDSMILLGSVERSELQALLQRHL 665
hClC-5      RRNDPLLTVLTQDSMTVEDVETIISETTYSGFPVVVSRESQRLVGFVLRRDLIISIENAR 648
hClC-7      TPVTCLRRREKVGVIVDVLSDTASNHNGFPVVEHADDTQPARLQGLILRSQLIVLLKHKV 692


CmClC       ED-----VPEPIAGHRTLVLLDAADLSENIEG-----------LVDETPSGEHSSKG--- 557
EcClC-1     ------------------------------------------------------------
ClC-0       SAYRRQPAAAAEADEEGRNGETGASFTGEAES--------SFAYIDQEDAEGQQREG--- 648
hClC-1      CPERRLRAAQEMARKLSELPYDGARLAGEGPPGAPPGRPESFAFVDEDEDEDLSGKSELP 725
hClC-5      KK------------QDGVVSTSIIYFTEHSPP------------LPPYTPPTLKLRN--- 681
hClC-7      FVER----SNLGLVQRRLRLKDFRDAYPRFPP-------IQSIHVSQDERECTMDLS--- 738


CmClC       ------------------------------------------------------------KRT 560
EcClC-1     ------------------------------------------------------------
ClC-0       -------LEAVKVQTEDPRPPSPVPAEEP------TQTSGIYQ-----------KKQKGT 684
hClC-1      PSLALHPSTTAPLSPEEPNGPLPGHKQQPEAPEPAGQRPSIFQSLLHCLLGRARPTKKKT 785
hClC-5      ------------------------------------------------------------
hClC-7      ------------------------------------------------------------
```

Abbildung A.2: Alignment ausgewählter CLC's. Das Alignment wurde mit ClustalW2 erstellt. Die mit * markierten Aminosäuren sind in allen Sequenzen streng konserviert, mit : markierte Aminosäuren sind konservativ substituiert und mit . markierte Reste sind nur in einigen CLC's konserviert. Wichtige, funktionell bedeutsame Aminosäuren wie das zentrale Serin, das *gating*-Glutamat, das Protonen-Glutamat und das Chlorid-koordinierende Tyrosin sind mit grünen Boxen markiert. Betroffene Aminosäuren untersuchter humaner Mutationen, die zu einem Funktionsverlust führen, sind mit roten Boxen markiert. Betroffene Aminosäuren untersuchter humaner Mutationen, die zu beschleunigtem *gating* führen, sind mit blauen Boxen markiert. Die Namen der Reste beziehen sich dabei immer auf das humane ClC-7. Die mit * markierte Aminosäure Y746 wurde in osteopetrotischen Rindern der Rasse „Weißblaue Belgier" nachgewiesen, aber im Hintergund des humanen ClC-7 untersucht. Gezeigt sind nur die untersuchten *missense*-Mutationen.

Literatur

Accardi, A., S. Lobet, C. Williams, C. Miller, und R. Dutzler (2006). Synergism between halide binding and proton transport in a CLC-type exchanger. *Journal of Molecular Biology 362*(4), 691–9.

Accardi, A. und C. Miller (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl^- channels. *Nature 427*(6977), 803–7.

Accardi, A., M. Walden, W. Nguitragool, H. Jayaram, C. Williams, und C. Miller (2005). Separate ion pathways in a Cl^-/H^+ exchanger. *The Journal of General Physiology 126*(6), 563–70.

Barrantes, F. J. (2004). Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. In *Brain Research Reviews*, Volume 47, pp. 71–95.

Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archeabacteria and the homocytinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences 22*, 12–13.

Bennetts, B. und M. W. Parker (2013). Molecular determinants of common gating of a ClC chloride channel. *Nature Communications 4*, 2507.

Bennetts, B., G. Y. Rychkov, H.-L. Ng, C. J. Morton, D. Stapleton, M. W. Parker, und B. A. Cromer (2005). Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels. *The Journal of Biological Chemistry 280*(37), 32452–8.

Bennetts, B., Y. Yu, T.-Y. Chen, und M. W. Parker (2012). Intracellular β-nicotinamide adenine dinucleotide inhibits the skeletal muscle ClC-1 chloride channel. *The Journal of Biological Chemistry 287*(31), 25808–20.

Bergsdorf, E.-Y., A. A. Zdebik, und T. J. Jentsch (2009). Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters. *The Journal of Biological Chemistry 284*(17), 11184–11193.

Besbas, N., M. Draaken, M. Ludwig, O. Deren, D. Orhan, Y. Bilginer, und F. Ozaltin (2009, December). A novel CLCN7 mutation resulting in a most severe form of autosomal recessive osteopetrosis. *European Journal of Pediatrics 168*(12), 1449–54.

Blair, E., C. Redwood, H. Ashrafian, M. Oliveira, J. Broxholme, B. Kerr, A. Salmon, I. Ostman-Smith, und H. Watkins (2001). Mutations in the γ_2 subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Human Molecular Genetics 10*(11), 1215–20.

Blanz, J., M. Schweizer, M. Auberson, H. Maier, A. Muenscher, C. A. Hübner, und T. J. Jentsch (2007). Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2. *The Journal of Neuroscience 27*(24), 6581–9.

Bösl, M. R., V. Stein, C. Hübner, A. A. Zdebik, S. E. Jordt, A. K. Mukhopadhyay, M. S. Davidoff, A. F. Holstein, und T. J. Jentsch (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl^- channel disruption. *The EMBO Journal 20*(6), 1289–99.

Bowne, S. J., L. S. Sullivan, S. H. Blanton, C. L. Cepko, D. G. Birch, D. Hughbanks-Wheaton, J. R. Heckenlively, und S. P. Daiger (2002). Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics 11*(5), 559–568.

Brandt, S. und T. J. Jentsch (1995). ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Letters 377*, 15–20.

Bykova, E. A., X.-D. Zhang, T.-Y. Chen, und J. Zheng (2006). Large movement in the C terminus of CLC-0 chloride channel during slow gating. *Nature Structural & Molecular Biology 13*(12), 1115–9.

