

**Analysen des Adaptorprotein-
abhängigen Transports des lysosomalen
Membranproteins CLN7 und von
Mausmodellen (*Mus musculus*) der
CLN7-Erkrankung**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Laura Isabel Brandenstein

Hamburg, 2015

Tag der Disputation: 11.12.2015

Dissertationsgutachter:

PD Dr. Stephan Storch

Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger

Prof. Dr. Stefan Hoth

Inhaltsverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Biogenese und Funktion von Lysosomen | 1 |
| 1.1.1 Lysosomale Membranproteine | 2 |
| 1.1.2 Autophagie-vermittelter Proteinabbau | 3 |
| 1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten | 5 |
| 1.2.1 Neuronale Ceroid Lipofuszinosen | 6 |
| 1.2.2 CLN7-Erkrankung | 8 |
| 1.2.3 Tiermodelle der NCLs | 11 |
| 1.3 Transport von lysosomalen Membranproteinen | 11 |
| 1.3.1 Struktur, Expression, subzelluläre Verteilung und Funktion der Adaptorproteinkomplexe | 11 |
| 1.3.2 Signal-abhängiger Transport von lysosomalen Membranproteinen | 13 |
| 2. Fragestellung | 15 |
| 3. Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Material | 16 |
| 3.1.1 Geräte | 16 |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterial | 18 |
| 3.1.3 Chemikalien | 19 |
| 3.1.4 Puffer und Lösungen | 21 |
| 3.1.5 Kits | 21 |
| 3.1.6 Vektoren | 22 |
| 3.1.7 siRNA | 22 |
| 3.1.8 Primer | 22 |
| 3.1.9 Peptide | 23 |
| 3.1.10 Assays für quantitative <i>Realtime</i> PCR | 23 |
| 3.1.11 Antikörper | 23 |
| 3.1.12 Enzyme | 25 |
| 3.1.13 DNA- und Molekulargewichtsmarker | 26 |
| 3.1.14 Säule | 26 |
| 3.1.15 Zelllinien und Kulturmedien | 26 |
| 3.1.16 Bakterienstämme und Kulturmedien | 26 |
| 3.1.17 Software | 27 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden | 28 |
| 3.2.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Zellen mit Plasmid-DNA | 28 |
| 3.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA | 28 |
| 3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 28 |
| 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese | 29 |
| 3.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen | 29 |

| | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.6 | Restriktionsspaltung | 29 |
| 3.2.7 | Ligation..... | 30 |
| 3.2.8 | Sequenzierung von DNA..... | 30 |
| 3.2.9 | Genotypisierung von <i>Cln7</i> ^(<i>tmla/tmla</i>) und <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäusen..... | 31 |
| 3.2.10 | Isolierung von RNA aus Gewebe | 31 |
| 3.2.11 | Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen | 31 |
| 3.2.12 | Herstellung von cDNA | 32 |
| 3.2.13 | Quantitative <i>Realtime</i> PCR..... | 32 |
| 3.3 | Zellbiologische Methoden..... | 33 |
| 3.3.1 | Kultivierung von Zelllinien | 33 |
| 3.3.2 | Kryokonservierung von Zellen..... | 33 |
| 3.3.3 | Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit <i>small interfering</i> RNA (siRNA) | 34 |
| 3.3.4 | Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsvektoren | 34 |
| 3.3.5 | Transduktion von Zellen..... | 35 |
| 3.3.6 | Immunfluoreszenz-Analysen von kultivierten Zellen | 35 |
| 3.3.7 | Messung der Zelloberflächenkonzentration von Proteinen durch FACS-Analyse | 36 |
| 3.4 | Biochemische Methoden | 37 |
| 3.4.1 | Herstellung von Membranlysaten aus Gewebe/ Zellen | 37 |
| 3.4.2 | Herstellung von Triton X-100-löslichen und -unlöslichen Lysaten aus Gewebe | 37 |
| 3.4.3 | Herstellung von RIPA-Fraktionen aus Gewebe | 37 |
| 3.4.4 | Herstellung von Lysaten aus Zellen | 38 |
| 3.4.5 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 38 |
| 3.4.6 | SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 38 |
| 3.4.7 | Tris-Tricin-Gelelektrophorese | 39 |
| 3.4.8 | Deglykosylierung von Proteinen | 39 |
| 3.4.9 | Expression von <i>Glutathion-S-Transferase</i> (GST)-Fusionsproteinen | 40 |
| 3.4.10 | Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen | 40 |
| 3.4.11 | GST-Pulldown-Analysen..... | 40 |
| 3.4.12 | Western-Blot-Analyse | 41 |
| 3.4.13 | Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen | 42 |
| 3.4.14 | Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin und anschließender Immunpräzipitation | 42 |
| 3.4.15 | Endozytose von [¹²⁵ I]-Arylsulfatase B (ASB)..... | 44 |
| 3.4.16 | Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Analysen | 44 |
| 3.4.17 | Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von 6xHis-APμ-Untereinheiten | 45 |
| 3.5 | Tierexperimentelle Methoden | 47 |
| 3.5.1 | Tierhaltung..... | 47 |
| 3.5.2 | Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten | 47 |
| 3.5.3 | Perfusion von Mäusen | 48 |
| 3.5.4 | Immunhistochemie von Mausorganen..... | 48 |
| 3.5.5 | <i>Perls Prussian-Blue</i> -Färbung | 48 |
| 3.5.6 | Elektronenmikroskopie (EM) | 49 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.7 | Magnetresonanztomographie (MRT)-Messungen an lebenden Mäusen | 49 |
| 3.5.8 | Statistische Auswertung der Messdaten | 49 |
| 4. | Ergebnisse | 51 |
| 4.1 | Generierung und phänotypische Analyse eines neuen <i>Gene-trap</i> Mausmodells der <i>Cln7</i> -Erkrankung | 51 |
| 4.1.1 | Generierung eines knockout <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodells durch Deletion von Exon 2 in <i>Mfsd8/Cln7</i> | 52 |
| 4.1.2 | Die Deletion von Exon 2 im <i>Mfsd8/Cln7</i> -Gen führt zu einer <i>frameshift</i> - Mutation und Verlust des <i>Cln7</i> Proteins | 54 |
| 4.1.3 | <i>Cln7</i> -Expression im Gehirn, der Retina und peripheren Organen | 56 |
| 4.1.4 | Phänotypische Analyse des <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodells | 57 |
| 4.1.5 | Lysosomale Speicherung im <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodell | 58 |
| 4.1.6 | Morphologische Analysen des Speichermaterials im Gehirn der <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäuse | 59 |
| 4.1.7 | Biochemische Analysen des Speichermaterials im Gehirn der <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäuse | 60 |
| 4.1.8 | Neuroinflammation im Gehirn der <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäuse | 63 |
| 4.1.9 | Erhöhung lysosomaler Proteine im <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodell | 66 |
| 4.1.10 | Akkumulation von Eisen im Gehirn der <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäusen | 68 |
| 4.1.11 | Gestörte Autophagie als Pathomechanismus im <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodell | 70 |
| 4.1.12 | Neurodegeneration im <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodell | 73 |
| 4.1.13 | Photorezeptoren-Degeneration und pathologische Veränderungen in der Retina von <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäusen | 75 |
| 4.1.14 | Funktionelle Analysen mit <i>Cln7</i> ^(-/-) embryonalen Mausfibroblasten | 76 |
| 4.2 | Adaptorprotein-abhängiger Transport des lysosomalen Membranproteins CLN7 | 78 |
| 4.2.1 | Glutathion S-Transferase (GST)-Kopräzipitations-Analysen verifizieren die Interaktion des N-terminalen Di-Leucinmotivs mit AP1 und AP2 | 79 |
| 4.2.2 | Die Tyrosin-Motive der C-terminalen Domäne von CLN7 interagieren mit μ 1A und μ 2 | 81 |
| 4.2.3 | Kinetische Analysen des lysosomalen Transports von CLN7 in <i>AP-kd</i> HEK293T-Zellen | 83 |
| 4.2.4 | Herstellung von stabil exprimierenden (CLN7-HA-lum) HeLa-Zellen durch retrovirale Transduktion | 85 |
| 4.2.5 | Erhöhte CLN7-Konzentration an der Plasmamembran in AP1 γ und <i>AP2α-kd</i> HeLa-Zellen | 87 |
| 5. | Diskussion | 90 |
| 5.1 | Generierung und phänotypische Analyse eines <i>Cln7-lacZ Gene-trap</i> Mausmodells | 90 |
| 5.1.1 | Analyse der Expression und subzellulären Lokalisation von <i>Cln7</i> | 91 |
| 5.2 | Generierung und phänotypische Analyse eines <i>Cln7-knockout</i> Mausmodells | 93 |
| 5.2.1 | Lysosomale Dysfunktion im <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodell | 94 |
| 5.2.2 | Akkumulation von Eisen im Gehirn der <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäuse | 96 |
| 5.2.3 | Neurodegeneration im Gehirn von <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäusen | 98 |

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.4 | Neuroinflammation im <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodell | 98 |
| 5.2.5 | Störungen der Autophagie im Gehirn von <i>Cln7</i> ^(-/-) Mäusen | 100 |
| 5.2.6 | Retinale Pathologie der CLN7-Erkrankung | 101 |
| 5.2.7 | Normale Biosynthese, Sortierung und proteolytische Prozessierung neusynthetisierter lysosomaler Hydrolasen in <i>Cln7</i> ^(-/-) MEFs | 102 |
| 5.2.8 | Unterschiede zwischen den <i>Cln7</i> ^(tm1a/tm1a) - und <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodellen | 104 |
| 5.2.9 | Signal-abhängiger Transport von CLN7 zu Lysosomen | 105 |
| 6. | Zusammenfassung | 109 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 111 |
| 8. | Publikationen und Kongressbeiträge | 124 |
| 9. | Erklärung | 126 |
| 10. | Danksagung..... | 127 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|------------------------------------------------------------------|
| ANCL | <i>adult neuronal ceroid lipofuscinosis</i> |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ASB | Arylsulfatase B |
| Atg | <i>autophagy related gene</i> |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat |
| CLEAR | <i>coordinated lysosomal expression and regulation</i> |
| CT | C-Terminus |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| Dmt1 | divalenter Metalltransporter |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| <i>env</i> | Hülle (<i>envelope</i>) |
| Epon | <i>epoxy embedding medium</i> |
| ERGIC | ER-Golgi-Intermediärkompartiment |
| ERT | Enzyersatztherapie (<i>enzyme replacement therapy</i>) |
| EUCOMM | <i>European Conditional Mouse Mutagenesis Program</i> |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> |
| Fpn | Ferroportin |
| Ftl | leichte Ferritinkette |
| <i>gag</i> | Gruppenspezifisches Antigen (<i>group specific antigen</i>) |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GFAP | <i>glial fibrillary acidic protein</i> |
| GlcNAc | <i>N</i> -Acetylglucosamin |
| GST | Glutathion S-Transferase |
| HEK293T | Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>) |
| HeLa | Henrietta Lacks |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Hfe | hereditäre-Hämochromatose-Protein/ <i>high iron FE</i> |
| HRP | Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| Hsc | Hitzeschockprotein |
| Iba1 | <i>ionizing calcium-binding adaptor molecule 1</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| INCL | <i>infantile neuronal ceroid lipofuscinosis</i> |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| IRP | <i>iron regulatory protein</i> |
| JNCL | <i>juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis</i> |
| <i>kd</i> | <i>knockdown</i> |
| LAMP | Lysosomen-assoziierten Membran-Proteine |
| LC3 | <i>microtubule-associated protein light chain</i> |
| LMP | Lysosomales Membranprotein |
| MEFs | Embryonale Mausfibroblasten (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>) |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| <i>mnd</i> | <i>motor neuron degeneration</i> |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure |
| MPR300 | Mannose-6-Phosphat-Rezeptor |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| NCL | Neuronale Ceroid-Lipofuszinose |
| NP40 | Nonidet P40 |
| NPC1 | Niemann-Pick C1 |
| NT | N-Terminus |
| NTA | Nitrilotriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>) |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PNGase F | Peptid <i>N</i> -Glykosidase F |
| <i>pol</i> | <i>Polymerase</i> |
| PPO | 2,5-Diphenyloxazol (Polyphenylenoxid) |
| Ppt1 | Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 |

| | |
|----------|--------------------------------------------------------------|
| RIPA | Radio-Immunpräzipitations-Assay |
| RT | Raumtemperatur |
| Sapospin | <i>sphingolipid activator protein</i> |
| Scmas | c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SPR | <i>surface plasmon resonance</i> |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TEMED | NNN'N'-Tetramethylethylenediamin |
| TFEB | Transkriptionsfaktor EB |
| TfR | Transferrinrezeptor |
| TGN | <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk |
| Tpp1 | Tripeptidyl Peptidase 1 |
| ULK1 | <i>unc-51 like autophagy activating kinase 1</i> |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| vLINCL | <i>variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis</i> |
| Vps | <i>vacuolar protein sorting</i> |
| w/v | <i>weight per volume</i> |
| Y2H | <i>yeast two-hybrid</i> |
| Y3H | <i>yeast three-hybrid</i> |

1. Einleitung

1.1 Biogenese und Funktion von Lysosomen

Lysosomen sind eukaryotische, membranumschlossene Organellen, in denen der Abbau von Makromolekülen stattfindet (de Duve, 1983). Es gibt über 60 lösliche lysosomale Enzyme (Proteinasen, Peptidasen, Phosphatasen, Nukleasen, Glycosidasen, Sulphatasen, Lipasen etc.), die bei einem pH von 4,5-5 aktiv sind. Die Azidität der lysosomalen Kompartimente wird durch die membranständige H^+ -ATPase, einer ATP-abhängigen Protonenpumpe, aufrecht erhalten (Schröder *et al*, 2010). Lysosomen können durch das Fehlen von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs) und prozessiertem Cathepsin D von späten Endosomen unterschieden werden (Kornfeld & Melman, 1989).

Die Biogenese von Lysosomen erfordert eine kontinuierliche Substitution löslicher, saurer Hydrolasen und lysosomaler Membranproteine (LMP). Terminale Mannosereste *N*-glykosidisch verbundener Oligosaccharide von neu synthetisierten, löslichen, lysosomalen Enzyme werden im *cis*-Golgi-Apparat durch die katalytische Aktivität des *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc)-1-Phosphotransferase Komplexes mit GlcNAc-1-Phosphat modifiziert. Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die GlcNAc-Reste durch die GlcNAc-1-Phosphodiester- α -*N*-Acetylglucosaminidase entfernt und der Mannose 6-Phosphat (M6P)-Erkennungsmarker wird freigelegt (Braulke & Bonifacino, 2009). So können der 300 kDa MPR (MPR300) und der 46 kDa MPR (MPR46) den M6P-Rest binden und die löslichen, lysosomalen Enzyme zu Lysosomen transportieren (Pohl *et al*, 2009).

Die Mehrheit der Gene, die für lysosomale Biogenese/ Funktion und Autophagie wichtig sind, werden auf transkriptioneller Ebene durch den Transkriptionsfaktor EB (TFEB) reguliert. Die TFEB-Zielgene besitzen innerhalb ihrer Promotorregion ein gemeinsames, regulatorisches Motiv, das *coordinated lysosomal expression and regulation* (CLEAR) Element mit der Konsensussequenz GTCACGTGAC (Sardiello *et al*, 2009). Neben dem Abbau von Makromolekülen ist das Lysosom noch an weiteren physiologischen Prozessen wie der Regulation der Zelloberflächenkonzentration von Rezeptoren (Huotari & Helenius, 2011), Reparatur der Plasmamembran, Cholesterin Homöostase (Appelqvist

et al., 2013), Apoptose (Bursch, 2001), Antigenpräsentation (Watts, 2012), Knochengewebe-Remodellierung (Zhao, 2012), Pathogenabwehr (Soldati & Neyrolles, 2012) und Regulation des Stoffwechsels und Energiehaushalts beteiligt (Settembre *et al.*, 2013).

1.1.1 Lysosomale Membranproteine

Lysosomale Membranproteine (LMP) sind wichtig für die Stabilität und Integrität des Lysosoms, die intralysosomale Azidifizierung und den Transport von Metaboliten und Ionen. Außerdem sind sie an der Regulation von Fusionsprozessen von Lysosomen mit anderen Organellen beteiligt (Schwake *et al.*, 2013). Es wird geschätzt, dass die Lysosomen-assoziierten Membran-Proteine (LAMP1 und LAMP2) und die Lysosomen integrierten Membran-Proteine (LIMP1 und LIMP2) etwa 50 % der Proteine der lysosomalen Membranen ausmachen. LAMP1 und LAMP2 sind Typ-1 Transmembranproteine, die in ihren luminalen Domänen mehr als 10 verwendete *N*-Glykosylierungsstellen besitzen. Die glykosylierten luminalen Domänen der LAMPs und LIMPs bilden zusammen mit anderen LMPs die Glykokalyx, wodurch die lysosomale Membran und assoziierte Proteine vor Abbau durch saure Hydrolasen geschützt werden (Wilke *et al.*, 2012). LMPs sind neben den oben genannten Funktionen noch an weiteren Prozessen wie Chaperon-vermittelter Autophagie, lysosomaler Exozytose, Membranreparatur, MHC-Klasse-II Antigenpräsentation, viralen Infektionen, Phagozytose und Makroautophagie beteiligt (Schwake *et al.*, 2013). So hat der Glykosylierungszustand von LAMP1 Einfluss auf lysosomale Exozytose und Fusion der lysosomalen Membran mit der Plasmamembran (Yogalingam *et al.*, 2008). LIMP2 wurde als Cargorezeptor identifiziert, der den M6P-unabhängigen Transport der β -Glucocerebrosidase vom endoplasmatischen Reticulum (ER) zu Lysosomen vermittelt (Reczek *et al.*, 2007). Das Ebolavirus benötigt den lysosomalen Cholesterintransporter Niemann-Pick C1 (NPC1) als Rezeptor, um in die Wirtszelle zu gelangen (Miller *et al.*, 2012). Für die Mehrzahl der 140-300 LMPs sind die Funktionen bisher unbekannt (Chapel *et al.*, 2013; Schröder *et al.*, 2010). Es existieren mehr als 10 verschiedene LSDs, die durch Defekte in LMPs verursacht werden (Tabelle 1; Ruivo *et al.*, 2009).

Tabelle 1 Funktionen und assoziierte Krankheiten von LMPs

| LMP | (mögliche) Funktion | assoziierte Krankheit |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| CLN3 | Metabolit-Transport | Juvenile Neuronale Ceroid Lipofuszinose (JNCL) |
| CLN7 | Metabolit-Transport | Variante spät-infantile Neuronale Ceroid Lipofuszinose (vLINCL) |
| CLC7/OSTM1 (<i>chloride channel 7</i>) | Protonen- und Anionen (Cl ⁻)-Transport | Infantile maligne Osteoporose |
| Cystinosin | H ⁺ - und L-Cystein-Symport | Cystinose |
| HGSNAT (<i>heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase</i>) | Acetylimport und Transfer zu Heparansulfat | Mukopolysaccharidose Typ IIIC |
| LAMP2 | Autophagie, lysosomale Fusionierung und Transport | Danon-Krankheit |
| LIMP2/SCARB2 | Chaperon und Transport von beta-Glucocerebrosidase | <i>Action myoclonus-renal failure</i> Syndrom |
| LMBRD1 (<i>limb development membrane protein domain containing 1</i>) | Export von Cobalamin | Cobalamin F-type Krankheit |
| NPC1 | Lipid-, Cholesterin- und Ca ²⁺ -Transport | Niemann-Pick Typ C |
| Mucolipin 1 | Kationenkanal | Mukolipidose Typ IV |
| Sialin | Export von Sialinsäure und sauren Hexosen, Import von Asparagin und Glutamin | Salla-Krankheit |

1.1.2 Autophagie-vermittelter Proteinabbau

Autophagie bezeichnet einen Prozess in Zellen, bei dem zelleigenes (Zytosol, beschädigte Organellen, fehlgefaltete und aggregierende Proteine) und zellfremdes (Pathogene) Material im Lysosom abgebaut wird, um Substrate für Energieproduktion und

Biosynthese zur Verfügung zu stellen (Eskelinen & Saftig, 2009). Man unterscheidet drei Formen der Autophagie, die zum Abbau der Substrate im Lysosom führen: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie. Als Mikroautophagie wird die Aufnahme von zytosolischem Material durch Invagination der lysosomalen Membran bezeichnet (Glick *et al.*, 2010). Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden lösliche, monomere Zielproteine, die ein Signalpeptid der Sequenz KFERQ enthalten, mit Hilfe eines Chaperon-Komplexes (z.B. dem Hitzeschockprotein 70, Hsc-70) durch die lysosomale Membran transloziert (Kaushik & Cuervo, 2012). Der Chaperon-Protein-Komplex wird dabei durch den lysosomalen Rezeptor LAMP2A erkannt und im Lysosom entfaltet und degradiert (Saftig *et al.*, 2008). Bei der Makroautophagie werden Zytosol oder Organellen unter Bildung von Autophagosomen durch eine Doppelmembran umschlossen. Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen zum Autolysosom, wo der Inhalt proteolytisch abgebaut wird (Abb. 1; Glick *et al.*, 2010). Bei Nährstoffmangel, wird die Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) inhibiert, was zur Derepression der Serin/Threonin-Proteinkinase *unc-51 like autophagy activating kinase 1* (ULK1) führt. ULK1 phosphoryliert Beclin1 und aktiviert die Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase *vacuolar protein sorting 34* (VPS34), wodurch der Proteinkomplex aus VPS34, Beclin1 und *autophagy related gene 14* (Atg14L) zum Phagophor rekrutiert wird (Russell *et al.*, 2013). Das Lipid Phosphatidylinositol (PI) wird durch die PI3-Kinase VPS34 zu PI3-Phosphat phosphoryliert, wodurch die Bildung des Phagophors und die Rekrutierung weiterer Atg-Proteine initiiert wird (Xie & Klionsky, 2007). Die Assoziation des Atg12-Atg5-Atg16-Komplexes induziert die Krümmung des heranreifenden Phagophors durch asymmetrische Rekrutierung des *microtubule-associated protein 1 light chain 3-II* Proteins (LC3-II). Membrangebundenes LC3-II stellt ein Markerprotein für Autophagosomen dar und wird durch Konjugation von Phosphatidylethanolamin an den C-Terminus (CT) des zytosolischen LC3-I synthetisiert (Glick *et al.*, 2010). LC3-II fungiert zusätzlich als Rezeptor und interagiert mit dem Adapterprotein p62/SQSTM1, um die selektive Aufnahme und den Abbau von polyubiquitinierten Proteinaggregaten durch Autophagie zu gewährleisten (Abb. 1; Pankiv *et al.*, 2007).