Calcraft, P. J., M. Ruas, Z. Pan, X. Cheng, A. Arredouani, X. Hao, J. Tang, K. Rietdorf, L. Teboul, K.-T. Chuang, P. Lin, R. Xiao, C. Wang, Y. Zhu, Y. Lin, C. N. Wyatt, J. Parrington, J. Ma, A. M. Evans, A. Galione, und M. X. Zhu (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature 459*(7246), 596–600.

Campos-Xavier, A. B., J. M. Saraiva, L. M. Ribeiro, A. Munnich, und V. Cormier-Daire (2003). Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. *Human Genetics 112*, 186–189.

Carr, G., N. Simmons, und J. Sayer (2003). A role for CBS domain 2 in trafficking of chloride channel CLC-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications 310*(2), 600–605.

Chalhoub, N., N. Benachenhou, V. Rajapurohitam, M. Pata, M. Ferron, A. Frattini, A. Villa, und J. Vacher (2003). Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nature Medicine 9*(4), 399–406.

Chen, T.-Y. und C. Miller (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl^- channel. *The Journal of General Physiology 108*(4), 237–50.

Christensen, K. A., J. T. Myers, und J. A. Swanson (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of Cell Science 115*(Pt 3), 599–607.

Cleiren, E., O. Bénichou, E. Van Hul, J. Gram, J. Bollerslev, F. R. Singer, K. Beaverson, A. Aledo, M. P. Whyte, T. Yoneyama, M. C. DeVernejoul, und W. Van Hul (2001). Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the ClCN7 chloride channel gene. *Human Molecular Genetics 10*(25), 2861–7.

Costa, A., P. V. K. Gutla, A. Boccaccio, J. Scholz-Starke, M. Festa, B. Basso, I. Zanardi, M. Pusch, F. L. Schiavo, F. Gambale, und A. Carpaneto (2012). The Arabidopsis central vacuole as an expression system for intracellular transporters: functional characterization of the Cl^-/H^+ exchanger CLC-7. *The Journal of Physiology 590*(Pt 15), 3421–30.

Crowley, J. J., S. N. Treistman, und A. M. Dopico (2003). Cholesterol antagonizes ethanol potentiation of human brain BKCa channels reconstituted into phospholipid bilayers. *Molecular Pharmacology 64*, 365–372.

Csanády, L. und J. A. Mindell (2008). The twain shall meet: channels, transporters and things between. Meeting on Membrane Transport in Flux: the Ambiguous Interface Between Channels and Pumps. In *EMBO Reports*, Volume 9, pp. 960–5.

Dascal, N. (2000). Voltage clamp recordings from Xenopus oocytes. *Current Protocols in Neuroscience*, 6.12.1–6.12.10.

De Angeli, A., D. Monachello, G. Ephritikhine, J. M. Frachisse, S. Thomine, F. Gambale, und H. Barbier-Brygoo (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature 442*(7105), 939–42.

de Santiago, J. A. D., K. Nehrke, und J. Arreola (2005). Quantitative Analysis of the Voltage-dependent Gating of Mouse Parotid ClC-2 Chloride Channel. *The Journal of General Physiology 126*(6), 591–603.

Del Fattore, A., B. Peruzzi, N. Rucci, I. Recchia, A. Cappariello, M. Longo, D. Fortunati, P. Ballanti, M. Iacobini, M. Luciani, R. Devito, R. Pinto, M. Caniglia, E. Lanino, C. Messina, S. Cesaro, C. Letizia, G. Bianchini, H. Fryssira, P. Grabowski, N. Shaw, N. Bishop, D. Hughes, R. P. Kapur, H. K. Datta, A. Taranta, R. Fornari, S. Migliaccio, und A. Teti (2006). Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *Journal of Medical Genetics 43*(4), 315–25.

Depienne, C., M. Bugiani, C. Dupuits, D. Galanaud, V. Touitou, N. Postma, C. van Berkel, E. Polder, E. Tollard, F. Darios, A. Brice, C. E. de Die-Smulders, J. S. Vles, A. Vanderver, G. Uziel, C. Yalcinkaya, S. G. Frints, V. M. Kalscheuer, J. Klooster, M. Kamermans, T. E. M. Abbink, N. I. Wolf, F. Sedel, und M. S. van der Knaap (2013). Brain white matter oedema due to ClC-2 chloride channel deficiency: An observational analytical study. *The Lancet Neurology 12*, 659–668.

Duffield, M. (2003). Involvement of Helices at the Dimer Interface in ClC-1 Common Gating. *The Journal of General Physiology 121*(2), 149–161.

Duncan, E. L., P. Danoy, J. P. Kemp, P. J. Leo, E. McCloskey, G. C. Nicholson, R. Eastell, R. L. Prince, J. A. Eisman, G. Jones, P. N. Sambrook, I. R. Reid, E. M. Dennison, J. Wark, J. B. Richards, A. G. Uitterlinden, T. D. Spector, C. Esapa, R. D. Cox, S. D. M. Brown, R. V. Thakker, K. A. Addison, L. A. Bradbury, J. R. Center, C. Cooper, C. Cremin, K. Estrada, D. Felsenberg, C.-C. Glüer, J. Hadler, M. J. Henry, A. Hofman, M. A. Kotowicz, J. Makovey, S. C. Nguyen, T. V. Nguyen, J. A. Pasco, K. Pryce, D. M. Reid, F. Rivadeneira, C. Roux, K. Stefansson, U. Styrkarsdottir, G. Thorleifsson, R. Tichawangana, D. M. Evans, und M. A. Brown (2011). Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genetics 7*(4), 1–10.

Dutzler, R., E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait, und R. MacKinnon (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 A reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature 415*(6869), 287–94.

Dutzler, R., E. B. Campbell, und R. MacKinnon (2003). Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science 300*(5616), 108–12.