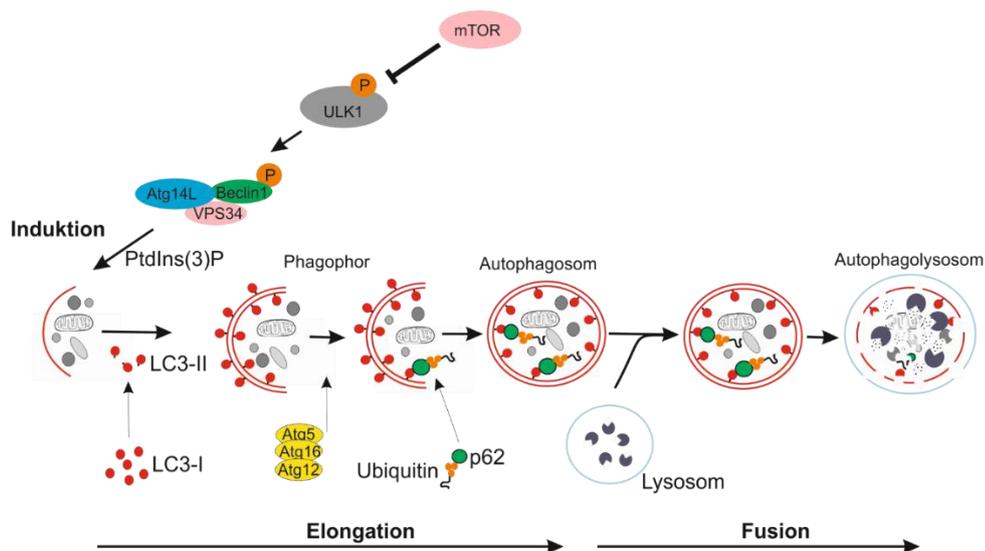


Abb. 1 Autophagie-abhängiger Proteinabbau

Nährstoffmangel inhibiert mTOR und es kommt zur Derepression von ULK1, wodurch der VPS34/Beclin1/Atg14L-Komplex aktiviert wird. Durch die VPS34-vermittelte Produktion von Phosphatidylinositol 3-Phosphat wird das Phagophor initiiert. Die Konjugation von Phosphatidylethanolamin an LC3-I führt zum Autophagosomen-gebundenen LC3-II, was zusammen mit dem Atg12–Atg5–Atg16-Komplex für die Elongation und Reifung des Phagophors zum Autophagosom notwendig ist. Polyubiquitinierte Proteinkomplexe gelangen durch den Autophagie-Adapter p62 spezifisch ins Autophagosom. Die Fusion von Autophagosom und Lysosom führt zum Abbau des Autophagosoms und dessen Inhalts. Abbildung modifiziert nach (Kang *et al*, 2011; Russell *et al*, 2013).

1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten

Defekte in löslichen lysosomalen Proteinen oder LMPs führen aufgrund der Akkumulation von nicht abgebauten Makromolekülen oder niedermolekularen Metaboliten im lysosomalen Lumen zu lysosomalen Speichererkrankungen (LSDs; Saftig & Klumperman, 2009). Die Mehrzahl der bekannten LSDs wird durch Defekte in Genen verursacht, die für die mehr als 60 verschiedenen löslichen lysosomalen Proteine kodieren (Ballabio & Gieselmann, 2009). Mutationen in Genen, die für Proteine kodieren, die posttranslationale Modifizierungen neusynthetisierter löslicher lysosomaler Proteine im ER (*formylglycine generating enzyme*) oder Golgi-Apparat (GlcNAc-1-Phosphotransferase) katalysieren, führen zu Defekten multipler lysosomaler Proteine (Kollmann *et al*, 2010; Schlotawa *et al*, 2013). Fast alle LSDs sind durch eine große Variabilität des klinischen Phänotyps charakterisiert, die den Beginn der Erkrankung, die Schwere der Symptome, die betroffenen Organe und den Zeitpunkt des Versterbens umfassen. In Abhängigkeit von der chemischen Natur der akkumulierenden Substrate können LSDs in Lipidosen, Mukopolysaccharidosen, Glykogenosen, Gangliosidosen und Mukolipidosen unterteilt werden (Metha, 2012). Durch die Speicherung kommt es zur

lysosomalen Dysfunktion. Die verminderte Bereitstellung von Metaboliten durch das endolysosomale System führt zu einem „Hungerzustand“ in der Zelle (Schulze & Sandhoff, 2011). Die meisten LSDs werden autosomal-rezessiv vererbt (Metha, 2012). Die Fabry-Krankheit (α -Galaktosidase-Defizienz) und das Hunter-Syndrom (Iduronat-2-Sulfatase-Defizienz) werden jedoch X-chromosomal rezessiv vererbt (Adam *et al*, 2006; Tyłki-Szymanska, 2014). Ein dominanter Erbgang wurde nur bei der Danon- (LAMP2-Defizienz) und CLN4-Krankheit (DNAJC5-Defizienz) beschrieben (Horvath *et al*, 2003; Noskova *et al*, 2011).

1.2.1 Neuronale Ceroid Lipofuszinosen

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCLs) sind eine Gruppe autosomal-rezessiv vererbter LSDs, die durch die selektive Schädigung und den Verlust von Neuronen im Gehirn und in der Retina, Neuroinflammation und Speicherung von autofluoreszierenden Ceroid-Lipopigmenten charakterisiert sind (Mole *et al*, 2011). NCLs sind die häufigste Ursache für Neurodegeneration im Kindesalter und treten mit einer Inzidenz von ~1:12.500 in den USA und ~1:30.000 in Deutschland auf (Kohlschütter & Schulz, 2009). Klinisch sind die NCLs durch Erblindung, progrediente psychomotorische Retardierung, Epilepsien und frühzeitigen Tod gekennzeichnet. Im Gegensatz zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen, die eine komplexere Ätiologie, einen späteren Erkrankungsbeginn und eine langsamere Progredienz aufweisen, sind alle bekannten NCLs auf einen einzelnen Gendefekt zurückzuführen (Radke *et al*, 2015). Die Erkrankungen werden aufgrund des zeitlichen Beginns in kongenitale, infantile, spät-infantile, juvenile und adulte Verlaufsformen unterteilt (Kohlschütter & Schulz, 2009). Nach Einführung einer neuen Nomenklatur werden die verschiedenen NCL-Formen auf Grundlage des identifizierten Gendefekts klassifiziert (Williams & Mole, 2012). NCL-Gene kodieren für lösliche lysosomale Enzyme, polytopische Membranproteine des ER und Lysosoms, zytosolische, sekretorische und Membranen-assoziierte Proteine, die direkte oder indirekte Bedeutung für lysosomale Biogenese und Funktionen besitzen (Tabelle 2; Cotman & Staropoli, 2012; Kollmann *et al*, 2013).

Tabelle 2 CLN-Erkrankungen, zugrunde liegende Gendefekte und phänotypische Ausprägung

| CLN-Erkrankungen | Protein | Lokalisation | Phänotypen |
|------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|
| CLN1 | Protein-Palmitoly-Thioesterase (PPT1) | lysosomale Matrix | INCL, LINCL, JNCL, ANCL |
| CLN2 | Tripeptidyl Peptidase 1 (TPP1) | lysosomale Matrix | LINCL, JNCL |
| CLN3 | CLN3 | lysosomale Membran, präsynaptische Vesikel | JNCL |
| CLN4 | DNAJC5/ Cysteine string protein α | zytosolisch, assoziiert an vesikuläre Membranen | ANCL, autosomal dominant |
| CLN5 | CLN5 | lysosomale Matrix | LINCL, JNCL, ANCL |
| CLN6 | CLN6 | ER-Membran | LINCL, ANCL |
| CLN7 | CLN7 | lysosomale Membran | LINCL, JNCL |
| CLN8 | CLN8 | ER/ ERGIC-Membran | LINCL, EPMR |
| CLN10 | Cathepsin D | lysosomale Matrix, extrazellulär | congenitale NCL, LINCL, JNCL, ANCL |
| CLN11 | Grn/ Progranulin | extrazellulär | ANCL |
| CLN12 | ATP13A2 | lysosomale Membran | JNCL |
| CLN13 | Cathepsin F | lysosomale Matrix | ANCL |
| CLN14 | KCTD7/ potassium channel tetramerisation domain-containing 7 | zytosolisch, teilweise an Membranen assoziiert | INCL |

INCL: infantile NCL; LINCL: spät-infantile NCL; JNCL: juvenile NCL; ANCL: adulte NCL; EPMR: Progressive Epilepsie mit mentaler Retardierung; ERGIC: ER-Golgi Intermediärkompartiment

Bisher wurden mehr als 400 verschiedene Patientenmutationen in den 13 NCL-Genen identifiziert (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/>). Im Gegensatz zu den „klassischen“ LSDs, die durch intralysosomalen Speicherung eines spezifischen, nicht abbaubaren Substrats charakterisiert sind, ist bei den NCLs das lysosomale Speichermaterial unspezifisch und unabhängig vom Gendefekt. Das Speichermaterial ist heterogen und enthält Proteine, Kohlenhydrate, Phospholipide, Glykosphingolipide und Metalle (Palmer, 2015). Die c-

Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (Scmas) ist die Hauptkomponente des proteinogenen Anteils des Speichermaterials der meisten NCLs. Ausnahmen sind die CLN1-, CLN4- und CLN10-Erkrankungen, bei denen hauptsächlich Saposin A und D gespeichert wird (Jabs *et al*, 2008). Saposine sind kleine Glykoproteine, die im Lysosom Sphingolipide hydrolysieren (Kolter & Sandhoff, 2010). Das 70 kDa große Prosaposin-Vorstufenprotein wird im Lysosom proteolytisch zu den Saposinen A, B, C und D prozessiert, die strukturell ähnlich sind, aber unterschiedliche Substratspezifität aufweisen (Tyynelä *et al*, 1993). Das unspezifische Speichermaterial in NCLs lässt keine direkten Schlüsse auf die Funktion der NCL-Proteine zu (Kollmann *et al*, 2013). Die Ultrastruktur des lysosomalen Speichermaterials bei den einzelnen CLN-Erkrankungen ist heterogen und enthält elektronenmikroskopisch unterscheidbare Einschlüsse, wie *granular osmiophilic deposits* (GRODs), *fingerprint* und kurvilineare Profile. GRODs sind charakteristisch für die CLN1-, CLN4- und CLN10-Erkrankungen (Palmer, 2015). Bei den CLN-Erkrankungen mit überwiegender Speicherung von Scmas werden *fingerprint*-Profile (CLN3) oder eine Kombination aus *fingerprint*- und kurvilinearen Profilen (CLN2, CLN5, CLN6, CLN8) detektiert (Radke *et al*, 2015). Bisher sind alle bekannten CLN-Erkrankungen unheilbar und werden deshalb palliativ behandelt. Allerdings besteht für CLN-Erkrankungen, die durch Defekte in löslichen lysosomalen Enzymen (CLN1, CLN2, CLN5, CLN10 und CLN13) verursacht werden, die therapeutische Option einer Behandlung durch Enzymersatztherapie (ERT). Die ERT für CLN2 Patienten, bei der rekombinant hergestelltes TPP1 intrathekal appliziert wird, befindet sich bereits in der klinische Phase I/II (Neverman *et al*, 2015).

1.2.2 CLN7-Erkrankung

Im Mittelpunkt der Arbeit steht CLN7, das zusammen mit Defekten in CLN5, CLN6 und CLN8 die Subgruppe der variant spät-infantilen NCLs (vLINCL) bildet. Mehr als 35 verschiedene Mutationen wurden bei CLN7 Patienten im *MFSD8/CLN7*-Gen identifiziert (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/>). Die ersten klinischen Symptome (Entwicklungsverzögerung und Krampfanfälle) manifestieren sich im Alter von zwei bis fünf Jahren. Im weiteren Krankheitsverlauf treten weitere Symptome, wie Sprachverlust, motorische und mentale Retardierung, Ataxie, Myoklonie und Sehverlust auf. Die mittlere Lebenserwartung der CLN7 Patienten ist mit 11,5 Jahren (Spanne: 7-18 Jahre) stark vermindert (Kousi *et al*,

2009). Es wurden zwei *missense*-Mutationen in den zytosolischen Domänen L4 und L8 von CLN7 identifiziert, die mit milderem bzw. atypischen Krankheitsverläufen assoziiert sind (Abb. 2): bei der homozygoten *missense* Mutation p.CLN7 A157P wurde ein milderer, juveniler Krankheitsverlauf, bei dem erste Symptome erst in einem Alter von 11 Jahren auftreten und bis zur zweiten und dritten Lebensdekade zunehmen, beschrieben (Kousi *et al*, 2009). Bei compound heterozygoten adulten Patienten mit einer schweren (p.CLN7 E381* oder p.CLN7 K333K fs*3) und einer milden Mutation (p.CLN7 E336Q) wurde ein atypischer Krankheitsverlauf diagnostiziert, bei dem die Patienten eine makuläre Dystrophie, aber keinerlei NCL-typische Symptome aufweisen (Roosing *et al*, 2015). Aufgrund der ähnlichen klinischen Verläufe bei allen anderen vLINCL/CLN7 Patienten vermutet man, dass die *MFSD8/CLN7*-Mutationen zu einem vollständigen Funktionsverlust des CLN7-Proteins führen. Für die Patientenmutationen p.CLN7 T294K und p.CLN7 P412L wurde gezeigt, dass eine verminderte Stabilität mutanter CLN7 Proteine im Lysosom zum Funktionsverlust beitragen (Steenhuis *et al*, 2012).

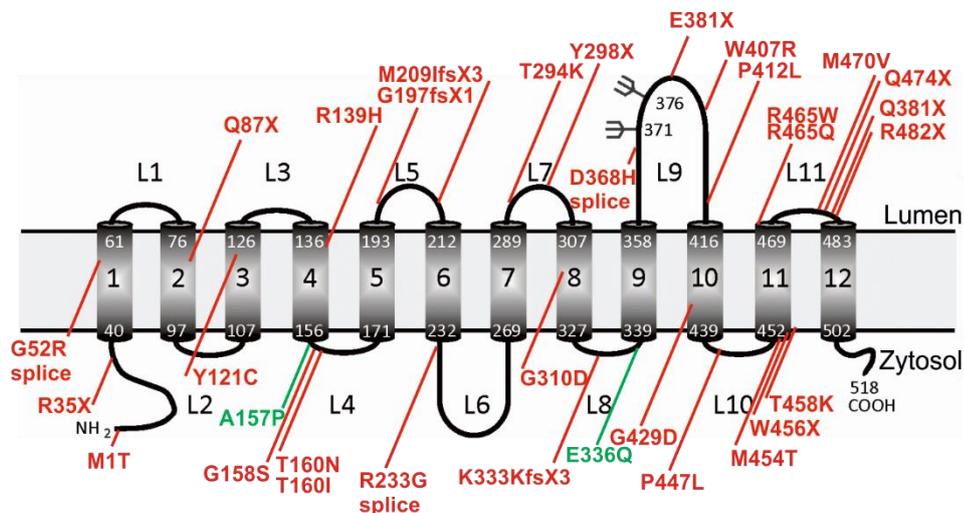


Abb. 2 Membrantopologie des CLN7 Proteins und Lokalisation von CLN7 Patientenmutationen. CLN7 besteht aus 518 Aminosäuren, 12 potentiellen Transmembrandomänen (1-12), 11 Schleifen (L1-11), zwei verwendeten *N*-Glykosylierungsstellen in der luminalen Schleife L9 und N- und C-terminale zytosolische Domänen. Die Positionen von identifizierten *missense*-, *nonsense*- und *frameshift*-Mutationen sind rot eingezeichnet. *Missense*-Mutationen in zytosolischen Domänen, die bei Patienten mit juvenilem Phänotyp (p.CLN7 A157P) oder adulten Patienten mit makulärer Dystrophie (p.CLN7 E336Q) identifiziert wurden, sind grün hervorgehoben.

CLN7 ist ein LMP und besteht aus 518 Aminosäuren (AS), 12 Transmembrandomänen, N- und C-terminalen zytosolischen Domänen und zwei verwendeten *N*-Glykosylierungsstellen (Abb. 2). Nach Transport zum Lysosom wird CLN7 durch

Cysteinproteasen gespalten (Steenhuis et al, 2012). Das vorhergesagte Molekulargewicht von CLN7 beträgt 58 kDa (Siintola et al, 2007). CLN7 ist in Vertebraten hoch konserviert und besitzt Sequenzhomologien zur DHA1.2-Gruppe (H^+ /Medikament Antiporter) der *major facilitator superfamily* (MFS)-Transporter, die 82 verschiedene, homologe Gruppen umfasst. MFS-Transporter sind sekundär aktive Transporter, die aus 400-600 AS und 12, 14 oder 24 Transmembrandomänen zusammengesetzt sind und verschiedene lösliche, niedermolekulare Metabolite wie Oligosaccharide, Inositole, AS, Nukleoside, Organophosphatester, Citratzyklus-Metabolite, Neurotransmitter, Amine, organische und anorganische Kationen im Uniport, Symport oder Antiport transportieren (Pao et al, 1998). Neben CLN7 existieren weitere lysosomale MFS-Transporter wie das *Disrupted in renal carcinoma 2* Protein (DIRC2), MFSD1, MFSD12, Sialin und GLUT8 und das *Spinster homolog 1* Protein (Spns1), deren genaue Funktionen unbekannt sind (Chapel et al, 2013).

Northern-Blot-Analysen von humanem Gewebe zeigen, dass die *CLN7 mRNA* ubiquitär, mit Zelltyp- und Region-abhängigen Unterschieden im Gehirn exprimiert wird (Siintola et al, 2007). In Expressions-Analysen bei der Ratte wurde eine erhöhte *Cln7 mRNA* Expression in der Körnerschicht des Cerebellums, in Pyramidenzellen des Hippocampus und im Cortex gefunden. Quantitative *Realtime* PCR Analysen zeigen, dass die Konzentration von *Cln7 mRNA* in kultivierten Neuronen der Ratte 12- bzw. 6-fach höher ist als in Mikrogliazellen bzw. Astrozyten (Sharifi et al, 2010). Neuropathologisch manifestiert sich die humane CLN7-Erkrankung durch eine starke Akkumulation von autofluoreszierenden Lipopigmenten in cerebellären Purkinjezellen und in Neuronen des Cortex und Hippocampus. Durch Analysen von Autopsiematerial von CLN7 Patienten verschiedenen Alters wurde ein altersunabhängiger, vollständiger Verlust von Körnerzellen im Cerebellum und eine altersabhängige progressive Degeneration von Purkinjezellen, Pyramidenzellen der CA2-Region und kortikaler Neurone aller Schichten gefunden (Mole et al, 2011). Zusätzlich wurde die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten detektiert. In der Retina der CLN7 Patienten kommt es zur vollständigen Degeneration von Photorezeptoren und zur Neurodegeneration in der Ganglienzellschicht und der äußeren und inneren nukleären Schicht. In den genannten Zellschichten wurde außerdem Astrozytose detektiert (Mole et al, 2011).

1.2.3 Tiermodelle der NCLs

Für alle NCLs, außer CLN7 und CLN14, existieren Mausmodelle oder natürliche Mausmutanten (Shacka, 2012). Die *Cln1*-, *Cln2*-, *Cln3*-, *Cln4*-, *Cln5*-, *Cln10*-, *Cln11*-, *Cln12*-, *Cln13*-Gene wurden in Mäusen durch homologe Rekombination ausgeschaltet (Davies *et al*, 2015; Götzl *et al*, 2014; Kett *et al*, 2015; Shacka, 2012; Tang *et al*, 2006). Zusätzlich existieren *Cln1*- und *Cln10*-defiziente *Drosophila melanogaster*-Fliegenmodelle (Hickey *et al*, 2006; Myllykangas *et al*, 2005), sowie natürliche Mutanten für die Gene *Cln5* (Hund, Rind und Schaf), *Cln6* (*nclf*-Maus, New Zealand South Hampshire und Merino-Schaf), *Mfsd8/Cln7* (Chinesischer Schopfhund), *Cln8* (*motor neuron degeneration, mnd*, Maus und Hund) und *Cln10* (Hund und Schaf; Guo *et al*, 2014; Jalanko & Braulke, 2009). Bisherige Untersuchungen zeigten, dass der Phänotyp der oben genannten *knockout/ knockin*-Mäuse bzw. der natürlichen Mutanten den bei NCL-Patienten auftretenden neuropathologischen und klinischen Veränderungen ähnelte. Zu den wichtigsten pathologischen Veränderungen bei publizierten NCL-Mausmodellen zählen Autofluoreszenz, lysosomale Speicherung von Scmas oder Saposin D, Neuroinflammation, Gehirnatrophie, retinale Degeneration und das Absterben von Subpopulationen neuronaler Zellen (Cooper *et al*, 1999). Besonders starke Neurodegeneration tritt bei GABAergen (*gamma-aminobutyric acid*) Intereuronen, thalamokortikalen Projektionsneuronen und Purkinjezellen des Cerebellums auf. Mit Hilfe der Mausmodelle wurde gezeigt, dass eine früh einsetzende Aktivierung der Mikroglia dem Verlust von Neuronen in thalamokortikalen Regionen vorausgeht (Cooper *et al*, 1999; Jalanko & Braulke, 2009). Die Mausmodelle sind besonders für die Analyse altersabhängiger pathologischer Veränderungen im Gehirn und in der Retina geeignet, da dies bei NCL-Patienten nicht möglich ist.

1.3 Transport von lysosomalen Membranproteinen

1.3.1 Struktur, Expression, subzelluläre Verteilung und Funktion der Adaptorproteinkomplexe

Adaptorproteinkomplexe (APs) sind heterotetramere Proteinkomplexe, die mit Außenmembranen intrazellulärer Organellen assoziiert sind. Sie vermitteln die Verpackung spezifischer Cargo-Proteine und deren zielgerichteten, vesikulären

Transport zwischen Donor- und Akzeptororganellen (Park & Guo, 2014). In eukaryotischen Zellen unterscheidet man fünf strukturell ähnliche APs (AP1-AP5), die sich durch Proteinsequenzen, Expression, Lokalisation, interagierende Cargo-Rezeptoren und Hüll- und akzessorische Proteine unterscheiden. APs sind aus zwei großen- ($\gamma/\alpha/\delta/\epsilon/\zeta$ und $\beta 1$ - $\beta 5$, ~100 kDa), einer mittleren- ($\mu 1$ - $\mu 5$, ~50 kDa) und einer kleinen Untereinheit ($\sigma 1$ - $\sigma 5$, ~20 kDa) zusammengesetzt (Abb. 3). Es existieren verschiedene Isoformen der Untereinheiten von AP1 (zwei γ -, zwei μ - und drei σ -Isoformen), AP2 (zwei α -Isoformen) und AP3 (zwei β -, zwei μ - und zwei σ -Isoformen; Tabelle 3). AP1 und AP2 sind Bestandteil Clathrin-beschichteter Vesikel, während AP4 und 5 Clathrin-unabhängig sind (Borner *et al*, 2012). In HeLa-Zellen ist die AP2-Expression am höchsten und die Expression von AP1/AP3 bzw. AP4/AP5 2-fach bzw. 30-fach niedriger (Hirst *et al*, 2013). Im Gleichgewichtszustand sind die APs mit den Außenmembranen der Donororganellen assoziiert. Dort binden sie zytoplasmatische Sortierungssignale von Cargoproteinen, rekrutieren für die Bildung von Vesikeln Clathrin und andere akzessorische Proteine und vermitteln den Transport zur Membran des Zielorganells (Park & Guo, 2014).

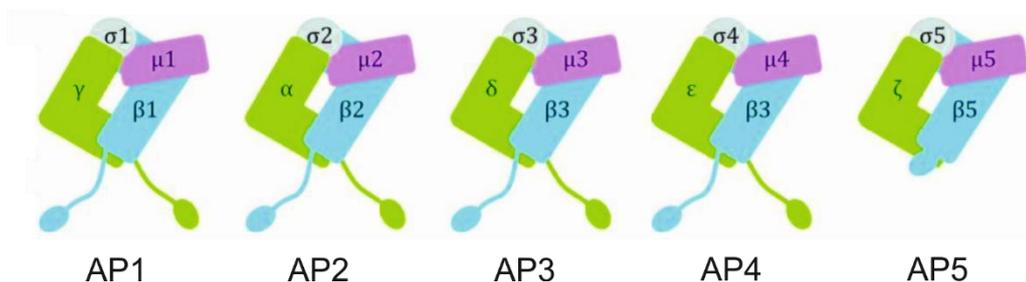


Abb. 3 Schematische Darstellung der Adaptorproteinkomplexe

APs bestehen aus zwei großen Untereinheiten: $\gamma/\alpha/\delta/\epsilon/\zeta$ (grün) und $\beta 1$ - $\beta 5$ (blau), einer mittleren Untereinheit: $\mu 1$ - $\mu 5$ (violett) und einer kleinen Untereinheit: $\sigma 1$ - $\sigma 5$ (grau).

AP1 interagiert mit der kleinen GTPase ADP-Ribosylierungsfaktor 1 (Arf1) und Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) und vermittelt den Clathrin-abhängigen bidirektionalen Transport zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk und Endosomen (Wang *et al*, 2003). Zusätzlich reguliert AP1 die basolaterale Polarität in Epithelzellen (Nakatsu *et al*, 2014) und AP1A ist für den Reifungsprozess von sekretorischen Vesikeln wichtig (Bonnemaison *et al*, 2014). AP2 ist an der Plasmamembran lokalisiert und vermittelt die Clathrin-abhängige Endozytose einer Vielzahl an Proteinen, wie Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und viralen Proteinen (Traub, 2005). Durch die Interaktion der α -

und μ -Untereinheiten mit dem Lipid Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP2) wird AP2 selektiv zur Plasmamembran rekrutiert (Höning *et al*, 2005). AP3 ist ebenfalls an TGN- und endosomalen Membranen lokalisiert und wird von Arf1 reguliert (Boehm *et al*, 2001; Ooi *et al*, 1998). Es transportiert Cargo von tubulären Bereichen früher Endosomen zu späten Endosomen und ist an der Biogenese von Lysosomen-ähnlichen Organellen (LROs, *lysosome related organelles*) beteiligt. Das Neuronen-spezifische AP3B ist für die Bildung und Abgabe von exozytierenden Organellen (z.B. synaptischen Vesikeln) wichtig (Blumstein *et al*, 2001; Park & Guo, 2014). AP4 ist hauptsächlich am TGN lokalisiert, transportiert Cargo-Proteine vom TGN zu Endosomen (Dell'Angelica *et al*, 1999) und vermittelt die polarisierte Sortierung von Membranproteinen in Epithelzellen und den Transport von Neurotransmitter-Rezeptoren (Matsuda *et al*, 2008; Simmen *et al*, 2002; Yap *et al*, 2003). AP5 ist in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert. Es wird deshalb vermutet, dass AP5 an endosomalen Sortierungsprozessen beteiligt ist (Hirst *et al*, 2013).

Tabelle 3 Zusammensetzung, Expression und Funktion der APs

| AP | Untereinheiten | Expression | Funktion |
|------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| AP1A | γ 1/2; β 1; σ 1A/B/C; μ 1A | ubiquitär | TGN-Endosomen |
| AP1B | γ 1/2; β 1; σ 1A/B/C; μ 1B | Polarisiertes Epithelium | Polarisierte Sortierung |
| AP2 | α A/C; β 2; σ 2; μ 2 | ubiquitär | Clathrin-abhängige Endozytose |
| AP3A | δ ; β 3A; σ 3A; μ 3A | ubiquitär | Biogenese von LROs |
| AP3B | δ ; β 3B; σ 3B; μ 3B | Neurone und β -Zellen des Pankreas | Biogenese von LROs |
| AP4 | ϵ ; β 4; σ 4; μ 4 | ubiquitär | TGN-Endosomen Polarisierte Sortierung |
| AP5 | ζ ; β 4; σ 4; μ 4 | ubiquitär | unbekannt |

1.3.2 Signal-abhängiger Transport von lysosomalen Membranproteinen

Die Sortierung von LMPs zum Lysosom erfolgt entweder über den „direkten“ oder den „indirekten“ Weg (Braulke & Bonifacino, 2009). Beim direkten Weg werden LMPs vom

TGN entweder zu frühen/späten Endosomen oder Lysosomen transportiert, ohne an der Zelloberfläche zu erscheinen. Beim indirekten Weg erfolgt der Transport vom TGN zur Plasmamembran, gefolgt von Internalisierung zu frühen/ späten Endosomen und Lysosomen. Dabei gibt es LMPs, die sowohl den direkten als auch den indirekten Weg nutzen (Braulke & Bonifacino, 2009). So wurde gezeigt, dass LAMPs und LIMP2 direkt und indirekt zu Lysosomen sortiert werden (Janvier & Bonifacino, 2005). Der Transport der lysosomalen sauren Phosphatase zu Lysosomen erfolgt indirekt über die Plasmamembran (Braun et al, 1989). Der Transporter Mukolipin 1 wird hingegen über AP1 direkt zum Lysosom transportiert und akkumuliert in AP1-herunterregulierten Zellen im Golgi-Apparat (Miedel et al, 2006). Für das LMP CLN3 wurde gezeigt, dass es direkt über AP1 und AP3 transportiert wird (Kyttälä *et al*, 2005).

Der Transport von LMPs zu Lysosomen erfolgt unabhängig vom M6P-Erkennungsmarker und wird durch Sortierungssignale, die in den zytosolischen Domänen der LMPs lokalisiert sind, vermittelt (Braulke & Bonifacino, 2009). Sortierungssignale sind kurze, lineare Aminosäuresequenzen mit einer Länge von vier bis sieben Aminosäuren, die in Tyrosin-haltige (Konsensussequenzen: **YXXØ** oder **NPXY**) und Di-Leucin-haltige Sortierungssignale (Konsensussequenzen: **[DE]XXXL[LI]** oder **DXLL**) unterteilt werden (kritische Reste sind fett dargestellt, X: beliebige AS, Ø: große, hydrophobe AS; Bonifacino & Traub, 2003). Di-Leucinmotive vom Typ **[DE]XXX L[LI]** interagieren mit einer Kombination aus einer großen und einer kleinen AP-Untereinheit, nämlich den AP1 γ / σ 1-, AP2 α / σ 2- und AP3 δ / σ 3-Hemikomplexen (Janvier *et al*, 2003). Tyrosin-Motive mit der Konsensussequenz-Sequenz **YXXØ** interagieren mit den μ -Untereinheiten der APs 1-3 (Park & Guo, 2014). Die AP4 μ -Untereinheit interagiert mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen vom Typ **YXXØ** der LMPs CD63, LAMP1 und LAMP2A und mit der unkonventionellen Sequenz **YKFFE** in der zytosolischen Domäne des Alzheimer Vorläufer Proteins (APP; Burgos *et al*, 2010). Die Funktion von AP5, interagierende Cargoproteine und beteiligte Sortierungssignale sind bisher unbekannt (Hirst *et al*, 2011). Neben den klassischen Di-Leucin (**[DE]XXXL[LI]**) und Tyrosinmotiven vom Typ **YXXØ** wurden in Cystinosin und CLN3 unkonventionelle Sortierungssignale beschrieben (Cherqui *et al*, 2001; Storch *et al*, 2004). Für die Erkennung und Bindung der Sortierungssignale durch APs ist deren Abstand zur Transmembrandomäne wichtig (Bonifacino & Traub, 2003).

2. Fragestellung

Die CLN7-Erkrankung zählt zur Gruppe der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCLs). NCLs sind neurodegenerative Erkrankungen des Kindesalters und werden bis auf die CLN4 Erkrankung autosomal-rezessiv vererbt. Es wurden Defekte in 13 verschiedenen Genen, die NCL-Erkrankungen auslösen, identifiziert. Die CLN7-Erkrankung wird durch Mutationen im *MFSD8/CLN7*-Gen, das für ein lysosomales Membranprotein mit potentieller Transporterfunktion kodiert, verursacht. Für alle NCLs, außer CLN7 und CLN14, stehen Mausmodelle zur Verfügung, um den zeitlichen Verlauf der neurodegenerativen Veränderungen im Gehirn und Retina *in vivo* zu untersuchen, sowie die Bedeutung der CLN-Defizienz für lysosomale Biogenese und Funktion zu analysieren und experimentelle Therapien zu testen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Mausmodell für die CLN7-Erkrankung zu generieren, das die wesentlichen neuropathologischen, biochemischen und zellulären Merkmale der humanen CLN7-Erkrankung rekapituliert. Schwerpunkte der Untersuchungen sollten Analysen der neurodegenerativen und inflammatorischen Veränderungen im Gehirn des Mausmodells sein. Dabei sollte überprüft werden, ob die Pathomechanismen, die bei anderen LSDs und NCLs identifiziert wurden, zu Neurodegeneration und lysosomaler Dysfunktion bei der CLN7-Erkrankung beitragen. Außerdem sollte die lysosomale Biogenese und Funktion in *Cln7*-defizienten Zellen und Geweben untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung von identifizierten Interaktionen von CLN7 mit Adaptorprotein (AP)-Komplexen für den intrazellulären Transport von CLN7 zum Lysosom *in vivo* analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Autoklav | 3850 EL | Systec (Linden) |
| Biosensor | Biacore 3000 | GE Healthcare (München) |
| Blotdokumentationsanlage | ChemiDoc TM XRS | Bio-Rad (München) |
| CO ₂ -Inkubator | Galaxy [®] 170S | New Brunswick (Hamburg) |
| Digital Kamera | MegaViewIII | A. Tröndle (Moorenweis) |
| Dounce-Homogenisator | 1 ml | Wheaton (Millville, USA) |
| Drehrad | Rotator | Neolab (Heidelberg) |
| Druckhomogenisator | EmulsiFlex | Avestin (Ottawa, Kanada) |
| Eismaschine | AF10 | Scotsman (Vernon Hills, USA) |
| Elektronenmikroskop | EM902 | Zeiss (Oberkochen) |
| FACS | Canto II | BD Biosciences (Heidelberg) |
| FACS | MoFlo Cell Sorter | Beckman Coulter (High Wycombe, UK) |
| Feinwaage | AC 100 | Mettler Toledo (Gießen) |
| Filmentwickler | Curix 60 | Agfa (Mortsel, Belgien) |
| Filmkassetten | X-Ray Cassette | Rego (Augsburg) |
| Fluoreszenzdetektor | MX3000P | Stratagene (USA) |
| Geldokumentationsanlage | E Box VX2 | Vilber (Eberhardzell) |
| Gelelektrophoresekammer (Agarosegele) | PerfectBlue Maxi M | Peqlab (Erlangen) |
| Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE) | PerfectBlue Twin M | Peqlab (Erlangen) |
| Geltrockner | GelAir Dryer | Bio-Rad (München) |
| Heizblock | HLC by | Ditabis (Pforzheim) |

| | | |
|---------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Inkubator | Innova 4230 | New Brunswick (Hamburg) |
| Inverses Mikroskop | CKX31 | Olympus (Hamburg) |
| Konfokales Fluoreszenzmikroskop | DM IRE2 | Leica (Wetzlar) |
| Magnetrührer | MR Hei-Mix D | Heidolph (Schwabach) |
| Mikrowelle | Promicro | Whirlpool (Stuttgart) |
| pH-Meter | MP220 | Mettler Toledo (Gießen) |
| Photometer | BioPhotometer | Eppendorf (Hamburg) |
| Pipetten | Research plus | Eppendorf (Hamburg) |
| Pipettierhilfe | peqMATE | Peqlab (Erlangen) |
| Schüttler | Innova 4080 | New Brunswick (Hamburg) |
| Semi-Dry Electrobloetter | PerfectBlue™ | Peqlab (Erlangen) |
| Spannungsquelle | PeqPOWER E300 | Peqlab (Erlangen) |
| Spektrophotometer | Nanodrop ND-1000 | Peqlab (Erlangen) |
| Sterilwerkbank | Herasafe KS | Thermo Scientific (Braunschweig) |
| Stickstofftank | ARPEGE 55 | Air liquide (Stelle) |
| Thermocycler | PeqSTAR | Peqlab (Erlangen) |
| Ultraschallgerät | Sonopuls | Bandelin (Berlin) |
| Ultrazentrifuge | Sorvall Discovery™ M120 | Thermo Scientific (Braunschweig) |
| UV-Lampe | N36K | Konrad Benda-Herolab (Wiesloch) |
| Vakuumpumpe | PC 2004 VARIO | Vacuubrand (Wertheim) |
| Vibratom | VT1000S | Leica (Wetzlar) |
| Vortexer | peqTWIST | Peqlab (Erlangen) |
| Waage | MR Hei-MixD | Heidolph (Schwabach) |
| Wasserbad | WBT 22 | Roth (Karlsruhe) |
| Zentrifugen | 5424R, 5415D, 5804R | Eppendorf (Hamburg) |
| γ-Szintillationscounter | Wallac 1470 | Perkin Elmer (Waltham, USA) |

3.1.2 Verbrauchsmaterial

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen | Greiner Bio One (Frickenhausen) |
| 96-Well-Platte | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Cellophanfolien | Pütz Folien (Taunusstein) |
| Deckgläser | Roth (Karlsruhe) |
| FACS-Röhrchen | BD Biosciences (Heidelberg) |
| Glaspipetten | Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim v. d. Rhön) |
| Glasplättchen | Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim v. d. Rhön) |
| Immersionsöl 518 C | Zeiss (Oberkochen) |
| Kanülen | BD (Heidelberg) |
| Kryoröhrchen | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Küvetten | Brand (Wertheim) |
| Linsenpapier MN 10 B | Zeiss (Oberkochen) |
| Nitrozellulosemembran Protran™ | Whatman GmbH (Dassel) |
| Parafilm | Bemis (Wisconsin, USA) |
| Petrischalen | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Pipetten | Eppendorf (Hamburg) |
| Pipettenspitzen | Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht) |
| Protein LoBind Tubes | Eppendorf (Hamburg) |
| Reaktionsgefäße (0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Röntgenfilme | GE Healthcare (München) |
| Skalpelle | BBraun (Melsungen) |
| Spritzen | BBraun (Melsungen) |
| Spritzenvorsatzfilter | VWR (Darmstadt) |
| Superfrost Plus Objektträger | Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim v. d. Rhön) |
| Szintillations-Röhrchen | Perkin-Elmer (Waltham, USA) |
| Whatman-Papiere | Roth (Karlsruhe) |
| Zellkulturflaschen | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Zellschaber | Sarstedt (Nümbrecht) |