Estévez, R., T. Boettger, V. Stein, R. Birkenhäger, E. Otto, F. Hildebrandt, und T. J. Jentsch (2001). Barttin is a Cl^- channel beta-subunit crucial for renal Cl^- reabsorption and inner ear K^+ secretion. *Nature 414*, 558–561.

Estévez, R., M. Pusch, C. Ferrer-Costa, M. Orozco, und T. J. Jentsch (2004). Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *The Journal of Physiology 557*, 363–378.

Feng, L., E. B. Campbell, Y. Hsiung, und R. MacKinnon (2010). Structure of a Eukaryotic CLC Transporter Defines an Intermediate State in the Transport Cycle. *Science 330*, 635–641.

Fisher, S. E., G. C. M. Biack, S. E. Loyd, E. Hatchwell, O. Wrong, R. V. Thakkeri, und I. W. Craig (1994). Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Human Molecular Genetics 3*(11), 2053–2059.

Fong, P., A. Rehfeldt, und T. J. Jentsch (1998). Determinants of slow gating in ClC-0 , the voltage-gated chloride channel of Torpedo marmorata. *The American Physiological Society 274*(4), 966–973.

Frattini, A., P. J. Orchard, C. Sobacchi, S. Giliani, M. Abinun, J. P. Mattsson, D. J. Keeling, A. Andersson, P. Wallbrandt, L. Zecca, L. D. Notarangelo, P. Vezzoni, und A. Villa (2000). Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nature Genetics 25*(3), 343–6.

Frattini, A., A. Pangrazio, L. Susani, C. Sobacchi, M. Mirolo, M. Abinun, M. Andolina, A. Flanagan, E. M. Horwitz, E. Mihci, L. D. Notarangelo, U. G. O. Ramenghi, A. Teti, J. V. A. N. Hove, D. Vujic, T. Young, A. Albertini, P. J. Orchard, P. Vezzoni, und A. Villa (2003). Chloride Channel CLCN7 Mutations Are Responsible for Severe Recessive, Dominant, and Intermediate Osteopetrosis. *Journal of Bone and Mineral Research 18*(10), 1740–1747.

Friedrich, T., T. Breiderhoff, und T. J. Jentsch (1999). Mutational Analysis Demonstrates That ClC-4 and ClC-5 Directly Mediate Plasma Membrane Currents. *The Journal of Biological Chemistry 274*(2), 896–902.

Gadsby, D. C. (2009). Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nature 10*, 344–352.

Galione, A. und G. C. Churchill (2002). Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium 32*(5-6), 343–54.

Gamper, N. und M. S. Shapiro (2007). Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nature Reviews 8*, 921–934.

Graves, A. R., P. K. Curran, C. L. Smith, und J. A. Mindell (2008). The Cl^-/H^+ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature 453*(7196), 788–792.

Guerrini, M. M., C. Sobacchi, B. Cassani, M. Abinun, S. S. Kilic, A. Pangrazio, D. Moratto, E. Mazzolari, J. Clayton-smith, P. Orchard, F. P. Coxon, M. H. Helfrich, J. C. Crockett, D. Mellis, A. Vellodi, I. Tezcan, L. D. Notarangelo, M. J. Rogers, P. Vezzoni, A. Villa, und A. Frattini (2008). Human Osteoclast-Poor Osteopetrosis with Hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) Mutations. *The American Journal of Human Genetics 83*, 64–76.

Günther, W., N. Piwon, und T. J. Jentsch (2003). The ClC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology 445*, 456–462.

Hanke, W. und C. Miller (1983). Single chloride channels from Torpedo electroplax. Activation by protons. *The Journal of General Physiology 82*(1), 25–45.

Hansen, S. B., X. Tao, und R. MacKinnon (2011). Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K^+ channel Kir2.2. *Nature 477*, 495–498.

Hebeisen, S., A. Biela, B. Giese, G. Müller-Newen, P. Hidalgo, und C. Fahlke (2004). The role of the carboxyl terminus in ClC chloride channel function. *The Journal of Biological Chemistry 279*(13), 13140–7.

Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (Third ed.). Sinauer Associates, Inc.

Hoegg-Beiler, M. B., S. Sirisi, I. J. Orozco, I. Ferrer, S. Hohensee, M. Auberson, K. Gödde, C. Vilches, M. L. de Heredia, V. Nunes, R. Estévez, und T. J. Jentsch (2014). Disrupting MLC1 and GlialCAM and ClC-2 interactions in leukodystrophy entails glial chloride channel dysfunction. *Nature Communications 5*.

Hryciw, D. H. (1998). Relevance of the D13 Region to the Function of the Skeletal Muscle Chloride Channel, ClC-1. *Journal of Biological Chemistry 273*(8), 4304–4307.

Ignoul, S. und J. Eggermont (2005). CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *American Journal of Physiology. Cell physiology 289*(6), C1369–78.

Jackson, M. B. (2001). Whole-cell voltage clamp recording. *Current Protocols in Neuroscience*, 6.6.1–6.6.29.

Jayaram, H., A. Accardi, F. Wu, C. Williams, und C. Miller (2008). Ion permeation through a Cl^--selective channel designed from a CLC Cl^-/H^+ exchanger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*(32), 11194–9.

Jayaram, H., J. L. Robertson, F. Wu, C. Williams, und C. Miller (2010). Structure of a slow CLC Cl^-/H^+ antiporter from a cyanobacterium. *Biochemistry 50*, 788–794.

Jentsch, T. J. (2008). CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 43*(1), 3–36.

Jentsch, T. J., K. Steinmeyer, und G. Schwarz (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. *Nature 348*, 510–514.

Jeworutzki, E., L. Lagostena, X. Elorza-Vidal, T. López-Hernández, R. Estévez, und M. Pusch (2014). GlialCAM, a CLC-2 Cl^- Channel Subunit, Activates the Slow Gate of CLC Chloride Channels. *Biophysical Journal 107*(5), 1105–16.