3.1.3 Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| [³⁵ S]-Methionin (Aktivität 1 mCi/mmol) | Hartmann Analytik (Braunschweig) |
| 1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide, hexadimethrine bromide (Polybrene) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Roth (Karlsruhe) |
| 2,5-Diphenyloxazol (PPO) | Roth (Karlsruhe) |
| 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Kaliumhexacyanidoferrat (K ₄ Fe(CN) ₆) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| 3-[3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) | Merck Millipore (Darmstadt) |
| 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) | Roth (Karlsruhe) |
| Acrylamid | Roth (Karlsruhe) |
| Agar | Roth (Karlsruhe) |
| Agarose | AppliChem (Darmstadt) |
| Ammoniumchlorid | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Roth (Karlsruhe) |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Serva (Heidelberg) |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Merck (Darmstadt) |
| Chloroform | J.T.Baker (Griesheim) |
| Coomassie [®] Blue R | Serva (Heidelberg) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO; C ₂ H ₆ OS) | Roth (Karlsruhe) |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck (Darmstadt) |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| DNase I | Roche (Mannheim) |
| Essigsäure | Merck (Darmstadt) |
| Ethanol | Merck (Darmstadt) |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| EZ-Link Sulfo-NHSSS Biotin | Thermo Scientific (Braunschweig) |
| G418, Geneticin [®] | Life Technologies (Darmstadt) |
| Glutaraldehyd | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |

| | |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Glutathion reduziert | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Glutathion-Agarose | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Glycerin | Roth (Karlsruhe) |
| Glycin | Roth (Karlsruhe) |
| Hefeextrakt | Roth (Karlsruhe) |
| Imidazol | AppliChem (Darmstadt) |
| Isopropanol | Roth (Karlsruhe) |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Roth (Karlsruhe) |
| Kaliumchlorid | Roth (Karlsruhe) |
| Ketanest S (Ketamin) | Pfizer (Karlsruhe) |
| L-Methionin | Roth (Karlsruhe) |
| Luminol | Roth (Karlsruhe) |
| Lysozym | Serva (Heidelberg) |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Mannose-6-Phosphat-Natriumsalz | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Methanol | Merck (Darmstadt) |
| Milchpulver | Roth (Karlsruhe) |
| Natriumchlorid | Roth (Karlsruhe) |
| Natriumdeoxycholat | Merck (Darmstadt) |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | Merck (Darmstadt) |
| N-ethyl-N'-(dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| N-Hydroxysuccinimid | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Ni-NTA-Agarose | Life Technologies (Darmstadt) |
| NNN'N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Nonidet P 40 (NP40) | Roche (Mannheim) |
| Osmiumtetroxid | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| p-Cumarinsäure | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Poly-D-Lysin | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |

| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| Propylenoxid | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Protaminsulfat | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Protein G-Sepharose | GE Healthcare (München) |
| Salzsäure | Merck (Darmstadt) |
| Saponin | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Sedaxylan (Xylazin) | WDT (Garbsen) |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Sukrose | Roth (Karlsruhe) |
| Toluidinblau | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Trizma [®] Base | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Trizol Reagent | Life Technologies (Darmstadt) |
| Trypton/Pepton | Roth (Karlsruhe) |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Wasserstoffperoxid | Merck (Darmstadt) |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |

3.1.4 Puffer und Lösungen

| Puffer/ Lösung | Hersteller |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| 6x Loading Dye | Thermo Scientific (Braunschweig) |
| Aqua-Poly/Mount [®] | Polysciences, Inc. (Eppenheim) |
| Cacodylat-Puffer | Morphisto [®] (Frankfurt) |
| <i>epoxy embedding medium</i> (Epon) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Proteaseinhibitor | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |

3.1.5 Kits

| Kit | Hersteller |
|----------------------------------------------------|----------------------------------|
| GeneJet-Plasmid-Minipräpkit | Thermo Scientific (Braunschweig) |
| GeneJet [™] -Gelextraktionskit | Life Technologies (Darmstadt) |
| High-Capacity cDNA Reverse Transkriptasekit | Life Technologies (Darmstadt) |
| jetPEI [™] -Polyplus Transfektionsreagenz | Peqlab (Erlangen) |
| KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit | Peqlab (Erlangen) |

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| Lipofectamine® 2000 Reagent | Life Technologies (Darmstadt) |
| Phusion High-Fidelity PCR Kit | Life Technologies (Darmstadt) |
| Protein Assay | Biorad (München) |
| QIAquick®-Plasmid-Midipräparationskit | Qiagen (Hilden) |
| Rapid DNA Ligation Kit | Roche (Mannheim) |
| TransIT®-293 Transfection Reagent | Mirus (Madison, USA) |

3.1.6 Vektoren

pLXIN modifiziert (Prof. Robinson, Cambridge, UK)

pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia, Freiburg)

p3xFLAG-CMV™-10 (Sigma Aldrich, Deisenhofen)

pET-28b-μ1A (Prof. Höning, Köln)

pET-28a-μ2 (Prof. Höning, Köln)

pET28a-μ3A (Prof. Höning, Köln)

3.1.7 siRNA

Die siGENOME SMARTpool wurden von der Firma Dharmacon bezogen.

Human AP1G1 (NM_001128) M-019183-01

Human AP2A1 (NM_014203) M-012492-00

Human AP3D1 (NM_003938) M-016014-02

Human AP4E1 (NM_007347) M-021474-01

siRNA gegen AP2A1 und AP2A2 wurden von dem Labor von Prof. Margaret S. Robinson (Universität Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

3.1.8 Primer

CLN7 For: 5'-GTA^TCTCGAATTCGCCACCATGGCCGGCCTGCGGAACGAA-3'

CLN7 Rev: 5'-TGGTCGCTCGAGTTATTCCTGAATCCTCCCATATCTTACAG-3'

Mfsd8-F: 5'-TGGTGCATTAATACAGTCCTAGAATCC-3'

Mfsd8-R: 5'-CTAGGGAGGTTTCAGATAGTAGAACCC-3'

15472-F: 5'-TTCCACCTAGAGAATGGAGCGAGATAG-3'

5-FRT-R: 5'-CCACAACGGGTTCTTCTGTT-3'

3.1.9 Peptide

Die CLN7-CT Peptide wurden von der Firma Innovative Peptide Solutions (Berlin) mit einem Reinheitsgrad > 95% synthetisiert. Zur chemischen Kopplung an den CM5 Sensorchip wurden die Peptide N-terminal mit einem Cysteinrest synthetisiert. Ein Doppelvalin wurde als Spacersequenz eingefügt.

CVV-YKRLIALSVRYGRIQE

CVV-AKRLIALSVRYGRIQE

CVV-YKRLIALSVRAGRIQE

CVV-AKRLIALSVRAGRIQE

3.1.10 Assays für quantitative *Realtime* PCR

| Gen (Protein) | Assay (Primer und Sonde) |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Aktb</i> (β -Aktin) | Mm00607939_s1 |
| <i>Ctsb</i> (Cathepsin B) | Mm01310506_m1 |
| <i>Ctsd</i> (Cathepsin D) | Mm00515587_m1 |
| <i>Ctsz</i> (Cathepsin Z) | Mm00517687_m1 |
| <i>Ftl1</i> (<i>Ferritin light chain 1</i>) | Mm03030144_g1 |
| <i>Mfsd8</i> (Cln7) Exon 1/2 | Mm01294801_m1 |
| <i>Mfsd8</i> (Cln7) Exon 5/6 | Mm00511384_m1 |
| <i>Slc11a2</i> (<i>proton-coupled divalent metal ion transporter 1</i>) | Mm00435363_m1 |
| <i>Slc40a1</i> (<i>ion regulated transporter</i>) | Mm00489837_m1 |

3.1.11 Antikörper

Tabelle 4 Primärantikörper

| Primärantikörper | Spezies | Verdünnung | Hersteller |
|------------------|---------|------------|-----------------------------|
| AP1 γ | Maus | WB 1:1000 | BD Biosciences (Heidelberg) |
| AP2 α | Maus | WB 1:1000 | BD Biosciences (Heidelberg) |
| AP3 δ | Maus | WB 1:1000 | BD Biosciences (Heidelberg) |

| | | | |
|-------------------------------------------------|-----------|---------------------------------|---------------------------------------------|
| AP4 ϵ | Maus | WB 1:500 | BD Biosciences (Heidelberg) |
| Beclin | Kaninchen | WB 1:1000 | Santa Cruz (Santa Cruz, USA) |
| Calbindin | Maus | IH: 1:400 | Novocastra |
| Cathepsin B (GT15047) | Ziege | WB 1:2000 | Neuromics (Edina, USA) |
| Cathepsin D | Kaninchen | IF 1:150 | Prof. Hasilik (Marburg) |
| Cathepsin D (sc6486) | Ziege | WB 1:500 | Santa Cruz (Santa Cruz, USA) |
| Cathepsin Z (AF1033) | Ziege | WB 1:250, IH 1:50 | R&D Systems (Minneapolis, USA) |
| Cln7 | Kaninchen | WB: 1:1000 | (Damme <i>et al</i> , 2014) |
| c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase | Kaninchen | WB 1:3000, IH 1:100 | Prof. Neufeld (UCLA, Los Angeles USA) |
| FLAG (M2) | Maus | WB: 1:1000 | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| Gapdh | Kaninchen | WB 1:1000 | Santa Cruz (Santa Cruz, USA) |
| GFAP (M0761) | Maus | IH 1:200 | Dako (Jena) |
| HA (16B12) | Maus | FACS 1:500, IF 1:500, WB 1:1000 | Covance (London, UK) |
| Iba-1 | Kaninchen | IH 1:1500 | Wako (Neuss) |
| Lamp 1 (1D4B) | Ratte | WB 1:500, IF 1:150, IH 1:50 | Hybridoma Facility (Iowa, USA) |
| Lamp2 (abl93) | Ratte | WB 1:500 | Hybridoma Facility (Iowa, USA) |
| LC3b | Kaninchen | WB 1:3000 | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| NeuN | Maus | IH 1:50 | Merck Millipore (Darmstadt) |
| P62 (SQSTM1) | Kaninchen | WB 1:1000, IH 1:200 | MBL International Corporation (Woburn, USA) |

| | | | |
|---------------------------|-------|-------------------------|--------------------------------------|
| Sapoin D | Ziege | WB 1:1000, IH 1:1000 | Prof. Sandhoff (Universität Bonn) |
| Ubiquitin (P4D1) | Maus | WB 1:1000, IH 1:200 | Cell Signaling (Danvers, USA) |
| α -Tubulin (T9026) | Maus | WB: 1:2000 | Sigma-Aldrich (Deisenhofen) |
| β -Tubulin (E7) | Maus | WB 1:3000 | Hybridoma Facility (Iowa, USA) |

Tabelle 5 Sekundärantikörper

| Sekundärantikörper | Verdünnung | Hersteller |
|------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------|
| Histofine [®] Simple Stain [™] MAX PO (Kaninchen) | IH: unverdünnt | Nichirei Biosciences Inc. (Tokyo, Japan) |
| Histofine [®] Simple Stain [™] MAX PO (Maus) | IH: unverdünnt | Nichirei Biosciences Inc. (Tokyo, Japan) |
| Histofine [®] Simple Stain [™] MAX PO (Ziege) | IH: unverdünnt | Nichirei Biosciences Inc. (Tokyo, Japan) |
| Kaninchen Anti-Ziege IgG HRP | WB 1:3000 | Dianova (Hamburg) |
| Ziege Anti-Kaninchen IgG HRP | WB 1:5000 | Dianova (Hamburg) |
| Ziege Anti-Maus Alexa Fluor [®] 647 | FACS 1:500 | Life Technologies (Darmstadt) |
| Ziege Anti-Maus IgG HRP | WB 1:3000 | Dianova (Hamburg) |
| Ziege Anti-Ratte Alexa Fluor [®] 488 | IF 1:1000 | Life Technologies (Darmstadt) |
| Ziege Anti-Ratte IgG HRP | WB 1:3000 | Dianova (Hamburg) |

3.1.12 Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|---------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>EcoRI</i> | Thermo Scientific (Braunschweig) |
| Peptide- <i>N</i> -glycosidase F (PNGase F) | Roche (Mannheim) |
| <i>Xho I</i> | Thermo Scientific (Braunschweig) |

3.1.13 DNA- und Molekulargewichtsmarker

GeneRuler™ 1 kb DNA-Standard, PageRuler™ Prestained Molekulargewichtsstandard (Thermo Scientific, Braunschweig)

3.1.14 Säule

HiLoad 16/60 Superdex 200 pg

3.1.15 Zelllinien und Kulturmedien

HEK293T (*human embryonic kidney*)- und HeLa (Henrietta Lacks)-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Phoenix-Zellen wurden vom Labor von Prof. Margaret S. Robinson in Cambridge zur Verfügung gestellt.

HEK293T-, HeLa-, Phoenix-Zellen und embryonale Mausfibroblasten wurden in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert:

- Kulturmedium: DMEM, 10 % FKS und 100 IU/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, 1 x GlutaMAX™

| Medium/ Reagenz | Hersteller |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| DMEM | Life Technologies (Darmstadt) |
| DMEM ohne Methionin und Glutamin | MP Biomedicals (Ohio, USA) |
| Fötale Kälberserum (FKS) | GE Healthcare (München) |
| GlutaMAX™ (100 x) | Life Technologies (Darmstadt) |
| Opti-MEM® | Life Technologies (Darmstadt) |
| Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Pen und 10 mg/ml Strep) | Life Technologies (Darmstadt) |
| Phosphate-buffered saline (PBS) | Life Technologies (Darmstadt) |
| Trypsin/EDTA | Life Technologies (Darmstadt) |

3.1.16 Bakterienstämme und Kulturmedien

BL21, Top10

- LB-Medium: 10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
- LB-Platten: 15 g/l Agar in LB-Medium
- 2YT Medium: 16 g/l Trypton/Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0

Antibiotikumzugabe nach Bedarf: 100 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin

3.1.17 Software

| Software | Hersteller |
|-------------------------------|----------------------------------------------|
| Adobe Photoshop 7.0 | Adobe (München) |
| BLAST [®] | National Library of Medicine (Bethesda, USA) |
| Corel Draw X5 | Corel (Unterschleißheim) |
| Endnote X3 | Thomson Reuters (Frankfurt a. Main) |
| FinchTV v1.4.0 | Geospiza, Inc. (Seattle, USA) |
| FlowJo | FlowJo Enterprise (Ashland, USA) |
| GraphPad PRISM | GraphPad Software (La Jolla, USA) |
| Image Lab [™] | Bio-Rad (München) |
| Leica Confocal Software v2.61 | Leica (Wetzlar) |
| Microsoft Office 2013 | Microsoft (Redmond, USA) |
| MxPro-qPCR Software | Agilent Technologies (Waldbronn) |
| Quantity One v4.6.7 | Bio-Rad (München) |

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen mit Plasmid-DNA

50 µl kompetente *E. coli* Top10- bzw. *E. coli* BL21- Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Ligationsansatz oder 50 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für 45 sek bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert und sofort für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf einer LB-Platte, die Carbenicilin bzw. Kanamycin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur längeren Aufbewahrung wurden die LB-Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung hochreiner Plasmid-DNA wurden das GeneJet[®]-Plasmid-Minipräparationskit und das QIAquick[®]-Plasmid-Midipräparationskit nach den Herstellerangaben verwendet.

3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA-Sequenzen wurde das Phusion High-Fidelity PCR Kit verwendet. Die Phusion DNA-Polymerase besitzt aufgrund ihrer 3'→5' Exonuklease-Aktivität eine Korrekturlese-Funktion und ist daher für die genaue Amplifizierung und anschließende Klonierung von PCR-Fragmenten geeignet. Folgender PCR-Ansatz wurde in 200 µl Reaktionsgefäße pipettiert.

| Reagenz | Volumen/Menge |
|------------------------|---------------|
| 5 x Phusion HF Buffer | 10 µl |
| 10 mM dNTPs | 1 µl |
| Primer A | 0,5 µM |
| Primer B | 0,5 µM |
| cDNA | 50 ng |
| Phusion DNA Polymerase | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | auf 50 µl |

Folgendes PCR-Programm wurde mit dem PeqSTAR Thermocycler gestartet:

| Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------|----------|--------|
| 98 °C | 30 sek | 1 |
| 98 °C | 10 sek | 35 |
| 60-75 °C | 30 sek | |
| 72 °C | 1 min/kb | |
| 72 °C | 10 min | 1 |

Zur Überprüfung der Längen der amplifizierten PCR-Produkte und der erzielten Ausbeuten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zusammen mit einem DNA-Längenstandard durchgeführt.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten wurde Agarose (1-2 % w/v) in TAE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/µL) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Loading Dye gemischt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 120 V für 20-30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Ethidiumbromid bindet an DNA, wodurch diese unter UV-Licht mit Hilfe der Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht werden kann. GeneRuler™ 1 kb wurde als DNA-Längenstandard verwendet.

- TAE-Puffer: 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, 40 mM Tris/HCl pH 8,5

3.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit dem Skalpell herausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem GeneJet™-Gelextraktionskit nach den Herstellerangaben extrahiert.

3.2.6 Restriktionsspaltung

Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen palindromischen DNA-Sequenzen und erlauben die Klonierung von DNA- und PCR-Fragmenten in Plasmid-DNA. Zur Restriktionsspaltung von Vektor-DNA oder PCR-Produkten wurden pro Ansatz ca. 0,1 -2 µg DNA und 0,5-2 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktionsspaltung wurde ein Aliquot des Ansatzes zusammen mit einem DNA-Längenstandard auf einem

analytischen Agarosegel aufgetrennt und die Basenpaarlängen der DNA-Fragmente bestimmt.

| Reagenz | Volumen/Menge |
|-------------------------|---------------|
| DNA | 0,5-1 µg |
| 10 x FastDigest®-Puffer | 2 µl |
| Restriktionsenzym(e) | 1 µl |
| ddH ₂ O | auf 20 µl |

3.2.7 Ligation

DNA-Fragmente wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit nach folgendem Pipettierschema ligiert:

| Reagenz | Volumen/Menge |
|---------------------|------------------------|
| Vektor-DNA | 30 ng |
| DNA-Fragment | 3 x molarer Überschuss |
| Ligase (1 Unit/µl) | 1 µl |
| 2 x Ligation Buffer | 10 µl |
| ddH ₂ O | auf 20 µl |

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert und 2 µl davon in kompetente *E. coli* Top10 Zellen transformiert.

3.2.8 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen Seqlab (Göttingen) und Source Biosciences (Cambridge, Großbritannien) durchgeführt. Für die DNA-Sequenzierung von Seqlab wurde eine Mischung von 1,2 µg Plasmid-DNA bzw. 125-375 ng PCR-Produkt mit 30 pmol des Sequenzierungsprimers in einem Endvolumen von 15 µl versendet. Für DNA-Sequenzierungen bei Source Biosciences wurden 100 ng Plasmid-DNA und 3,2 µM Sequenzierungsprimer in einem Volumen von je 5 µl in separaten Reaktionsgefäßen verschickt.

3.2.9 Genotypisierung von *Cln7* (*tm1a/tm1a*) und *Cln7* (*-/-*) Mäusen

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien, Mausembryonen und embryonalen Fibroblasten und dessen Genotypisierung erfolgte mit dem KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit nach den Herstellerangaben. Für die Genotypisierung der Mäuse mit *tm1a*-Allel wurden die Primer *Mfsd8-F*, *Mfsd8-R* und *5-FRT-R* und für die Mäuse mit *tm1d*-Allel die Primer *Mfsd8-F*, *Mfsd8-R* und *15472-F* verwendet. Folgendes PCR-Programm wurde mit dem PeqSTAR Thermocycler gestartet:

| Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------|--------|--------|
| 95 °C | 3 min | 1 |
| 95 °C | 15 sek | 35 |
| 55 °C | 15 sek | |
| 72 °C | 30 sek | |
| 72 °C | 5 min | 1 |

Die Längen der amplifizierten PCR-Produkte wurden durch den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard auf einem 1,5 %-igen Agarosegel analysiert.

3.2.10 Isolierung von RNA aus Gewebe

Die Isolierung von RNA aus Gewebe erfolgte mit dem Trizol Reagent von Life Technologies nach den Herstellerangaben. Ca. 50 mg Gewebe wurden mit dem Dounce-Homogenisator mit 40 Hüben homogenisiert.

3.2.11 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde mit dem NanoDrop durchgeführt. Dieser misst die Extinktion der Nukleinsäuren bei 260 nm. Bei doppelsträngiger DNA entspricht die Extinktion $OD_{260} = 1$ der DNA-Konzentration 50 µg/mL und der RNA-Konzentration 40 µg/mL. Der Quotient der Extinktionen OD_{260}/OD_{280} ist ein Wert für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte für DNA bei 1,8-2,0 und für RNA bei 2,0 liegen.

3.2.12 Herstellung von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transkriptasekit nach den Herstellerangaben. Vorher wurde auf einem 1 %-igen Agarosegel überprüft, dass die RNA nicht degradiert war. Für die reverse Transkription wurde folgendes Temperaturprofil im PeqSTAR Thermocycler (Peqlab) verwendet:

| Temperatur | Dauer |
|------------|---------|
| 25 °C | 10 min |
| 37 °C | 120 min |
| 85 °C | 5 min |

3.2.13 Quantitative *Realtime* PCR

Die quantitative *Realtime* PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerasenkettenreaktion und misst zusätzlich die Menge des synthetisierten DNA-Produkts in Echtzeit. Hierfür wurden TaqMan[®]-Genexpressionsassays verwendet. Jeder Assay beinhaltet ein Primerpaar (*forward* und *reverse*) innerhalb des Zielgens und eine TaqMan[®]-Sonde, die spezifisch zwischen *forward*- und *reverse*-Primer an die cDNA bindet. Die TaqMan[®]-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem nicht fluoreszierenden Quencher markiert. Die TaqMan[®]-Polymerase besitzt eine zusätzliche 5'-3' Nukleaseaktivität und setzt bei Erreichen der Sonde die Reporter-Fluoreszenz frei. Diese verhält sich proportional zur synthetisierten DNA-Menge. Der Zyklus, indem die detektierte Fluoreszenz signifikant über den Hintergrundwert steigt, definiert den C_T-Wert (*cycle of threshold*). Folgender Reaktionsansatz wurde in dreifacher Ausführung pipettiert:

| Reagenz | Volumen/Menge |
|---------------------------------------------------|---------------|
| 2x TaqMan [®] Gene Expression Master Mix | 10 µl |
| TaqMan [®] Gene Expression Assay | 1 µl |
| cDNA | 2 µl |
| dd H ₂ O | 7 µl |

Folgendes Programm wurde für die *Realtime* PCR gestartet:

| Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------|-------|--------|
|------------|-------|--------|

| | | |
|-------|--------|----|
| 95 °C | 10 min | 1 |
| 95 °C | 15 sek | 40 |
| 60 °C | 1 min | |

Die Analyse der Fluoreszenzintensität erfolgte durch den Fluoreszenzdetektor MX3000PTM.

Für die Auswertung der Daten wurde zunächst der ΔC_T -Wert berechnet, wobei als Standardwert β -Aktin gemessen wurde: $\Delta C_T = C_T (\text{Gen}) - C_T (\text{Standard})$

Danach wurde die Differenz zur Kontrollgruppe gebildet (z.B. zum Wildtyp):

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (1) - \Delta C_T (2)$, um schließlich aus dem $\Delta\Delta C_T$ -Wert die relative Expression nach folgender Formel zu berechnen: relative Expression (1/2) = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und zwei bis drei Mal wöchentlich passagiert, wenn eine Konfluenz von 80-100 % erreicht war. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert, bis sich alle adhären Zellen abgelöst hatten. Zur Inhibition von Trypsin wurden 9 ml Kulturmedium zu der Zellsuspension pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Je nach Zelllinie wurden sie im Verhältnis 1:10 – 1:3 in frischem Kulturmedium verdünnt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten fanden in einer Sterilwerkbank und mit sterilen Materialien statt.

3.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Einfrieren wurden sie mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin bei 37 °C inkubiert, bis sich alle Zellen lösten. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde die Zellsuspension in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 900 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1-5 ml Einfriermedium aufgenommen, auf Kryoröhrchen verteilt und zunächst in einem mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter auf -80 °C heruntergekühlt. Für eine

Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 900 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand inklusive DMSO wurde abgesaugt und das Zellpellet zur Kultivierung in frischem Kulturmedium aufgenommen.

- Einfriermedium: 10 % (v/v) DMSO in FKS

3.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit *small interfering RNA* (siRNA)

Bei der RNA-Interferenz wird synthetisch hergestellte siRNA in eukaryotische Zellen durch Lipofektion eingebracht, um eine bestimmte Ziel-*mRNA* möglichst quantitativ herunterzuregulieren. Die transiente Transfektion von siRNA wurde mit Lipofectamine® der Transfektionsansatz nach Erreichen einer 50-70 %-igen Konfluenz tröpfchenweise auf den Zellen verteilt. 48 Stunden nach Beginn der ersten Transfektion wurden die Zellen passagiert und erneut mit siRNA transfiziert. Falls erforderlich wurde Expressionsvektoren 72 Std. nach Beginn der ersten siRNA-Transfektion transfiziert und die Zellen nach 96 h analysiert. Als Negativkontrolle wurde *non-target* siRNA. Die siRNA-Transfektionseffizienz und die Herunterregulierung des Zielproteins wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

| Petrischale | RNA | Optimem | Lipofectamin 2000 | Optimem | Kulturmedium |
|-------------|----------|---------|-------------------|---------|--------------|
| 12 well | 50 pmol | 95 µl | 2,5 µl | 95 µl | 800 µl |
| 3,5 cm | 100 pmol | 195 µl | 5 µl | 195 µl | 1,6 ml |

3.3.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsvektoren

Für die transiente Transfektion von adhären Zellen wurde das jetPEI™-Transfektionsreagenz nach den Herstellerangaben verwendet. Zellen wurden ausplattiert und bei einer Konfluenz von ca. 80 % je nach Größe der Petrischale mit verschiedenen Mengen an DNA und jetPEI™ transfiziert.

| Petrischale | DNA | NaCl | jetPEI™ | NaCl | Kulturmedium |
|-------------|------|------------|---------|------------|--------------|
| 3,5 cm | 3 µg | auf 100 µl | 6 µl | auf 100 µl | 1,8 ml |

| | | | | | |
|-------|-------|------------|-------|------------|---------|
| 6 cm | 5 µg | auf 250 µl | 10 µl | auf 250 µl | 4,5 ml |
| 10 cm | 10 µg | auf 250 µl | 20 µl | auf 250 µl | 10,5 ml |

3.3.5 Transduktion von Zellen

Zur effizienten Herstellung stabil exprimierender Zellen wurde eine retrovirale Transduktionsmethode verwendet. Dies wurde im Labor von Prof. Margaret S. Robinson in Cambridge, Großbritannien durchgeführt. Für die Herstellung des Retrovirus wurden als Verpackungszelllinie Phoenix-Zellen verwendet (Prof. Garry Nolan, Stanford University, USA). Sie basieren auf HEK293T-Zellen, kodieren jedoch zusätzlich für die retroviralen Proteine *gag* (*group specific antigen*), *env* (*envelope*) und *pol* (*polymerase*). Phoenix-Zellen wurden in Kulturmedium kultiviert und mit dem *TransIT*[®]-293 Transfection Reagent nach den Herstellerangaben transfiziert. Als retrovirale Expressionsvektoren wurden pLXIN-CLN7-HA lum und pLXIN-CLN7-HA lum L^{13L14}-AA, die eine G418, Geneticin[®]-Resistenz besitzen, verwendet. Die Virusproduktion fand zunächst für 24 h bei 37 °C und dann für 24 h bei 33 °C statt. Für die Transduktion wurde der virale Überstand durch einen Spritzenvorsatzfilter (Durchmesser 0,45 µm) gegeben und mit 50 µg/ml Polybrene versetzt, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Es wurden je 2 ml viraler Überstand auf die zu transduzierenden HeLa-Zellen pipettiert. Diese wurden vorher auf eine 3,5-cm Petrischale ausplattiert und das Medium für die Transduktion abgesaugt. Nach 48 h fand eine einwöchige Selektion der Zellen mit G418, Geneticin[®] statt. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot-Analyse überprüft.

3.3.6 Immunfluoreszenz-Analysen von kultivierten Zellen

Zunächst wurden Glasdeckgläschen (Durchmesser: 12 mm) durch Einlegen in 70% Ethanol sterilisiert und in 24 well Petrischalen gelegt. Adhärenz Zellen wurden aufplattiert und je nach Fragestellung mit einer Konfluenz von 60 % transient transfiziert oder fixiert. Zur Fixierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bei RT für 20 min mit 4 % PFA in PBS inkubiert. Um freie Aldehydgruppen des PFA zu quenchen, wurden die Zellen für 5 min mit 50 mM NH₄Cl inkubiert, anschließend für 10 min mit PBS-Sap permeabilisiert und wiederum für 30 min in PBS-Sap-BSA inkubiert, um unspezifischer Epitope zu blockieren. Die Primärantikörper wurden in PBS-Sap-BSA

verdünnt (Tabelle 4) und für 1 Std. bei RT auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Deckgläschen drei Mal mit PBS-Sap-BSA gewaschen und die Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper in PBS-Sap-BSA (Tabelle 5) 30 min auf den Zellen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Sap wurden zur Darstellung der Zellkerne die Zellen für 5 min mit DAPI (2 µg/ml in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Aqua-Poly/Mount[®] eingebettet und über Nacht getrocknet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop Leica DM IRE2 unter Verwendung der Argonionen-Laser (Anregungswellenlängen: 488nm) und HeNe-Laser (Anregungswellenlänge: 543nm) durchgeführt. Die Überlagerung der Bilder wurde mit Adobe Photoshop 7.0 durchgeführt.

- 4 % PFA, PBS
- PBS-Sap: 0,1 % Saponin, PBS
- PBS-Sap-BSA: 3 % BSA, 0,1 % Saponin, PBS

3.3.7 Messung der Zelloberflächenkonzentration von Proteinen durch FACS-Analyse

Um die Oberflächenlokalisierung von Proteinen zu quantifizieren, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin bei 37 °C inkubiert und in 5-10 ml Kulturmedium aufgenommen, um sie in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen zu überführen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 900 x g wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und auf eine 96-Well-Platte transferiert. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS wurde mit 0,5 % BSA/PBS für 20 min blockiert, um unspezifische Antikörperbindung zu verringern. Danach erfolgte die Inkubation des in 0,5 % BSA/PBS verdünnten Primärantikörpers (Tabelle 4) für 20 min auf Eis. Die Zellen wurden drei Mal mit 200 µl eiskaltem PBS gewaschen und mit dem Alexa-Fluor[®]-647-gekoppelten Zweitantikörper (Tabelle 5) in 0,5 % BSA/PBS für 20 min unter Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Zellpellet in 300 µl PBS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und mittels FACS Canto II analysiert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Membranlysaten aus Gewebe/ Zellen

Gewebe/ Zellpellets wurden in 5-fachem Volumen Homogenisierungspuffer mit einem Dounce-Homogenisator (40 Hübe) homogenisiert und bei 4 °C und 1000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 20 000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 50-200 µL Lysispuffer aufgenommen, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Homogenate 10 min bei 20 000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

- Homogenisierungspuffer: 250 mM Sukrose, 1 mM EDTA, 10 mM Natriumphosphatpuffer, Proteaseinhibitor
- Lysispuffer: 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7,4, Proteaseinhibitor

3.4.2 Herstellung von Triton X-100-löslichen und -unlöslichen Lysaten aus Gewebe

Gewebe wurde in 5-fachem Volumen Sukrosepuffer mit einem Dounce-Homogenisator (40 Hübe) homogenisiert und bei 4 °C und 1000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der gleichen Menge Triton X-100/PBS versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Auftrennung in die Triton X-100 löslichen und -unlöslichen Fraktionen wurde eine Zentrifugation bei 13 000 x g für 15 min angeschlossen. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und das Pellet zunächst in PBS gewaschen und schließlich in SDS/ PBS-Puffer gelöst. Dabei wurde die Menge an SDS/ PBS-Puffer an die Proteinkonzentration der löslichen Fraktion angepasst.

- Sukrosepuffer: 250 mM Sukrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/ HCl pH 7,4, Proteaseinhibitor
- Triton X-100/PBS: 1 % Triton X-100, PBS
- SDS/ PBS-Puffer: 2 % SDS, PBS

3.4.3 Herstellung von RIPA-Fraktionen aus Gewebe

Für Western-Blot-Analysen von Prosaposin, Saposin D und Lamp1 wurden RIPA-Fraktionen aus Gewebe hergestellt (Götzl *et al*, 2014). Dazu wurde das Gewebe in 5-

fachem Volumen HS-Puffer mit einem Dounce-Homogenisator (40 Hübe) homogenisiert und bei 4 °C und 14 000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet je nach Größe in 100-300 µl RIPA-Puffer resuspendiert und in der Ultrazentrifuge bei 100 000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels Tris-Tricin-Gelelektrophorese aufgetrennt.

- HS-Puffer (*high salt*): 0,5 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% Sukrose, 10 mM Tris/ HCl pH 7,5, Proteaseinhibitor
- RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,05 % Triton X-100, 0,5 % Natrium-Desoxycholat, 2,5 mM EDTA, 20 mM Tris/ HCl pH 7,4

3.4.4 Herstellung von Lysaten aus Zellen

Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, abgeschabt und in PBS bei 1000 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde je nach Größe in 50-300 µL Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, wobei regelmäßig gevortext wurde. Das Homogenat wurde anschließend bei 16 000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

- Lysispuffer: 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, Proteaseinhibitor

3.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wurde der auf der Bradford-Methode basierende Bio-Rad Protein Assay nach Herstellerangaben verwendet. Um eine Eichgerade zu erstellen, wurde die Extinktion bei 595 nm von BSA-Reaktionsansätzen verschiedener bekannter Proteinmengen (0, 5, 10, 15 und 20 µg) gemessen.

3.4.6 SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen über die SDS-PAGE wurden je nach molekularer Masse des zu analysierenden Proteins ein 8-15 %-iges diskontinuierliches Acrylamidgel unter Verwendung des PerfectBlue Doppelsystem Twin M gegossen. SDS bindet an Proteine und verleiht ihnen eine konstant negative Ladung, wodurch sie durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt werden können. Die Proteine wurden durch Aufkochen mit Solubilisierungspuffer für 5 min bei 95 °C (für CLN7 für 10 min bei

37 °C) denaturiert. Zusätzlich wurden durch Zugabe von DTT (reduzierende Bedingungen) die Disulfidbrücken reduziert. Es wurden 50-200 µg Protein aufgetragen und das Gel bei konstanten 50 mA laufen gelassen. Als Größenmarker diente der PageRuler™ Prestained Molekulargewichtstandard (Thermo Scientific, Braunschweig).

- Trenngel: 8-12 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,08 % APS, 0,08 % TEMED, 375 mM Tris/HCl pH 8,8
- Sammelgel: 4 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED, 125 mM Tris/HCl pH 6,8
- Solubilisierungspuffer (Endkonzentration): 1 % SDS, 10 % Glycerin, Coomassie® Blue R, 100 mM DTT, 125 mM Tris/HCl pH 6,8
- Anodenpuffer: 192 mM Glycin, Tris/HCl pH 8,6
- Kathodenpuffer: 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris/HCl pH 8,6

3.4.7 Tris-Tricin-Gelelektrophorese

Für eine bessere elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über Tris-Tricin-Gele wurden folgende Komponenten verwendet:

- Trenngel: 12,5 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 1 % Glycerin, 0,025 % APS, 0,07 % TEMED, 1 M Tris/HCl pH 8,45
- Sammelgel: 4 % Acrylamid, 0,3 % SDS, 0,04 % APS, 0,16 % TEMED, 0,7 M Tris/HCl pH 8,45
- Solubilisierungspuffer (Endkonzentration): 4 % SDS, 12 % Glycerin, Coomassie® Blue R, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris/HCl pH 6,8
- Anodenpuffer: 200 mM Tris/HCl, pH 8,9
- Kathodenpuffer: 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % SDS

3.4.8 Deglykosylierung von Proteinen

Für die Abspaltung von *N*-glykosidisch-verbundenen Glykanen an Glykoproteinen, wurde eine *in vitro* Enzymreaktion mit Peptid *N*-Glykosidase F (PNGase F) angesetzt. Hierfür wurden 200 µg Proteinlysate mit Proteaseinhibitor und 0,5 % SDS (Endkonzentration) versetzt. Die Reaktion wurde für 10 min bei 50 °C inkubiert und anschließend mit NP40 (1 % Endkonzentration) versetzt. Für die enzymatische

Deglykosylierung wurden 3 Einheiten PNGase F hinzugegeben und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert.

3.4.9 Expression von *Glutathion-S-Transferase* (GST)-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden mit einer transformierten *E.coli*-Einzelkolonie (BL21) 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) einer Vorkultur angeimpft, über Nacht bei 37 °C geschüttelt und am nächsten Tag in 250 ml 2YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überführt. Die Bakterienkultur wurden solange bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt, bis die $OD_{600} = 0,5$ betrug und die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert werden konnte. Nach einer weiteren 4 h-Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterienzellen bei 5000 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet für die Glutathion-Agarose-Affinitätsaufreinigung verwendet.

3.4.10 Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Bakterienpellet wurde in 40 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert, für 30 min bei 4 °C gerührt und 3 x 10 s mit Ultraschall behandelt. Die Bakteriensuspension wurde mit 0,1 mg/ml DNase I 20 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 10 000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml 50 % Glutathion-Agarose 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert und bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Die Agarose wurde 3 x mit je 20 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen und dann mit Solubilisierungspuffer aufgeköcht. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung und Western-Blot-Analyse visualisiert.

- Lysepuffer: 1 mg/ml Lysozym, 25 % Sukrose, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF
- Waschpuffer: 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF, PBS
- Elutionspuffer: 15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl pH 8,0

3.4.11 GST-Pulldown-Analysen

Zur Herstellung der HEK293T-Lysate wurden ca. 30 konfluent gewachsene 10 cm Platten 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, in 5 ml eiskaltem PBS auf Eis abgeschabt und für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 2 mL eiskaltem GST-Lysepuffer

lysiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei V_{\max} und 4°C wurden die Überstände abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Abschätzung der Konzentration von GST bzw. GST-Fusionsproteinen auf der Glutathion-Agarosematrix wurden 10 bzw. 20 µl Beads zusammen mit BSA-Standards (7,5 µg; 15 µg; 30 µg) durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 10%) aufgetrennt und durch Coomassie Blue gefärbt. Für die Kopräzipitations-Analysen wurden Protein LoBind Tubes eingesetzt, um unspezifische Bindung an die Kunststoffoberflächen zu vermeiden. Für die Kopräzipitationen wurden ca. 100 µg GST bzw. GST-CLN7-NT/CT Fusionsproteine an Glutathion-Agarose Matrix gekoppelt und mit 300 µl HEK293T-Lysat (entspricht ca. 2,5 mg Gesamtprotein) für 2 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Abnehmen der Überstände wurden die Agarose-Beads 2 x mit 1000 µl eiskaltem GST-Waschpuffer gewaschen. Nach vollständiger Abnahme der Überstände wurde die Matrix zur Elution interagierender Proteine für 5 Minuten in 2 x Solubilisierungspuffer unter reduzierenden Bedingungen bei 95°C gekocht. Die Eluate und 10 % der eingesetzten Menge an HEK293T-Lysat (ca. 250 µg Gesamtprotein) wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 10%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch AP1γ-, AP2α- und AP3δ-Western-Blot analysiert.

- GST-Lysepuffer: 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, PBS
- GST-Waschpuffer: PBS, 0,1% TX100

3.4.12 Western-Blot-Analyse

Um Proteine via Antikörper nachzuweisen wurden sie aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es wurde der PerfectBlue™ 'Semi-Dry'-Elektroblotter nach den Herstellerangaben verwendet, wobei eine konstante Stromstärke von 300 mA für 90 min angelegt wurde. Um eine gleichmäßige Ladung zu überprüfen wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min mit Ponceau S angefärbt und mit H₂O mehrmals gewaschen. Danach wurde die Membran zunächst 1 h mit Blockierungspuffer, anschließend 2 h min bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper (Tabelle 4) in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal 10 min mit Waschpuffer gewaschen und 1 h mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten, HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Zweitantikörper (Tabelle 5) inkubiert. Die

Detektion der Banden erfolgte durch eine ECL Reaktion (*enhanced chemiluminescence*). Hierfür wurden die Lösungen ECL 1 und ECL 2 gemischt und sofort auf die Membran gegeben. Die Oxidation von Luminol durch HRP führt zur Bildung von 3-Aminophthalat, wodurch Licht der Wellenlänge 425 nm emittiert wird. Die Detektion erfolgte in der ChemiDoc™ je nach Signalstärke für 5 sek bis zu 3 min. Die densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden und die Errechnung der relativen Proteinmenge erfolgte mit Image Lab™.

- Transferpuffer: 192 mM Glycin, 20 % Methanol, 25 mM Tris pH 7,4
- TBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris pH 7,4
- Blockierungspuffer: 0,1 % Tween 20, 5 % Milchpulver, TBS
- Waschpuffer: 0,1 % Tween 20, TBS
- ECL 1: 2,7 mM Luminol, 0,44 mM *p*-Cumarinsäure, 100 mM Tris/HCl pH 8,5
- ECL 2: 0,02 % H₂O₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,5

3.4.13 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Visualisierung von Proteinen nach Auftrennung im SDS-PAGE, wurde Coomassie® Blue R Färbung verwendet. Unter sauren Bedingungen bindet Coomassie® Blue R an positiv geladene AS. Das Gel wurde 20 min in Coomassie-Lösung geschüttelt, anschließend mit Entfärbelösung entfärbt und am Ende getrocknet.