Jeworutzki, E., T. López-Hernández, X. Capdevila-Nortes, S. Sirisi, L. Bengtsson, M. Montolio, G. Zifarelli, T. Arnedo, C. S. Müller, U. Schulte, V. Nunes, A. Martínez, T. J. Jentsch, X. Gasull, M. Pusch, und R. Estévez (2012). GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a ClC-2 Cl^- channel auxiliary subunit. *Neuron 73*(5), 951–61.

Kasper, D., R. Planells-Cases, J. C. Fuhrmann, O. Scheel, O. Zeitz, K. Ruether, A. Schmitt, M. Poet, R. Steinfeld, M. Schweizer, U. Kornak, und T. J. Jentsch (2005). Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *The EMBO Journal 24*(5), 1079–1091.

Kennan, A., A. Aherne, A. Palfi, M. Humphries, A. McKee, A. Stitt, D. A. C. Simpson, K. Demtroder, T. Orntoft, C. Ayuso, P. F. Kenna, G. J. Farrar, und P. Humphries (2002). Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and $Rho^{-/-}$ mice. *Human Molecular Genetics 11*(5), 547–57.

Koch, M. C., K. Steinmeyer, C. Lorenz, K. Ricker, F. Wolf, M. Otto, B. Zoll, F. Lehmann-Horn, K.-H. Grzeschik, und T. J. Jentsch (1992). The Skeletal Muscle Chloride Channel in Dominant and Recessive Human Myotonia. *Science 257*, 797–800.

Koivusalo, M., B. E. Steinberg, D. Mason, und S. Grinstein (2011). In situ measurement of the electrical potential across the lysosomal membrane using FRET. *Traffic 12*(8), 972–82.

Kornak, U., D. Kasper, M. R. Bösl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, und T. J. Jentsch (2001). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell 104*(2), 205–215.

Kornak, U., A. Ostertag, S. Branger, O. Benichou, und M.-C. de Vernejoul (2005). Polymorphisms in the CLCN7 gene modulate bone density in postmenopausal women and in patients with autosomal dominant osteopetrosis type II. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 91*(3), 995–1000.

Kornak, U., A. Schulz, W. Friedrich, S. Uhlhaas, B. Kremens, T. Voit, C. Hasan, U. Bode, T. J. Jentsch, und C. Kubisch (2000). Mutations in the a3 subunit of the vacuolar H^+-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Human Molecular Genetics 9*(13), 2059–63.

Lam, C.-W., S.-F. Tong, K. Wong, Y. F. Luo, H.-Y. Tang, S.-Y. Ha, und M. H.-M. Chan (2007). DNA-based diagnosis of malignant osteopetrosis by whole-genome scan using a single-nucleotide polymorphism microarray: standardization of molecular investigations of genetic diseases due to consanguinity. *Journal of Human Genetics 52*(1), 98–101.

Lange, P. F., L. Wartosch, T. J. Jentsch, und J. C. Fuhrmann (2006). ClC-7 requires Ostm1 as a β-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature 440*(7081), 220–223.

Leisle, L., C. F. Ludwig, F. A. Wagner, T. J. Jentsch, und T. Stauber (2011). ClC-7 is a slowly voltage-gated $2Cl^-/1H^+$-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *The EMBO Journal 30*(11), 2140–52.

Letizia, C., A. Taranta, S. Migliaccio, C. Caliumi, D. Diacinti, E. Delfini, E. D'Erasmo, M. Iacobini, M. Roggini, O. M. E. Albagha, S. H. Ralston, und A. Teti (2003). Type II benign osteopetrosis (Albers-Schönberg disease) caused by a novel mutation in CLCN7 presenting with unusual clinical manifestations. *Calcified Tissue International 74*(1), 42–6.

Levitan, I., D. K. Singh, und A. Rosenhouse-Dantsker (2014). Cholesterol binding to ion channels. *Frontiers in Physiology 5*.

Li, X., K. Shimada, L. A. Showalter, und S. A. Weinman (2000). Biophysical Properties of ClC-3 Differentiate It from Swelling- activated Chloride Channels in Chinese Hamster Ovary-K1 Cells. *Journal of Biological Chemistry 275*(46), 35994–35998.

Lin, Y.-W., C.-W. Lin, und T.-Y. Chen (1999). Elimination of the Slow Gating of ClC-0 Chloride Channel by a Point Mutation. *The Journal of General Physiology 114*, 1–12.

Lísal, J. und M. C. Maduke (2008). The ClC-0 chloride channel is a 'broken' Cl^-/H^+ antiporter. *Nature Structural & Molecular Biology 15*(8), 805–10.

Lloyd, S. E., S. H. Pearce, S. E. Fisher, K. Steinmeyer, B. Schwappach, S. J. Scheinman, B. Harding, A. Bolino, M. Devoto, P. Goodyer, S. P. Rigden, O. Wrong, T. J. Jentsch, I. W. Craig, und R. V. Thakker (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature 379*, 445–449.

Lloyd, S. E., S. H. Pearce, W. Günther, H. Kawaguchi, T. Igarashi, T. J. Jentsch, und R. V. Thakker (1997). Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5). *The Journal of Clinical Investigation 99*, 967–974.

Lobet, S. und R. Dutzler (2006). Ion-binding properties of the ClC chloride selectivity filter. *The EMBO Journal 25*(1), 24–33.

Lorenz, C., M. Pusch, und T. J. Jentsch (1996). Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93*(23), 13362–6.

Ludewig, U., T. J. Jentsch, und M. Pusch (1997). Analysis of a protein region involved in permeation and gating of the voltage-gated Torpedo chloride channel ClC-0. *The Journal of Physiology 498 (Pt 3*, 691–702.

Ludewig, U., M. Pusch, und T. J. Jentsch (1996). Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature 383*, 340–343.

Ludwig, C. F., F. Ullrich, L. Leisle, T. Stauber, und T. J. Jentsch (2013). Common Gating of Both CLC Transporter Subunits Underlies Voltage-dependent Activation of the $2Cl^-/1H^+$ Exchanger ClC-7/Ostm1. *The Journal of Biological Chemistry 288*(40), 28611–28619.