- Coomassie-Lösung: 50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,05 % Coomassie® Blue R
- Entfärbelösung: 50 % Methanol, 10 % Essigsäure

3.4.14 Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin und anschließender Immunpräzipitation

Durch metabolische Markierung wird die radioaktive AS [³⁵S]-Methionin in neu synthetisierte Proteine eingebaut. Mit dieser Methode ist es möglich, die Synthese, Sortierung und Prozessierung eines Proteins in der Zelle nachzuverfolgen. Embryonale Mausfibroblasten wurden in 3,5 cm-Petrischalen kultiviert, nach zwei Tagen und Erreichen der Konfluenz zwei Mal mit PBS gewaschen, für 1 h bei 37 °C in Hungermedium inkubiert, danach durch 750 µl *Pulse*-Medium ersetzt und für 1 h in den 37 °C-Inkubator gestellt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen entweder geerntet oder für weitere 4 h bei 37 °C mit 1 ml *Chase*-Medium inkubiert, mit

PBS gewaschen und dann geerntet. Das Chase-Medium wurde aufbewahrt und mit 78 µl Triton X-100 und Proteaseinhibitor versetzt. Die Zellen wurden in 800 µl Lysispuffer auf Eis für 1 h lysiert. Das Hinzugeben von 10 µl 3 % Protaminsulfat diente der Fällung der DNA. Es folgte eine Zentrifugation bei 10 000 x g für 10 min. Der Überstand, sowie das Chase-Medium wurden mit 200 µl IMM-CD-Puffer versetzt und für 1 h bei 4 °C mit 50 µl Protein G-Sepharose auf einem Drehrad rotiert, um unspezifisch Proteinbindungen zu minimieren. Die ProteinG-Sepharose wurde anschließend bei 1000 x g für 30 sek abzentrifugiert und der Überstand zunächst nur mit dem gegen das zu präzipitierende Protein gerichteten Primärantikörper (Tabelle 4) auf dem Drehrad über Nacht inkubiert. Erneut wurden 50 µl Protein G-Sepharose hinzugegeben und für 1 h auf dem Drehrad rotiert. Die Sepharose-Beads wurden wie folgt gewaschen (mit je 1 ml): 1 x Neufeld-Puffer, 1 x IMM-Puffer, 1 x IMM + 2 M KCl, 2 x 10 % PBS/H₂O und anschließend mit 130 µl 2 x Solubilisierungspuffer und 1,3 µl Mercaptoethanol bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und radioaktive Banden durch Fluorographie detektiert. Zur Signalverstärkung wurde das Gel 3 x 20 min in DMSO geschüttelt, über Nacht in 20 % PPO/DMSO inkubiert und schließlich 3 x 20 min in H₂O gewässert. Es wurde in Cellophanfolien getrocknet, sodass anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt und nach mehreren Tagen entwickelt werden konnte.

- Hungermedium: DMEM ohne Methionin und Glutamin, 1 x GlutaMaxTM
- *Pulse*-Medium: DMEM ohne Methionin und Glutamin, 1 x GlutaMaxTM, 100-150 µCi/ml [³⁵S]-Methionin
- *Chase*-Medium: DMEM, 4 % hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS, 250 µg/ml Methionin, 10 mM M6P-Na-Salz, 1 x GlutaMaxTM
- Lysispuffer: PBS, 0,4 % Triton X-100, 0,2 % Natrium-Desoxycholat, 0,2 % SDS, 0,8 % BSA, Proteaseinhibitor
- Neufeld-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH8,5), 0,6 M NaCl, 0,1 % SDS, 0,05 % NP40
- IMM-Puffer: PBS, 1 % Triton X-100, 0,5 % Natrium-Desoxycholat
- IMM-CD-Puffer: PBS, 1 % Triton X-100, 0,5 % Natrium-Desoxycholat, 0,5 % SDS, 2 % BSA

3.4.15 Endozytose von [¹²⁵I]-Arylsulfatase B (ASB)

- Konfluente adhärenente Zellen (3,5 cm-Petrischalen) wurden zweimal mit PBS gewaschen, für 30 min bei 37 °C in DMEM/BSA inkubiert und anschließend für 20 min in *Pulse*-Medium kultiviert. Die human rekombinante, mit [¹²⁵I]-markierte ASB wurde von Prof. Braulke zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die in mit 10 mM M6P versetzten *Pulse*-Medium inkubiert wurden, da M6P ein kompetitiver Inhibitor der ASB ist. Nach dem *Pulse* wurden die Zellen entweder geerntet oder mit DMEM/BSA gewaschen und für weitere 2 oder 4 h in DMEM/BSA bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden alle Zellen in 1 ml Sukrosepuffer abgeschabt, bei 3000 rpm für 4 min abzentrifugiert, in 100 µl Lysispuffer lysiert und mittels Autoradiographie analysiert.
- DMEM/BSA: DMEM, 0,1 % BSA
- *Pulse*-Medium: DMEM, 0,1 % BSA, 625.000 cpm/ml [¹²⁵I]-ASB, +/- 10 mM M6P
- Sukrosepuffer: 250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7,4
- Lysispuffer: 0,2 % Triton X-100, PBS

3.4.16 Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Analysen

Ein Biacore-Biosensor nutzt das Prinzip der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (*Surface Plasmon Resonanz*, SPR) aus, um Peptid-Protein und Protein-Protein Interaktionen in Echtzeit und ohne spezielle Markierung der Interaktionspartner zu detektieren. Ein Protein-Interaktionspartner (Ligand) wird dabei an einen Sensorchip kovalent gebunden und das potenziell interagierende Protein (Analyt) in ein integriertes Flusssystem injiziert, welches Kontakt zum Sensorchip hat. Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger mit einer dünnen Goldschicht und einer kovalent gebundenen Dextranoberfläche als Oberflächenmatrix. Je nach Art des Chips ist diese Matrix unterschiedlich derivatisiert, um verschiedene Möglichkeiten der Ligandenkopplung zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein BiacoreTM Sensor Chip CM5 -Chip verwendet, der die Kopplung von Peptiden über Disulfidbrücken erlaubt. Durch zwei aufeinanderfolgende Aktivierungsschritte entstehen reaktive Disulfidbrücken auf der

Chipoberfläche, die mit N-terminal am Peptid befindlichen Thiolgruppen des Cysteinrestes interagieren können. Die Aktivierung des Sensor Chips erfolgte mit N-Hydroxysuccinimid und N-ethyl-N'-(dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid für 5 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Peptide wurden mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 10 mM Natriumacetat (pH 5) verdünnt und bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 6 min an den Sensor Chip gekoppelt. Die Messung beruht auf einem optischen Phänomen, der SPR. Gemessen wird hierbei die Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche des Chips, welcher bei Messungen mit Proteinen linear zur Massenzunahme auf der Chipoberfläche ist. Findet eine Bindung zwischen den Interaktionspartnern statt, verändert sich die gebundene Masse und damit der Brechungsindex und das Resonanz-Signal, was durch den Biacore-Detektor aufgezeichnet wird. Das Resonanzsignal wird durch Resonanzeinheiten (RU) angegeben, wobei eine Winkeländerung von 1000 RU einer Zunahme von 1 ng Protein pro Quadratmillimeter Chipoberfläche entspricht. Ein Sensorgramm besteht aus vier Phasen: 1) der Basislinie des Laufpuffers, der über den Sensorchip fließt, bevor es zur Interaktion kommt, 2) der Assoziationsphase, die durch die Injektion des Analyts beginnt. Aufgrund der Interaktion des Analyten mit dem immobilisierten Liganden kommt es zum Anstieg des Resonanzsignals. 3) der Dissoziationsphase, in der die Injektion gestoppt wird und das Resonanzsignal wieder sinkt, weil der Ligand-Analyt-Komplex dissoziiert und 4) die Regenerationsphase, bei der die Basislinie durch Injektion des Regenerationspuffers wieder hergestellt wird. Die zu testenden Proteine (μ1A , μ2 , μ3A) wurden im Analyten-Puffer (1 μM) gelöst und anschließend jeweils für 1 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Die Messungen mit dem Biacore 3000 Biosensor wurden im Labor von Prof. Stefan Höning an der Universität zu Köln durchgeführt.

- Analyten-Puffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 5 mM DTT, 0,01 % Surfactant, β -Mercaptoethanol (1:10 000), 100 mM NaCl, pH 7,8

3.4.17 Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von 6xHis-AP μ -Untereinheiten

Für die SPR-Interaktionsstudien wurden nicht die μ1A , μ2 , und μ3A -Ketten voller Länge, sondern verkürzte μ -Untereinheiten in *E. coli* BL21 exprimiert, die zur Affinitätsaufreinigung am N-Terminus (NT) mit einem 6xHis-Eitop-Tag fusioniert

waren. Für die rekombinante Expression wurden folgende Plasmide vom Labor Prof. Höning (Universität Köln) zur Verfügung gestellt.

| Plasmid | Untereinheit | Spezies | AS |
|-------------------|--------------|---------|---------|
| pET-28b- μ 1A | μ 1A | Maus | 158-423 |
| pET-28a- μ 2 | μ 2 | Ratte | 158-435 |
| pET28a- μ 3A | μ 3A | Ratte | 166-418 |

12,5 ml LB-Medium (50 μ g/ml Kanamycin) wurden mit BL21 *E. coli* Einzelklonen der *His-Tag*-Expressionsplasmide pET-28b- μ 1A, pET-28a- μ 2 und pET28a- μ 3A angeimpft und bei 220 rpm und 37 °C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden damit 500 ml LB-Medium (Kanamycin) angeimpft und bei 24 °C (μ 1A) bzw. bei 30 °C geschüttelt, bis die OD₆₀₀ ca. 0,8 betrug. Es erfolgte eine Expressionsinduktion mit 0,5 mM IPTG, wobei die μ 1A-Kultur über Nacht bei 22 °C und die μ 2- und μ 3A-Kulturen bei 30 °C für 4 h kultiviert wurden. Zellsuspensionen wurden bei 5500 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert, die Pellets in 20 ml PBS resuspendiert, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und erneut für 15 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, auf 1 mM PMSF eingestellt und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Der Aufschluss der Zellen fand für 4-8 min mit einem Druckhomogenisator statt, danach wurde das Homogenat auf 2 % Chaps eingestellt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 11 300 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde mit PBS auf 300 mM NaCl verdünnt und auf 10 mM Imidazol eingestellt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte im Batch-Verfahren über Ni-NTA-Agarose und anschließender Gelfiltration. Dazu wurden je 500 μ l Ni-NTA-Agarose zu dem Bakterienhomogenat pipettiert und für 2 h auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Agarosematrix wurde für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert und 3 x mit je 20 ml Waschpuffer gewaschen, wobei bei jedem Waschschrift nochmals für 10 min auf dem Drehrad inkubiert wurde. Die Elution der Proteine fand mit 1,6 ml Elutionspuffer bei 4 °C für 2 h auf dem Drehrad und einer anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm statt. Für die zweite Elution wurden 0,8 ml Elutionspuffer verwendet. Mit Gelfiltrationspuffer wurden die Elutionsfraktionen über die HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Säule aufgereinigt und die Integrität und Reinheit der aufgereinigten μ -Ketten durch SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert. Die

Proteinkonzentration der aufgereinigten μ -Ketten wurde bestimmt und die Proteine bei -20°C gelagert.

- Aufschlusspuffer: 1 M NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, PBS pH 7,5
- Verdünnungspuffer: 10 mM β -Mercaptoethanol, PBS pH 7,5
- Waschpuffer: 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol, PBS pH 7,5
- Elutionspuffer: 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol, PBS pH 7,5
- Gelfiltrationspuffer: 500 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM HEPES pH 7,4

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Tierhaltung

Die Mauslinien wurden in pathogenfreien Barrieren und unter einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Die *Cln7*^(-/-) Mäuse wurden in einen C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt. Die Entnahme der Schwanzbiopsien für Genotypisierungen wurde in der Versuchstierhaltung durchgeführt. Für Organentnahmen wurden die Mäuse durch CO₂-Inhalation betäubt und anschließender Dekapitation getötet. Nach Entnahme wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.5.2 Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten

Für die Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten wurden schwangere Mäuse am Embryonaltag E 14,5 durch CO₂-Inhalation betäubt und dekapitiert. Die Mausembryonen wurden unter sterilen Bedingungen aus ihrer embryonalen Hülle herauspräpariert. Nach Gewinnung einer Gewebebiopsie zur Bestimmung des Genotyps wurden die Embryonen in 4 ml Trypsinlösung aufgenommen und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 8 ml Kulturmedium versetzt, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in einer Zellkulturflasche kultiviert. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden zwei Mal wöchentlich passagiert.

3.5.3 Perfusion von Mäusen

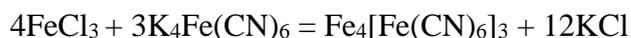
Für die Anfertigung immunhistochemischer Organschnitte wurden die Mäuse perfundiert. Die Tiere wurden zunächst mit einer abdominalen Kombinationsnarkose aus Ketamin (80-100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/KG Körpergewicht) narkotisiert. Die vollständige Betäubung der Maus wurde durch das Fehlen des Fußsohlenreflexes kontrolliert. Nach Fixierung wurde die narkotisierte Maus sternotomiert und anschließend der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert. Der rechte Vorhof wurde mit einer Pinzette geöffnet und das Blut des großen Kreislaufs mit 50 ml PBS mit Hilfe einer Pumpe herausgespült. Anschließend wurden die Mäuse mit 50 ml einer 4 % PFA-Lösung in PBS transkardial perfundiert. Die Organe wurden entnommen und über Nacht in 4 % PFA in PBS inkubiert.

3.5.4 Immunhistochemie von Mausorganen

Die Mäuse wurden vor Entnahme der Organe anästhesiert, perfundiert und das Gewebe fixiert. Die Paraffinschnitte und immunhistochemischen Färbungen wurden in der *Core Facility* Mauspathologie (Leitung Prof. Glatzel) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Anfertigung der immunhistochemischen Schnitte der Retina wurde von Wanda Jankowiak im Transplantationslabor der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde (Leitung Prof. Bartsch) durchgeführt.

3.5.5 Perls Prussian-Blue-Färbung

Mit der Prussian-Blue-Färbung lässt sich mit folgender Reaktion Eisen in Gewebe nachweisen:



Die in 4 % PFA fixierten Gehirne wurden mit einem Vibratom in 50 µm-Schnitte geschnitten und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgte eine 30 minütige Inkubation in *Prussian-Blue*-Lösung, erneutes Waschen mit PBS und anschließende 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-Reaktion nach den Herstellerangaben für 10 min.

- *Prussian-Blue*-Lösung: 1% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1% HCl, beide Komponenten wurden erst kurz vor der Inkubation gemischt

3.5.6 Elektronenmikroskopie (EM)

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Michaela Schweizer (ZMNH, Hamburg) angefertigt. Dafür wurden die Mäuse transkardial zunächst mit PBS und anschließend mit einer Mischung aus 4% PFA und 1% Glutaraldehyd in PBS perfundiert. Mit einem Vibratom wurden 100 µm dicke Schnitte hergestellt, die dreimal mit 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7.2–7.4) gespült und in 1% Osmiumtetroxid in Cacodylat-Puffer inkubiert wurden. Nach der Osmifizierung wurden die Schnitte in ansteigenden Ethanol-Lösungen entwässert und schließlich zwei Mal mit Propylenoxid inkubiert. Die Schnitte wurden in einer 1:1 Mischung aus Propylenoxid und *epoxy embedding medium* (Epon) inkubiert und schließlich in Epon eingebettet. Nach Aushärtung wurden für die Lichtmikroskopie Semidünnschnitte präpariert (0,5 µm) und auf Objektträger aufgezogen. Ultradünnschnitte (60 nm) wurden mit einem Elektronenmikroskop analysiert und Bilder mit einer Digital Kamera aufgenommen.

3.5.7 Magnetresonanztomographie (MRT)-Messungen an lebenden Mäusen

Die MRT-Aufnahmen von Maushirnen wurden von Dr. Jan Sedlacik (Klinik und Poliklinik für Neuroradiologische Diagnostik und Intervention, UKE Hamburg) angefertigt. Für die MRT-Messungen wurden die Tiere mittels einer Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert. Dies erfolgte in einer Narkosekammer, in der eine 3-4 %-ige Isofluran-Luft-Mischung eingeleitet wurde. Während der Messung wurde eine Betäubung mit 1 bis 1,5 % Isofluran in Luft durchgeführt. Die Maus wurde über ihre Vorderzähne fixiert. Ein mit Wasser gefülltes Schlauchsystem (40°C) verhinderte das Auskühlen des Tieres. Die Messzeit betrug ca. 30 min. Um das Auskühlen der Tiere auch nach der Messung zu verhindern, wurden die Tiere zum Aufwachen aus der Narkose auf eine Wärmeplatte gelegt. Erst wenn das Verhalten der Tiere wieder vollständig normal war (Bewegung, Körperpflege, Wasser-/Nahrungsaufnahme) wurden sie wieder in den Käfig gesetzt. Am nächsten Tag erfolgte eine Sichtkontrolle der Tiere.

3.5.8 Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Auswertung aller Messdaten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel. Aus verschiedenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Zur Kalkulation der Signifikanz zwischen zwei Datensätzen wurde ein *T*-Test

durchgeführt, wobei ab einem p-Wert von $< 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant eingestuft. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,005$ (***)).

4. Ergebnisse

4.1 Generierung und phänotypische Analyse eines neuen *Gene-trap* Mausmodells der *Cln7*-Erkrankung

Zu Beginn der Untersuchungen war kein Tiermodell der CLN7-Erkrankung verfügbar, welches eine Analyse des zeitlichen Verlaufs der Neurodegeneration, Neuroinflammation und der biochemischen Veränderungen im Gehirn erlauben würde. Ziel dieser Arbeit war es, das *Mfsd8/Cln7* Gen der Maus auszuschalten und das erste Tiermodell für die CLN7-Erkrankung zu generieren. Hierfür wurde ein EUCOMM (*European Conditional Mouse Mutagenesis Program*) ES-Zellklon vom Helmholtz Zentrum in München, der die Herstellung einer *lacZ Gene-trap* Maus/ *knockout first* erlaubte (im Folgenden *Cln7*^(*tm1a/tm1a*)), kommerziell erworben. Die Analyse der *Cln7*^(*tm1a/tm1a*) Mäuse wurde publiziert (Damme *et al*, 2014) und wird deshalb nur verkürzt beschrieben. Aufgrund der Insertion des *lacZ* Gens zwischen Exon 1 und Exon 2 von *Mfsd8/Cln7* war die Expression des *lacZ*-Reportergens durch den endogenen *Mfsd8/Cln7*-Promotor reguliert und erlaubte die indirekte Bestimmung der *Cln7*-Expression durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität. Analysen der β -Galaktosidase an Gehirnschnitten adulter *Cln7*^(+/tm1a) zeigten ubiquitäre Expression von *Cln7* im Gehirn und peripheren Organen mit starker *Cln7*-Expression in Niere und Milz und schwächerer Expression in Leber. Im Gehirn war die *Cln7*-Expression im Hippocampus (CA1- und CA3-Region und Gyrus dentatus), Cortex (Lamina I-VI) und Cerebellum (Purkinje- und Körnerzellschicht) am stärksten. Quantitative *Realtime* PCR Analysen zeigten eine Reduktion der *Cln7 mRNA* in der Leber um 90%, sodass die generierten *Cln7*^(*tm1a/tm1a*) als hypomorph bezeichnet wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein polyklonaler anti-*Cln7*Antikörper generiert, der gegen die Peptidsequenz CKSVNFQEENTDEPQIPEGSID aus der zytosolischen Schleife L6 des murinen *Cln7* Proteins generiert wurde. In Western-Blot-Analysen von Lebergewebe wurde eine immunreaktive ~ 50 kDa Bande in Wildtyp Mäusen detektiert, die in *Cln7*^(*tm1a/tm1a*) Mäusen abwesend war. Die Analyse subzellulärer Fraktionen von Tritosomen aus Lebergewebe bestätigten die *Cln7*-Proteindefizienz in *Cln7*^(*tm1a/tm1a*) Mäusen und zeigte die Kodistribution von *Cln7* mit dem LMP Lamp1. Hiermit wurde

erstmalig biochemisch gezeigt, dass endogenes Cln7 ein integrales LMP in der Leber ist (Damme *et al.*, 2014).

Cln7^(tm1a/tm1a) Mäuse waren überlebensfähig, fertil und zeigten keine neurologischen Symptome oder motorischen Defizite und keine erhöhte Mortalität im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Histologische Untersuchungen von Gewebeschnitten zeigten autofluoreszierendes Lipofuszin im Gehirn, Leber, Niere und Milz in 8,5 Monate alten *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen, das in den gleichaltrigen Wildtyp Mäusen nicht zu detektieren war. Im Gehirn der *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäuse wurde die stärkste Autofluoreszenz in der Purkinjellschicht, der CA3-Region des Hippocampus und im Thalamus detektiert. Analysen der Ultrastruktur des elektronendichten Speichermaterials von 8 Monate alten *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen zeigten lamelläre Strukturen. In immunhistochemischen Analysen von Gehirnschnitten 10 Monate alter *Cln7*^(tm1a/tm1a) wurde die Akkumulation der c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (Scmas) in Cerebellum, Medulla und im Thalamus detektiert. Im zerebralen Cortex wurde keine Scmas-Speicherung gefunden. Kolokalisierungsanalysen mit Antikörpern gegen Markerproteine von Purkinjellen (Calbindin), neuronalen Zellen (NeuN), Astrozyten (GFAP) und Mikrogliazellen (CD68) zeigten Speicherung von Scmas in cerebellären Purkinje-Zellen, granulären Zellen, in Mikrogliazellen, nicht jedoch in Astrozyten. Parallel konnte die Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen im Gehirn und Rückenmark im Alter von 10 Monaten gezeigt werden. Die stärksten neuropathologischen Veränderungen wurden in der Retina von 8,5 Monate alten *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen detektiert. Dort konnte eine starke Degeneration der Photorezeptoren und eine Aktivierung der retinalen Astrozyten gezeigt werden (Damme *et al.*, 2014).

4.1.1 Generierung eines knockout *Cln7*^(-/-) Mausmodells durch Deletion von Exon 2 in *Mfsd8/Cln7*

Um zu überprüfen, ob die vollständige Ausschaltung des *Mfsd8/Cln7*-Gens in der Maus zu einem Phänotyp im Gehirn führt, der wesentliche Merkmale der CLN7-Erkrankung beim Menschen rekapituliert, wurden *Cln7*^(tm1d/tm1d) bzw. *Cln7*^(-/-) Knockout-Mäuse hergestellt. Durch Kreuzung der *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäuse mit *Flp*-Deleter Mäusen wurde die *lacZ*/Neo-Kassette ausgeschnitten. Die resultierenden *Cln7*^(tmc/tm1c) Mäuse sind mit Wildtyp Mäusen genetisch identisch, das kritische Exon 2 von *Mfsd8/Cln7* ist jedoch

durch zwei *loxP*-Stellen flankiert. Durch Kreuzung dieser Mäuse mit *Cre*-Deleter Mäusen wurde das Exon 2 ubiquitär deletiert. Die resultierenden Mäuse wurden als *Cln7*^(*tm1d/tm1d*) bzw. *Cln7*^(-/-) bezeichnet (Abb. 4A). Die Verpaarung der *Cln7*^(*tm1c/tm1c*) Mäuse mit Deleter Mäusen mit konditionaler *Cre*-Expression würde in Zukunft die Ausschaltung des *Mfsd8/Cln7*-Gens in bestimmten Zelltypen der Maus erlauben.

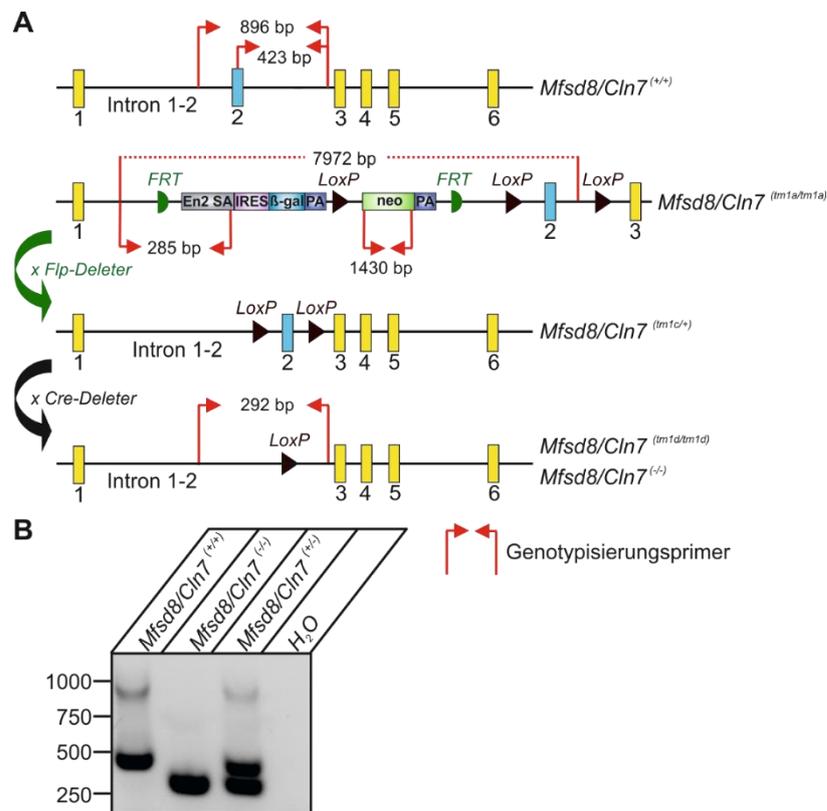


Abb. 4 Schematische Darstellung der Deletion von Exon 2 im *Mfsd8/Cln7* Genlocus und Genotypisierung.

(A) Lokalisation der Genotypisierungsprimer und resultierende Bandengrößen der PCR Produkte. Bei der Genotypisierung des Wildtyps werden zwei PCR-Produkte der Größen 895 bp und 423 bp amplifiziert. Durch das Fehlen von Exon 2 im *Mfsd8/Cln7*^(-/-) Gen wird nur ein PCR-Produkt der Größe 292 bp amplifiziert. (B) Mit aus Schwanzspitzen isolierter, genomischer DNA wurde eine Triplex PCR mit den Primern *Mfsd8-F*, *Mfsd8-R* und *I5472-F* durchgeführt. Die amplifizierten PCR Produkte wurden mit einem DNA-Längenstandard auf einem 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennt und durch UV-Illumination sichtbar gemacht.

Die Genotypisierung der *Cln7*^(-/-) Mäuse erfolgte mit den Primern *Mfsd8-F*, *Mfsd8-R* und *I5472F*, wobei im Wildtyp zwei PCR-Produkte von 423 bp (*I5472F*; *Mfsd8-R*) und 896 bp (*Mfsd8-F*; *Mfsd8-R*) und in der homozygoten *Mfsd8*^(*tm1d/tm1d*) bzw. *Mfsd8*^(-/-) Maus nur ein PCR-Produkt von 292 bp (*Mfsd8-F*; *Mfsd8-R*) amplifiziert wird, da der Primer *I5472F* innerhalb von Exon 2 bindet. In heterozygoten Mäusen werden drei PCR-

Produkte amplifiziert (Abb. 4B). Im Folgenden werden die *Mfsd8*^(-/-) *Knockout*-Mäuse als *Cln7*^(-/-) Mäuse bezeichnet.

4.1.2 Die Deletion von Exon 2 im *Mfsd8/Cln7*-Gen führt zu einer *frameshift*-Mutation und Verlust des Cln7 Proteins

Bei den in dieser Arbeit verwendeten EUCOMM ES-Zellen wird zum *Gen-Targeting* ein Exon im 5'-Bereich des *MFSD8/CLN7*-Gens („kritisches Exon“) ausgewählt, das in allen bekannten Splice-Varianten vorhanden ist, sodass eine komplette Ausschaltung des Wildtypgens und möglicher Splice-Varianten garantiert ist (Skarnes *et al*, 2011). Die Deletion des kritischen Exons garantiert zusätzlich, dass aus der transkribierten *mRNA* ein stark verkürztes, mutantes Protein synthetisiert wird, das sehr wahrscheinlich keine Rest-Funktion oder Aktivität besitzt. Der Verlust des kritischen Exons führt bei den EUCOMM-*Gene Targeting* Vektoren entweder zum Abbau der mutanten *mRNA* durch den *nonsense-mediated decay* (NMD) Mechanismus oder zur Leserahmenverschiebung im Protein. Zum Nachweis der Leserahmenverschiebung wurde zunächst die *mRNA* aus Leber, Niere und Gehirn einer *Cln7*^(-/-) Maus isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Nach Amplifikation und DNA-Sequenzierung wurde die abgeleitete Proteinsequenz in einer *BLAST*-Suche mit der Wildtyp Cln7-Sequenz (NP_082416.2) verglichen. Das mutante Cln7 Protein ist aus den N-terminalen 22 AS des Wildtyp-Proteins und 15 neuen AS zusammengesetzt (Abb. 5A). Dem trunkiertem p. Cln7 E23F fsX16 Protein fehlen sämtliche 12 putativen Transmembrandomänen und die C-terminale zytosolische Domäne (Abb. 5B). Expressions-Analysen in p. Cln7 E23F fsX16 überexprimierenden HEK293T-Zellen zeigten, dass das trunkierte Cln7 Protein weder in Gesamt-Proteinhomogenaten noch in Membranfraktionen detektiert wurde (nicht gezeigt). Trotz der Existenz des N-terminalen lysosomalen Di-Leucin-basierten Signals ist der Transport des trunkierten Cln7-Proteins zum Lysosom unwahrscheinlich. Die *Cln7*^(-/-) Mäuse sind genetisch Patienten mit der *nonsense*-Mutation p.CLN7 R35X ähnlich, die klinisch einen spät-infantilen Phänotyp mit schwerer Verlaufsform zeigen (Kousi *et al*, 2009). Beide Mutationen führen zu einem frühen Abbruch der Polypeptidkette und wahrscheinlich zur Fehllokalisierung und komplettem Funktionsverlust der Cln7-Proteine.

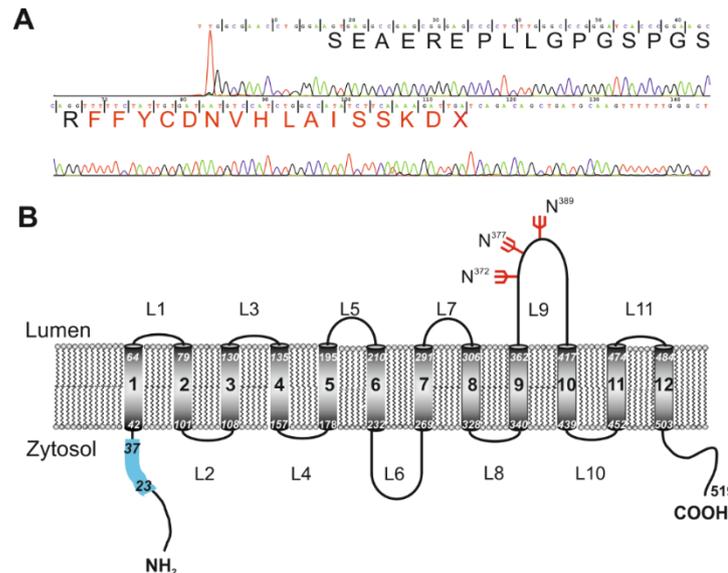


Abb. 5 Die Deletion von Exon 2 im *Mfsd8/Cln7*-Genlocus führt zur Deletion c.*Cln7* del67_115 und zur Leserahmeneverschiebung p.*Cln7* E23F fsX16.

(A) *mRNA* aus dem Gehirn einer *Cln7*^(-/-) Maus wurde in cDNA umgeschrieben und die Nucleotide 1-450 der *Cln7* cDNA durch PCR amplifiziert. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde von beiden Seiten sequenziert. Die mutante *Cln7*-Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Proteinsequenz im Einbuchstabencode sind dargestellt. Die Wildtyp (6-22) und mutanten AS (23-37) sind schwarz bzw. rot dargestellt. (B) Schematische Darstellung der Topologie des *Cln7*-Proteins mit 12 Transmembrandomänen (1-12), 11 Schleifen (L1-11), drei benutzten *N*-Glykosylierungsstellen N³⁷², N³⁷⁷ und N³⁸⁹ (in rot) und den im Zytosol lokalisierten N- und C-Termini.

Zum Nachweis des Verlusts von *Cln7* auf Proteinebene wurden Kaninchen mit einem 13mer-Peptid der Sequenz CKSVNFQEENTDEPQIPEG, das die AS 246-266 aus der Schleife L6 des *Cln7*-Proteins umfasste, immunisiert. Aus dem polyklonalen Antiserum wurden *Cln7*-spezifische Antikörper aufgereinigt (Pineda Antikörper Service, Berlin) und die IgG-Fraktion in Western-Blot-Analysen untersucht. In Fraktionen von Wildtyp Mäusen wurde eine immunreaktive Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 50 kDa detektiert, die in Membranen von *Cln7*^(-/-) Mäusen fehlte. Nach enzymatischer Deglykosylierung wurde eine immunreaktive Bande von ~ 38 kDa detektiert, die ebenfalls in Membranfraktionen von *Cln7*^(-/-) Mäusen abwesend war (Abb. 6A). Durch quantitative *Realtime* PCR Messungen des *Cln7* Transkripts konnte das Fehlen von Exon 2 in *Cln7*^(-/-) Mäusegehirnen gezeigt werden, da die verwendeten Taqman[®]-Primer innerhalb von Exon 2 im *Mfsd8/Cln7*-Gen binden (Abb. 6B).

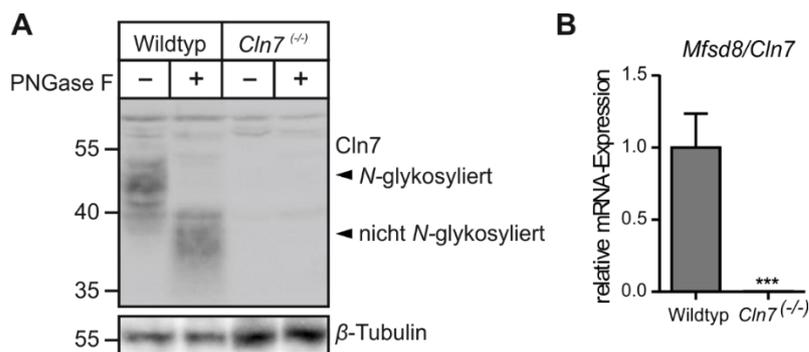


Abb. 6 Abwesenheit der *Cln7*-Expression auf Protein- und *mRNA*-Ebene im *Cln7*^{-/-} Mausgewebe. (A) Leber-Membranfraktionen (100 µg) von einer Wildtyp- und einer *Cln7*^{-/-} Maus wurden in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von PNGase F inkubiert, durch 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend durch *Cln7*-Western-Blot-Analyse untersucht. β -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Positionen des *N*-glykosylierten und nicht *N*-glykosylierten *Cln7*-Proteins (Pfeile) und der Markerproteine (in kDa) sind angegeben. (B) *mRNA* wurde aus dem Gehirn von je drei neun Monate alten Wildtyp- und *Cln7*^{-/-} Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative *Cln7*-Expression mittels quantitativer *Realtime* PCR bestimmt, wobei gegen die Expression von β -Aktin normalisiert wurde. Die Expression im Wildtyp wurde gleich 1 gesetzt (***) $p < 0,005$.

4.1.3 *Cln7*-Expression im Gehirn, der Retina und peripheren Organen

Northern-Blot-Analysen humaner Gewebe zeigten eine ubiquitäre *CLN7 mRNA*-Expression in allen untersuchten Organen (Siintola *et al.*, 2007). In quantitativen *Realtime* PCR Analysen von Rattengehirn wurde eine 2,4- bzw. 5-fach höhere *Cln7 mRNA*-Expression im Hippocampus im Vergleich zu Cortex und Mittelhirn gezeigt (Sharifi *et al.*, 2010). Zur Analyse der *Cln7*-Proteinexpression in Mausgeweben wurden zunächst Gesamt-Proteinhomogenate aus Gehirn und peripheren Organen von Wildtyp Mäusen untersucht. Aufgrund der niedrigen Expression und hohen Hydrophobizität von *Cln7* wurden jedoch keine immunreaktiven Banden in *Cln7* Western-Blot-Analysen detektiert. Deshalb wurden lysosomale und mitochondriale Membranen in den Homogenaten angereichert (20.000 x g Pellets). Membranhomogenate von verschiedenen Organen der *Cln7*^{-/-} Mäuse zeigten den ubiquitären Verlust der *Cln7*-Proteinexpression. Im Gehirn der Wildtyp Mäuse wurde in allen untersuchten Regionen eine schwache, ca. 40-45 kDa große, spezifische immunreaktive Bande detektiert, die in *Cln7*^{-/-} Mäusen fehlte. Die *Cln7*-Expression in Cortex und Cerebellum der Wildtyp Tiere war stärker als in Hippocampus, Medulla und Riechkolben. In der Retina wurde ebenfalls eine schwache *Cln7*-Expression detektiert. In peripheren Geweben wie Leber, Niere, Herz, Milz wurde *Cln7* ubiquitär exprimiert (Abb. 7). Die Western-Blot-Analysen zeigten erstmalig die

ubiquitäre, geringe Expression von Cln7 in allen untersuchten Geweben sowie den Verlust der Cln7-Expression in den *Cln7*^(-/-) Mäusen.

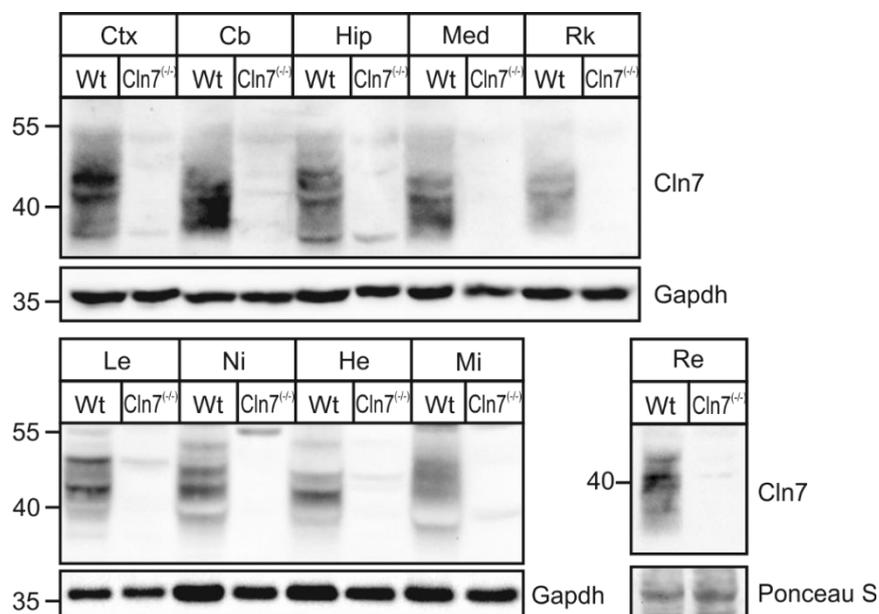


Abb. 7 Cln7-Expressions-Analyse in verschiedenen Gehirnregionen, der Retina und peripheren Organen.

Membranfraktionen (120 µg) aus Wildtyp (Wt)- und *Cln7*^(-/-) Mäusen aus Cortex (Ctx), Cerebellum (Cb), Hippocampus (Hip), Medulla (Med), Riechkolben (Rk) sowie Leber (Le), Niere (Ni), Herz (He), Milz (Mi) und Retina (Re) wurden durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 10 %) aufgetrennt und mittels Cln7 Western-Blot analysiert. Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bzw. Ponceau S-Färbung dienten als Ladekontrollen. Die molaren Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

4.1.4 Phänotypische Analyse des *Cln7*^(-/-) Mausmodells

Cln7^(-/-) Mäuse wurden phänotypisch unauffällig geboren und waren fertil. Ab einem Alter von ca. 28 Wochen wurden bei ihnen neurologische und motorische Defizite beobachtet: das Einsetzen von Myoklonien und *Clasping* (Abb. 8A), Lähmung der Hinterbeine, Tremor, Hypotonie, Inaktivität und eine zusammengekauerte Körperhaltung. Aufgrund der starken morphologischen Veränderungen, der Neuroinflammation und der Neurodegeneration in der Retina ist zu vermuten, dass die Mäuse im Alter von 28 Wochen bereits vollständig blind waren. Parallel zu den oben beschriebenen pathologischen Veränderungen wurde bei *Cln7*^(-/-) Mäusen eine erhöhte Sterblichkeitsrate mit einer mittleren Lebenszeit von 34 Wochen festgestellt (Abb. 8B). Die Todesursache ist unklar. Aufgrund der schweren Symptome und der Unfähigkeit, selbständig Futter und Wasser aufzunehmen, wurden die *Cln7*^(-/-) Mäuse aus Tierschutzgründen im Alter von 40 Wochen getötet.