Ma, L., G. Y. Rychkov, E. A. Bykova, J. Zheng, und A. H. Bretag (2011). Movement of hClC-1 C-termini during common gating and limits on their cytoplasmic location. *The Biochemical Journal 436*(2), 415–28.

Maduke, M. C., C. Williams, und C. Miller (1998). Formation of CLC-0 chloride channels from separated transmembrane and cytoplasmic domains. *Biochemistry 37*, 1315–1321.

Maranda, B., G. Chabot, J.-C. Décarie, M. Pata, B. Azeddine, A. Moreau, und J. Vacher (2007). Clinical and Cellular Manifestations of OSTM1-related Infantile Osteopetrosis. *Journal of Bone and Mineral Research 23*(2), 296–300.

Matsumura, Y., S. Uchida, Y. Kondo, H. Miyazaki, S. B. Ko, A. Hayama, T. Morimoto, W. Liu, M. Arisawa, S. Sasaki, und F. Marumo (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nature Genetics 21*, 95–98.

Meyer, S., S. Savaresi, I. C. Forster, und R. Dutzler (2006). Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter ClC-5. *Nature Structural & Molecular Biology 14*(1), 60–7.

Middleton, R. E., D. J. Pheasant, und C. Miller (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature 383*, 337–340.

Milan, D., J. Jeon, C. Looft, V. Amarger, A. Robic, M. Thelander, C. Rogel-Gaillard, S. Paul, N. Iannuccelli, L. Rask, H. Ronne, K. Lundström, N. Reinsch, J. Gellin, E. Kalm, P. Le Roy, P. Chardon, und L. Andersson (2000). A Mutation in PRKAG3 Associated with Excess Glycogen Content in Pig Skeletal Muscle. *Science 288*(5469), 1248–1251.

Miller, C. (1982). Open-State Substructure of Single Chloride Channels from Torpedo Electroplax. *Philosophical Transactions of the Royal Society B 299*(1097), 401–411.

Miller, C. (2006). ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature 440*, 484–489.

Morimoto, T., S. Uchida, H. Sakamoto, Y. Kondo, H. Hanamizu, M. Fukui, Y. Tomino, N. Nagano, S. Sasaki, und F. Marumo (1998). Mutations with Low in CLCN5 Molecular Weight Channel Proteinuria in Japanese Patients with Low Molecular Weight Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology 9*, 811–818.

Neagoe, I., T. Stauber, P. Fidzinski, E.-Y. Bergsdorf, und T. J. Jentsch (2010). The late endosomal ClC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *The Journal of Biological Chemistry 285*(28), 21689–21697.

Nguitragool, W. und C. Miller (2007). CLC Cl^-/H^+ transporters constrained by covalent cross-linking. *Proceedings of the National Academy of Sciences 104*(52), 20659–20665.

Niemeyer, M. I., L. P. Cid, L. Zúñiga, M. Catalán, und F. V. Sepúlveda (2003). A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the ClC-2 chloride channel. *The Journal of Physiology 553*(Pt 3), 873–9.

Niemeyer, M. I., Y. R. Yusef, I. Cornejo, C. A. Flores, F. V. Sepúlveda, und L. P. Cid (2004). Functional evaluation of human ClC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies. *Physiological Genomics 19*(1), 74–83.

Novarino, G., S. Weinert, G. Rickheit, und T. J. Jentsch (2010). Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science 328*(5984), 1398–401.

Pangrazio, A., P. L. Poliani, A. Megarbane, G. Lefranc, E. Lanino, M. D. Rocco, F. Rucci, F. Lucchini, M. Ravanini, F. Facchetti, M. Abinun, P. Vezzoni, und A. Villa (2006). Mutations in OSTM1 (Grey Lethal) Define a Particularly Severe Form of Autosomal Recessive Osteopetrosis With Neural Involvement. *Journal of Bone and Mineral Research 21*(7), 1098–1105.

Pangrazio, A., M. Pusch, E. Caldana, A. Frattini, E. Lanino, P. M. Tamhankar, S. Phadke, A. G. M. Lopez, P. Orchard, E. Mihci, M. Abinun, M. Wright, K. Vettenranta, I. Bariae, D. Melis, I. Tezcan, C. Baumann, F. Locatelli, M. Zecca, E. Horwitz, L. S. B. Mansour,

M. Van Roij, P. Vezzoni, A. Villa, und C. Sobacchi (2010). Molecular and clinical heterogeneity in CLCN7-dependent osteopetrosis: report of 20 novel mutations. *Human Mutation 31*(1), E1071–80.

Pettersson, U., O. M. E. Albagha, M. Mirolo, A. Taranta, A. Frattini, F. E. A. McGuigan, P. Vezzoni, A. Teti, W. van Hul, D. M. Reid, A. Villa, und S. H. Ralston (2005). Polymorphisms of the CLCN7 gene are associated with BMD in women. *Journal of Bone and Mineral Research 20*(11), 1960–7.

Phadke, S. R., B. Fischer, N. Gupta, P. Ranganath, M. Kabra, und U. Kornak (2010). Novel mutations in Indian patients with autosomal recessive infantile malignant osteopetrosis. *The Indian Journal of Medical Research 131*(April), 508–14.

Phillips, S., A. E. Brammer, L. Rodriguez, H.-H. Lim, A. Stary-Weinzinger, und K. Matulef (2012). Surprises from an Unusual CLC Homolog. *Biophysical Journal 103*, L44–L46.

Picazo-Juárez, G., S. Romero-Suárez, A. Nieto-Posadas, I. Llorente, A. Jara-Oseguera, M. Briggs, T. J. McIntosh, S. A. Simon, E. Ladrón-de Guevara, L. D. Islas, und T. Rosenbaum (2011). Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *The Journal of Biological Chemistry 286*(28), 24966–76.

Picollo, A., M. Malvezzi, J. C. D. Houtman, und A. Accardi (2009). Basis of substrate binding and conservation of selectivity in the CLC family of channels and transporters. *Nature Structural & Molecular Biology 16*(12), 1294–301.

Picollo, A. und M. Pusch (2005). Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature 436*(7049), 420–423.

Ponting, C. P. (1997). CBS domains in CIC chloride channels implicated in myotonia and nephrolithiasis (kidney stones). *Journal of Molecular Medicine 75*, 160–163.

Pusch, M. (2002). Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1. *Human Mutation 19*(4), 423–34.

Pusch, M., S. E. Jordt, V. Stein, und T. J. Jentsch (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *The Journal of Physiology 515 (Pt 2*, 341–53.

Pusch, M., U. Ludewig, und T. J. Jentsch (1997). Temperature dependence of fast and slow gating relaxations of ClC-0 chloride channels. *The Journal of General Physiology 109*(1), 105–16.

Pusch, M., U. Ludewig, A. Rehfeldt, und T. J. Jentsch (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature 373*, 527–530.

Pusch, M., K. Steinmeyer, und T. J. Jentsch (1994). Low Single Channel Conductance of the Major Skeletal Muscle Chloride Channel, ClC-1. *Biophysical Journal 66*(January), 149–152.

Quarello, P., M. Forni, L. Barberis, C. Defilippi, M. F. Campagnoli, L. Silvestro, A. Frattini, N. Chalhoub, J. Vacher, und U. Ramenghi (2004). Severe malignant osteopetrosis caused by a GL gene mutation. *Journal of Bone and Mineral Research 19*(7), 1194–9.

Ramírez, A., J. Faupel, I. Goebel, A. Stiller, S. Beyer, C. Stöckle, C. Hasan, U. Bode, U. Kornak, und C. Kubisch (2004). Identification of a novel mutation in the coding region of the grey-lethal gene OSTM1 in human malignant infantile osteopetrosis. *Human Mutation 23*(5), 471–6.

Rinke, I., J. Artmann, und V. Stein (2010). ClC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *The Journal of Neuroscience 30*(13), 4776–86.

Robertson, J. L., L. Kolmakova-Partensky, und C. Miller (2010). Design, function and structure of a monomeric ClC transporter. *Nature 468*(7325), 844–7.

Romanenko, V. G., Y. Fang, F. Byfield, A. J. Travis, C. A. Vandenberg, G. H. Rothblat, und I. Levitan (2004). Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophysical Journal 87*, 3850–3861.

Roy, A., A. Kucukural, und Y. Zhang (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols 5*(4), 725–38.

Rychkov, G. Y., M. Pusch, D. S. Astill, M. L. Roberts, T. J. Jentsch, und A. H. Bretag (1996). Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *The Journal of Physiology 497*, 423–35.

Sartelet, A., T. Stauber, W. Coppieters, C. F. Ludwig, C. Fasquelle, T. Druet, Z. Zhang, N. Ahariz, N. Cambisano, T. J. Jentsch, und C. Charlier (2013). A missense mutation accelerating the gating of the lysosomal Cl^-/H^+-exchanger ClC-7/Ostm1 causes osteopetrosis with gingival hamartomas in cattle. *Disease Models & Mechanisms 7*(1), 119–128.

Saviane, C., F. Conti, und M. Pusch (1999). The muscle chloride channel ClC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *The Journal of General Physiology 113*(3), 457–68.

Scheel, O., A. A. Zdebik, S. Lourdel, und T. J. Jentsch (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature 436*(7049), 424–427.

Schmidt-Rose, T. und T. J. Jentsch (1997). Reconstitution of Functional Voltage-gated Chloride Channels from Complementary Fragments of CLC-1. *Journal of Biological Chemistry 272*(33), 20515–20521.

Schulz, P., J. Werner, T. Stauber, K. Henriksen, und K. Fendler (2010). The G215R mutation in the Cl^-/H^+-antiporter ClC-7 found in ADO II osteopetrosis does not abolish function but causes a severe trafficking defect. *PloS one 5*(9), e12585.

Scott, J. W., S. A. Hawley, K. A. Green, M. Anis, G. Stewart, G. A. Scullion, D. G. Norman, und D. G. Hardie (2004). CBS domains form energy- sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *Journal of Clinical Investigation 113*(2), 274–284.

Shan, X. und W. D. Kruger (1998). Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nature 19*, 91–93.

Simon, D. B., R. S. Bindra, T. A. Mansfield, C. Nelson-Williams, E. Mendonca, R. Stone, S. Schurman, A. Nayir, H. Alpay, A. Bakkaloglu, J. Rodriguez-Soriano, J. M. Morales, S. A. Sanjad, C. M. Taylor, D. Pilz, A. Brem, H. Trachtman, W. Griswold, G. A. Richard, E. John, und R. P. Lifton (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics 17*, 171–178.

Sobacchi, C., A. Frattini, M. M. Guerrini, M. Abinun, A. Pangrazio, L. Susani, R. Bredius, G. Mancini, A. Cant, N. Bishop, P. Grabowski, A. Del Fattore, C. Messina, G. Errigo, F. P. Coxon, D. I. Scott, A. Teti, M. J. Rogers, P. Vezzoni, A. Villa, und M. H. Helfrich (2007). Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nature Genetics 39*(8), 960–2.

Sobacchi, C., A. Frattini, P. Orchard, O. Porras, I. Tezcan, M. Andolina, R. Babul-Hirji, I. Baric, N. Canham, D. Chitayat, S. Dupuis-Girod, I. Ellis, A. Etzioni, A. Fasth, A. Fisher, B. Gerritsen, V. Gulino, E. Horwitz, V. Klamroth, E. Lanino, M. Mirolo, A. Musio, G. Matthijs, S. Nonomaya, L. D. Notarangelo, H. D. Ochs, A. Superti Furga, J. Valiaho, J. L. van Hove, M. Vihinen, D. Vujic, P. Vezzoni, und A. Villa (2001). The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Human Molecular Genetics 10*(17), 1767–73.

Souraty, N., P. Noun, C. Djambas-Khayat, E. Chouery, A. Pangrazio, A. Villa, G. Lefranc, A. Frattini, und A. Mégarbané (2007). Molecular study of six families originating from the Middle-East and presenting with autosomal recessive osteopetrosis. *European Journal of Medical Genetics 50*, 188–199.

Staley, K., R. Smith, J. Schaack, C. Wilcox, und T. J. Jentsch (1996). Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron 17*, 543–551.

Stauber, T. und T. J. Jentsch (2010). Sorting motifs of the endosomal/lysosomal CLC chloride transporters. *The Journal of Biological Chemistry 285*(45), 34537–34548.

Steinmeyer, K., C. Ortland, und T. J. Jentsch (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature 354*, 301–304.

Steward, C. G. (2003). Neurological aspects of osteopetrosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology 29*(2), 87–97.

Suh, B.-C. und B. Hille (2008). PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annual Review of Biophysics 37*, 175–195.

Suzuki, T., T. Rai, A. Hayama, E. Sohara, S. Suda, T. Itoh, S. Sasaki, und S. Uchida (2006). Intracellular localization of ClC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *Journal of Cellular Physiology 206*(3), 792–8.

Thiemann, A., S. Gründer, M. Pusch, und T. J. Jentsch (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature 356*, 57–60.

Traverso, S., G. Zifarelli, R. Aiello, und M. Pusch (2006). Proton sensing of CLC-0 mutant E166D. *The Journal of General Physiology 127*(1), 51–65.

Tsien, R. Y., T. Pozzan, und T. J. Rink (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *The Journal of Cell Biology 94*(2), 325–34.

Waguespack, S. G., S. L. Hui, L. A. Dimeglio, und M. J. Econs (2007). Autosomal dominant osteopetrosis: clinical severity and natural history of 94 subjects with a chloride channel 7 gene mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 92*(3), 771–8.

Waguespack, S. G., D. L. Koller, K. E. White, T. Fishburn, G. Carn, K. A. Buckwalter, M. Johnson, M. Kocisko, W. E. Evans, T. Foroud, und M. J. Econs (2003). Chloride channel 7 (ClCN7) gene mutations and autosomal dominant osteopetrosis, type II. *Journal of Bone and Mineral Research 18*(8), 1513–8.

Walden, M., A. Accardi, F. Wu, C. Xu, C. Williams, und C. Miller (2007). Uncoupling and turnover in a Cl^-/H^+ exchange transporter. *The Journal of General Physiology 129*(4), 317–29.

Wang, C., H. Zhang, J.-W. He, J.-M. Gu, W.-W. Hu, Y.-Q. Hu, M. Li, Y.-J. Liu, W.-Z. Fu, H. Yue, Y.-H. Ke, und Z.-L. Zhang (2012). The virulence gene and clinical phenotypes of osteopetrosis in the Chinese population: six novel mutations of the CLCN7 gene in twelve osteopetrosis families. *Journal of Bone and Mineral Metabolism 30*(3), 338–48.

Wang, X., X. Zhang, X. Dong, M. Samie, X. Li, X. Cheng, A. Goschka, D. Shen, Y. Zhou, J. Harlow, M. X. Zhu, D. E. Clapham, R. D, und H. Xu (2012). TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell 151*(2), 372–383.

Wartosch, L., J. C. Fuhrmann, M. Schweizer, T. Stauber, und T. J. Jentsch (2009). Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein ClC-7. *The FASEB Journal 23*(12), 4056–68.

Weinert, S., S. Jabs, S. Hohensee, W. L. Chan, U. Kornak, und T. J. Jentsch (2014, May). Transport activity and presence of ClC-7/Ostm1 complex account for different cellular functions. *EMBO Reports*, 1–8.

Weinert, S., S. Jabs, C. Supanchart, M. Schweizer, N. Gimber, M. Richter, J. Rademann, T. Stauber, U. Kornak, und T. J. Jentsch (2010). Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H^+-driven lysosomal Cl^- accumulation. *Science 328*(5984), 1401–3.

Weinreich, F. und T. J. Jentsch (2001). Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *The Journal of Biological Chemistry 276*(4), 2347–53.

White, M. M. und C. Miller (1979). A voltage-gated anion channel from the electric organ of Torpedo californica. *The Journal of Biological Chemistry 254*, 10161–10166.

Whorton, M. R. und R. MacKinnon (2011). Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K^+ Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP2, and Sodium. *Cell 147*, 199–208.

Wollnik, B., C. Kubisch, K. Steinmeyer, und M. Pusch (1997). Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel CIC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. *Human Molecular Genetics 6*(5), 805–11.

Wu, F., P. Roche, P. T. Christie, N. Y. Loh, A. A. C. Reed, R. M. Esnouf, und R. V. Thakker (2003). Modeling study of human renal chloride channel (hCLC-5) mutations suggests a structural-functional relationship. *Kidney International 63*(4), 1426–32.

Zanardi, I., G. Zifarelli, und M. Pusch (2013). An optical assay of the transport activity of ClC-7. *Scientific Reports 3*, 1231.

Zdebik, A. A., G. Zifarelli, E.-Y. Bergsdorf, P. Soliani, O. Scheel, T. J. Jentsch, und M. Pusch (2008). Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *The Journal of Biological Chemistry 283*(7), 4219–27.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics 9*, 40.

Zhang, Z.-L., J.-W. He, H. Zhang, W.-W. Hu, W.-Z. Fu, J.-M. Gu, J.-B. Yu, G. Gao, Y.-Q. Hu, M. Li, und Y.-J. Liu (2009). Identification of the CLCN7 gene mutations in two Chinese families with autosomal dominant osteopetrosis (type II). *Journal of Bone and Mineral Metabolism 27*(4), 444–51.

Zifarelli, G. und M. Pusch (2009). Conversion of the $2Cl^-/1H^+$ antiporter ClC-5 in a NO_3^-/H^+ antiporter by a single point mutation. *The EMBO Journal 28*(3), 175–82.

Abbildungsverzeichnis

1.1. Die Familie der CLC-Proteine 5
1.2. Molekularer Aufbau der CLC-Proteine 6
1.3. Cl^-- und H^+-Transportwege 7
1.4. Wichtige Aminosäuren der Pore 8
1.5. Ionenkanäle und -transporter besitzen eine verschiedene Anzahl an *gates* 10
1.6. CLC Ionenkanäle besitzen *protopore* und *common gates* 11
1.7. Lokalisation und Struktur der CBS-Domänen 14
1.8. Der Phänotyp der ClC-7 Knockout-Maus 17
1.9. Biophysikalische Charakterisierung von ClC-7 20
2.1. Auswirkungen humaner Mutationen auf ClC-7-Ströme 26
2.2. Eine Vielzahl humaner Mutationen beschleunigt das *gating* von ClC-7. 27
2.3. Humane Mutationen verändern die Spannungsabhängigkeit von ClC-7 nicht 29
2.4. Lokalisation der humanen Mutationen in der Kristallstruktur von CmClC 30
2.5. „Schnelle“ Mutationen im Homologie-Modell für ClC-7 32
2.6. Ströme der Mutante R767H sind im Gegensatz zu R762H abhängig vom internen pH-Wert 33
2.7. Strategie für die Untersuchung des *common gatings* in ClC-7 35
2.8. Untereinheiten mit Protonen-Glutamat-Mutation sind auch im Heteromer transportdefizient 37
2.9. „Schnelle“ Untereinheiten mit Protonen-Glutamat-Mutation sind ebenfalls transportdefizient 37
2.10. Die „schnelle Mutation“ R762Q beeinflusst das *gating* der anderen Untereinheit 38
2.11. „Schnelle“ Mutationen beeinflussen das *gating* der anderen Untereinheit 39
2.12. Kombination von „schnellen“ Mutationen beschleunigt das *gating* nicht weiter 41
2.13. Repräsentative *patch clamp*-Messungen der Mutanten Y600A, Y600S und Y600F 43
2.14. Bestimmung der Umkehrpotentiale am Beispiel der Mutante Y600S und des Wildtyps 44
2.15. Mutationen von Y600 beeinflussen das *gating* von ClC-7 pH-abhängig . 47
4.1. Schematischer Aufbau eines TEVC-Messplatzes 68
4.2. Schematischer Aufbau eines patch clamp-Messplatzes. 70
A.1. Von I-TASSER erstelltes Alignment von hClC-7 und CmClC 76
A.2. Alignment ausgewählter CLC's 79

Tabellenverzeichnis

2.1. Mittels TEVC untersuchte humane Mutationen 25
2.2. „Schnelle“ Mutationen beschleunigen das *gating* unterschiedlich stark . 28

2.3. Gemessene Umkehrpotentiale der Tyrosinmutanten für verschiedene extrazelluläre Chlorid-Konzentrationen 45
2.4. Gemessene Umkehrpotentiale der Tyrosinmutanten für verschiedene extrazelluläre pH-Werte 45
4.1. Lösungen für die Lagerung und die Messungen an Oozyten 60
4.2. Lösungen für *patch clamp*-Versuche 61
4.3. Sonstige Lösungen 61
4.4. Verwendete Plasmide 64

Abkürzungsverzeichnis

ADOII	Autosomal dominante Osteopetrose TypII
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ARO	Autosomal rezessive Osteopetrose
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	*Bone Mineral Density*, Knochenmineraldichte
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CBS1	Cystathionin-β-Synthase-Domäne 1
CBS2	Cystathionin-β-Synthase-Domäne 2
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötales bovines Serum
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GFP	*Green Fluorescent Protein*, grünes fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAO	Intermediäre autosomale Osteopetrose
KO	Knockout
LAMP-2	*Lysosome-Associated Membrane Protein 2*
LB	Luria Bertani
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NAADP	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat
NAD	β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
PCR	*Polymerase Chain Reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat

PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
$PI(3,5)P_2$	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	*Standard Error of Measurement*, Standardfehler
TEVC	*Two-Electrode Voltage Clamp*, Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

Benennungen von Aminosäuren erfolgten gemäß dem Einbuchstabencode, alle Einheiten beziehen sich auf das SI-Einheitensystem.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

L. Leisle*, **C.F. Ludwig***, F.A. Wagner, T.J. Jentsch, T. Stauber, ClC-7 is a slowly voltage-gated $2Cl^-/1H^+$-exchanger and requires Ostm1 for transport activity. *The EMBO Journal*, 2011

C.F. Ludwig, F. Ulrich, L. Leisle, T. Stauber, T.J. Jentsch, Common gating of both CLC transporter subunits underlies voltage-dependent activation of the $2Cl^-/1H^+$-exchanger ClC-7/Ostm1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013

F. Barvencik, I. Kurth, T. Koehne, T. Stauber, J. Zustin, K. Tsiakis, **C.F. Ludwig**, F.T. Beil, J.M. Pestka, M. Hahn, R. Santer, C. Supanchart, U. Kornak, A. Del Fattore, T.J. Jentsch, A. Teti, A. Schulz, T. Schinke, M. Amling, CLCN7 and TCIRG1 mutations differentially affect bone matrix mineralization in osteopetrotic individuals. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 2013

A. Sartelet, T. Stauber, W. Coppieters, **C.F. Ludwig**, C. Fasquelle, T. Druet, Z. Zhang, N. Ahariz, N. Cambisano, T.J. Jentsch, C. Charlier, A missense mutation accelerating the gating of the lysosomal Cl^-/H^+-exchanger ClC-7/Ostm1 causes osteopetrosis with gingival hamartomas in cattle. *Disease Models & Mechanisms*, 2013