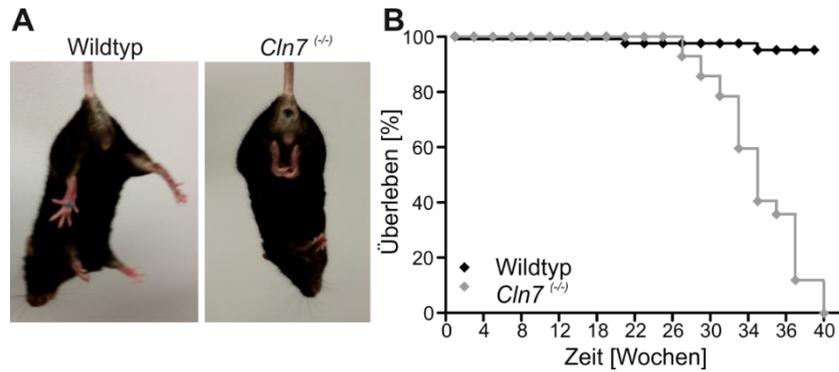


Abb. 8 Clasping Phänotyp und erhöhte Sterblichkeit.

(A) 36 Wochen alte *Cln7*^(-/-) Mäuse zeigen einen *Clasping*-Phänotyp, der durch das Anziehen der Vorder- und Hinterextremitäten an den Körper gekennzeichnet ist. Gleichaltrige Wildtyp Mäuse strecken die Extremitäten vom Körper weg. (B) Erhöhte Sterblichkeit von *Cln7*^(-/-) Mäusen mit einer maximalen Lebensdauer von 40 Wochen. Analysiert wurden die Überlebensraten von Wildtyp- und *Cln7*^(-/-) Mäusen (n=42) mit gleichem genetischen Hintergrund.

4.1.5 Lysosomale Speicherung im *Cln7*^(-/-) Mausmodell

Ein gemeinsames Merkmal der 13 bekannten, genetisch verschiedenen NCLs ist die Speicherung von autofluoreszierenden Ceroid-Lipopigmenten in Neuronen des zentralen Nervensystems und peripheren Geweben (Ballabio & Gieselmann, 2009). Zum Nachweis von autofluoreszierendem Speichermaterial wurden 36 Wochen alte *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp Mäuse perfundiert und sagittale Gehirnschnitte angefertigt. Die Autofluoreszenz wurde mit dem 488 nm-Laser unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop detektiert. Eine starke Autofluoreszenz wurde in pyramidalen Neuronen der CA3-Region und des Gyrus dentatus im Hippocampus, im zerebralen Cortex (Schichten I-VI), der Purkinjellschicht des Cerebellums, dem Thalamus und Riechkolben der *Cln7*^(-/-) Mäuse detektiert. In den Gehirnschnitten von gleichaltrigen Wildtyp-Kontrolltieren wurde keine Fluoreszenz detektiert (Abb. 9).

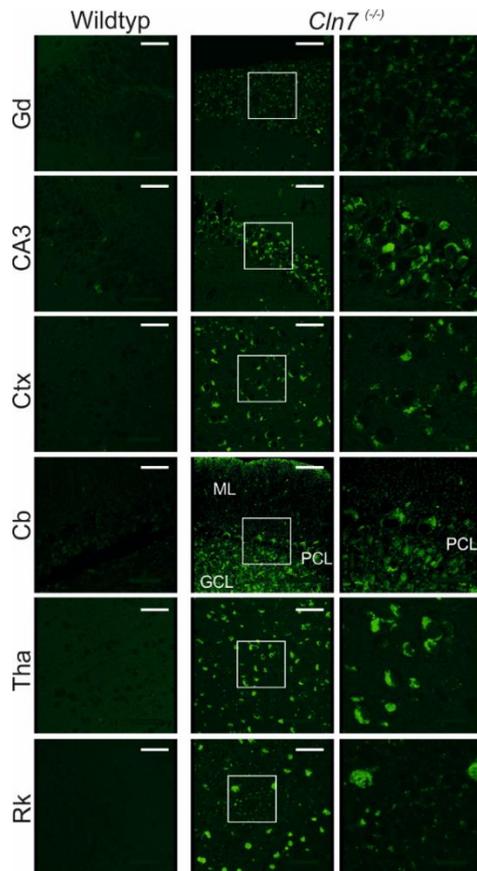


Abb. 9 Generalisierte Autofluoreszenz in verschiedenen Gehirnregionen von *Cln7*^{-/-} Mäusen. Repräsentative, ungefärbte sagittale Gehirnschnitte von einer 36 Wochen alten Wildtyp- und einer *Cln7*^{-/-} Maus wurden unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit der Wellenlänge 488 nm angeregt. Starke Autofluoreszenz wurde in der CA3-Region, Cortex (Ctx), Purkinjzellschicht (PCL, *purkinje cell layer*) im Cerebellum (Cb), Thalamus (Thal) und Riechkolben (Rk) des *Cln7*^{-/-} Gehirns detektiert. Im Gyrus dentatus (Gd) war die Fluoreszenz etwas schwächer. Die Skalierungsbalken entsprechen 60 μm .

4.1.6 Morphologische Analysen des Speichermaterials im Gehirn der *Cln7*^{-/-} Mäuse

Um die Ultrastruktur des Speichermaterials in Neuronen zu analysieren, wurden von Dr. Schweizer (ZMNH, Hamburg) elektronenmikroskopische Aufnahmen von 36 Wochen alten *Cln7*^{-/-} Mäusegehirnen angefertigt. In cerebellären Purkinjzellen wurden große Membran-umschlossene Areale mit Speichermaterial, das hauptsächlich aus kurvilinearen Einlagerungen und vereinzelt *fingerprint*-Profilen zusammengesetzt war, detektiert (Abb. 10A). Die Akkumulation von Lipofuszin in Neuronen des Hippocampus (Gyrus dentatus, CA1-Region) und in Purkinjzellen wurde durch histochemische Färbungen von Gehirnschnitten mit dem Farbstoff Luxolblau, der Lipofuszin anfärbt, verifiziert (Abb. 10B).

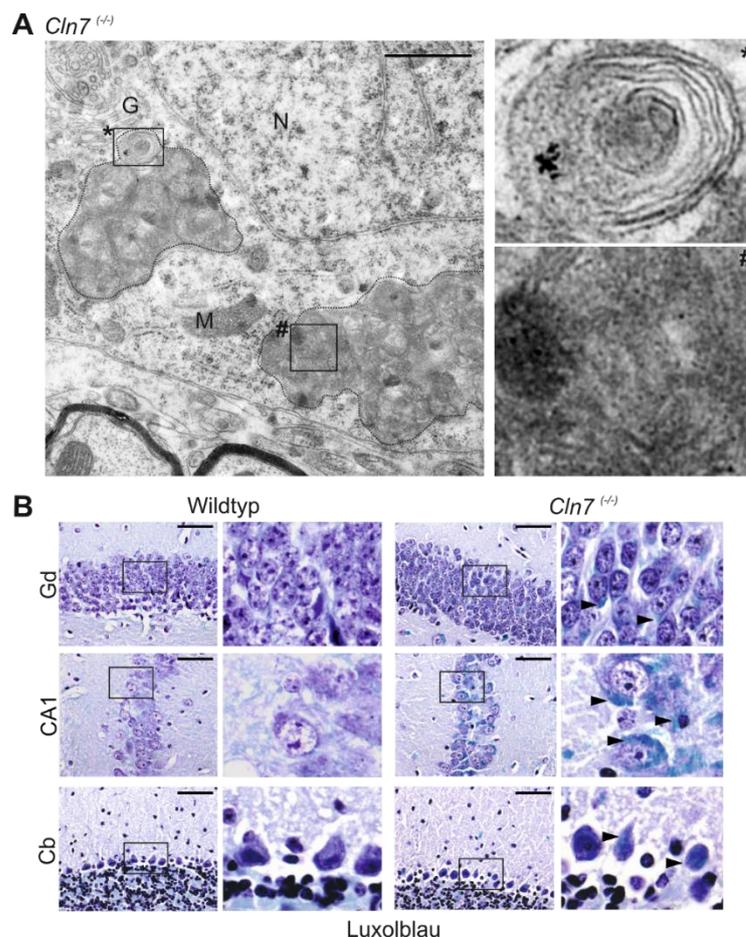


Abb. 10 Lysosomale Speicherung mit kuvilinearen Einlagerungen und *fingerprint*-Profilen im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Ultrastruktur des akkumulierenden Speichermaterials (gepunktete, schwarzen Linien) in cerebellären Purkinjezellen einer 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Maus. Kurvilineare (#)- und *fingerprint* (*)-Profile, Nucleus (N), Mitochondrium (M) und Golgi-Apparat (G) sind eingezeichnet. Der Skalierungsbalken entspricht 1 μ m. Auf der rechten Seite sind die 5-fachen Vergrößerungen der durch Rechtecke markierten Areale dargestellt. (B) Mit Luxol Blau angefärbtes Lipofuszin (schwarze Pfeile) aggregiert im Zytoplasma von Neuronen des Gyrus Dentatus (Gd), der CA1-Region und Purkinje-Zellen im Cerebellum (Cb) einer 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Maus. Die Skalierungsbalken entsprechen 50 μ m. Auf der rechten Seite sind jeweils die 16-fachen Vergrößerungen dargestellt.

4.1.7 Biochemische Analysen des Speichermaterials im Gehirn der *Cln7*^(-/-)

Mäuse

Die Hauptproteinkomponenten des lysosomalen Speichermaterials in NCL-Patienten sind Scmas oder die Saposine A und D (Radke *et al*, 2015). Bei Scmas-Speicherung werden in der EM *fingerprint*- und kurvilineare Profile detektiert, während Speichermaterial mit Saposin A und D eine Akkumulation von GRODs zeigt (Palmer, 2015). Um die Zusammensetzung der Proteinkomponenten des Speichermaterials von *Cln7*^(-/-) Mäusen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen mit

Antikörpern gegen Scmas an Gehirnen von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp Mäusen durchgeführt. Eine gut charakterisierte, natürliche vorkommende Mausmutante für die vLINCL, die *Cln6*^{(-/-)/nclf} Maus, diente als Positivkontrolle für Scmas-Speicherung im Gehirn (Bronson *et al*, 1998). In Gehirnregionen und Zellen mit autofluoreszierendem Ceroid-Lipopigmenten wurde Immunreaktivität gegen Scmas detektiert. Die Scmas-Speicherung war in cerebellären Purkinjezellen, in hippocampalen Neuronen der CA3-Region und in Neuronen des Cortex und Thalamus besonders stark (Abb. 11A). Der Vergleich mit *Cln6*^{(-/-)/nclf} Mäusen zeigte eine etwa gleich starke Scmas-Immunreaktivität in Neuronen des Cortex und Thalamus und eine stärkere Scmas-Speicherung in *Cln6*-defizienten cerebellären und hippocampalen Neuronen. Scmas konnte auch in peripheren Organen wie Niere, Leber und Herz detektiert werden (Abb. 11B). Um die immunhistochemischen Färbungen zu verifizieren, wurden Scmas Western-Blot-Analysen mit Detergenz-unlöslichen Fraktionen aus 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp Gehirnen durchgeführt. Bei *Cln7*^(-/-) Mäusen wurde eine immunreaktive, ca. 10 kDa große Scmas-Bande detektiert, die in den Wildtyp-Kontrollen abwesend war (Abb. 11C). Die Scmas-Speicherung war bereits im Gehirn von 3 Monate alten *Cln7*^(-/-) Mäusen detektierbar (nicht gezeigt).

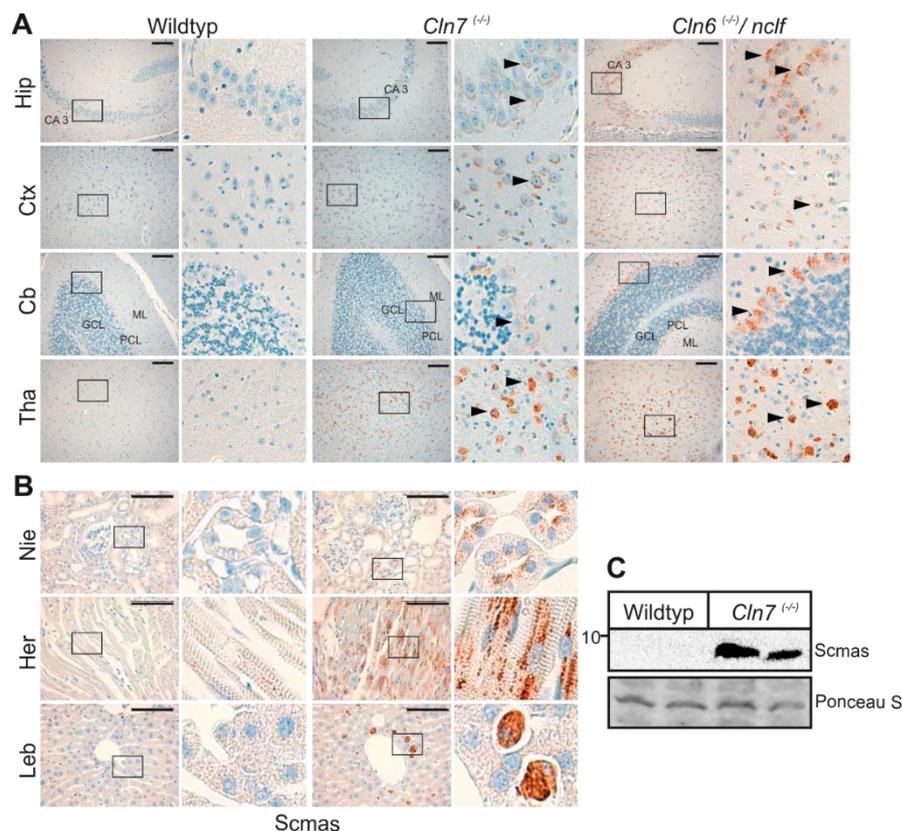


Abb. 11 Akkumulation von Scmas im Gehirn und peripheren Organen von *Cln7*^(-/-) Mäusen.

(A) Immunohistochemie sagittaler Gehirnschnitte von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp Mäusen zeigt Speicherung von Scmas (braun, schwarze Pfeile) in hippocampalen Neuronen der CA3-Region (Hip), im Cortex (Ctx), in cerebellären (Cb) Purkinjezellen (PCL, *purkinje cell layer*) und im Thalamus (Tha). Zellkerne sind blau angefärbt. 40 Wochen alte *Cln6*^{(+/-)/nclf} Mäuse wurden als Positivkontrolle im Vergleich analysiert. Die Scmas-Speicherung in *Cln7*^(-/-) Mäusen fällt geringer aus als in den *Cln6*^{(+/-)/nclf} Mäusen. Die Skalierungsbalken entsprechen 100 μ m. Die Ausschnitte auf der rechten Seite zeigen eine 16-fache Vergrößerung der durch Rechtecke markierten Areale an. GCL = Körnerzellschicht (*granule cell layer*), MCL = Molekularschicht (*molecular cell layer*). (B) Immunohistochemie von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp Mäusen zeigt Speicherung von Scmas in Niere (Nie), Herz (Her) und Leber (Leb). Zellkerne sind blau angefärbt. Die Skalierungsbalken entsprechen 100 μ m. Die Ausschnitte auf der rechten Seite zeigen eine 16-fache Vergrößerung der durch Rechtecke markierten Areale an. (C) Detergenz-unlösliche Fraktionen aus dem Gehirn von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-) und gleichaltrigen Wildtyp Mäusen (n=2) wurden durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 15%) aufgetrennt und durch Scmas Western-Blot analysiert. Die Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S diente als Ladekontrolle. Die molare Masse des Markerproteins ist in kDa angegeben.

Neuere Analysen zeigten, dass im Gehirn von CLN2, CLN3 und CLN10 Patienten, sowie in Gehirnen des Mausmodells der CLN11-Erkrankung sowohl Scmas als auch Saposin D gespeichert wird (Götzl *et al*, 2014). Zum Nachweis einer möglichen Saposin D-Speicherung in *Cln7*^(-/-) Mäusen wurden Western-Blot-Analysen von RIPA-Gehirnfraktionen von 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp Mäusen durchgeführt. Gehirnextrakte von 21 Tage alten *Cts D*^(-/-) Mäusen, einem Modell der CLN10-Erkrankung, dienten als Positivkontrolle. In RIPA-Fractionen der *Cts D*^(-/-), *Cln7*^(-/-) und

der Wildtyp Mäuse wurde eine 65 kDa Prosaposin-Bande detektiert. Eine ca. 10 kDa große Saposin D immunreaktive Bande wurde in RIPA-Fractionen der *Cts D*^(-/-) und *Cln7*^(-/-) Mäuse detektiert, die in Wildtyp Mäusen nur sehr schwach war (Abb. 12A). Densitometrische Analysen der Banden zeigten eine signifikante, 1,5-fache Erhöhung von Prosaposin und eine 6-fache Erhöhung von Saposin D in *Cln7*^(-/-)- im Vergleich zu Wildtyp Gehirnen (Abb. 12B).

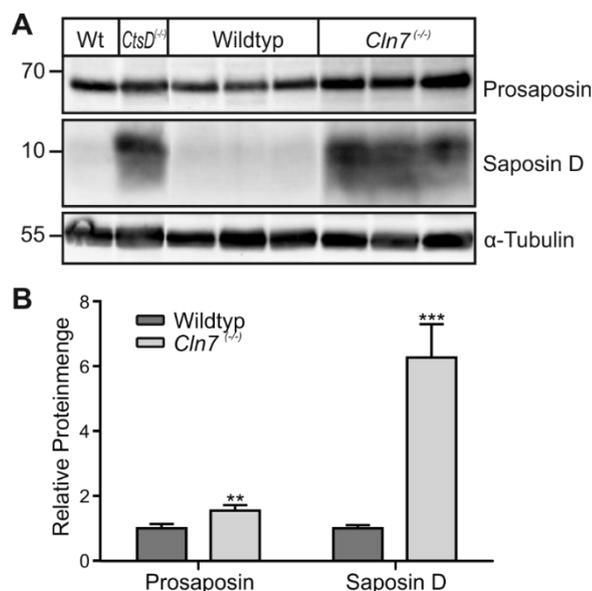


Abb. 12 Akkumulation von Prosaposin und Saposin D im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen.

(A) RIPA-Fractionen (100 µg) aus dem Gehirn von 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp Mäusen (n=3), sowie je einer 21 Tage alten *Cts D*^(-/-)- und Wildtyp Maus wurden durch Tris-Tricin-Gelelektrophorese (Acrylamid-Konzentration: 12,5 %) aufgetrennt und anschließend durch Saposin D Western-Blotting analysiert. Zur Detektion von Saposin D wurde die Nitrozellulosemembran vor der Blockierung für 5 Minuten in PBS gekocht. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Die molaren Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben. (B) Nach densitometrischer Quantifizierung der Bandenintensitäten wurden die relativen Prosaposin- und Saposin D Mengen auf die α -Tubulin-Konzentration in jeder Probe normalisiert und im Balkendiagramm (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt. Die relative Proteinmenge in Wildtyp-Proben wurde gleich 1 gesetzt (**p < 0,01; ***p < 0,005).

4.1.8 Neuroinflammation im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse

Im Gehirn von CLN7 Patienten wurde eine starken Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia beschrieben (Sharifi *et al*, 2010). Da die Untersuchungen *post mortem* durchgeführt wurden, fehlt eine Analyse der zeitlichen neuropathologischen Veränderungen im Gehirn der CLN7 Patienten. Um nachzuweisen, dass das *Cln7*^(-/-) Mausmodell die neuroinflammatorischen Veränderungen bei CLN7 Patienten rekapituliert, wurden immunhistochemische Färbungen von sagittalen Gehirnschnitten von Wildtyp- und *Cln7*^(-/-) Mäusen verschiedener Altersstufen mit Antikörpern gegen

Markerproteine für aktivierte Astrozyten (GFAP; *glial fibrillary acidic protein*) und aktivierte Mikrogliazellen (Iba1; *ionizing calcium-binding adaptor molecule 1*) durchgeführt. Eine starke Astrozytose und eine etwas mildere Mikrogliose wurden in allen Gehirnregionen, vor allem im Hippocampus, Cortex und Medulla von *Cln7*^(-/-) Mäusen detektiert, die in gleichaltrigen Wildtyp Mäusen nicht zu sehen waren (Abb. 13A). Zur Analyse des Beginns und des zeitlichen Verlaufs der Astro- und Mikrogliose wurden immunhistochemische Untersuchungen an Gehirnen von *Cln7*^(-/-) und Wildtyp Mäusen im Alter von 4, 8, 20, 28 und 40 Wochen durchgeführt. GFAP- bzw. Iba1-Färbungen zeigten einen früheren Beginn der Astrozytose (ca. 20 Wochen) im Vergleich zur Aktivierung der Mikrogliazellen (ca. 28 Wochen). Bei 40 Woche alten *Cln7*^(-/-) Mäusen waren sowohl Astrozytose als auch Mikrogliose am stärksten ausgeprägt (Abb. 13B).

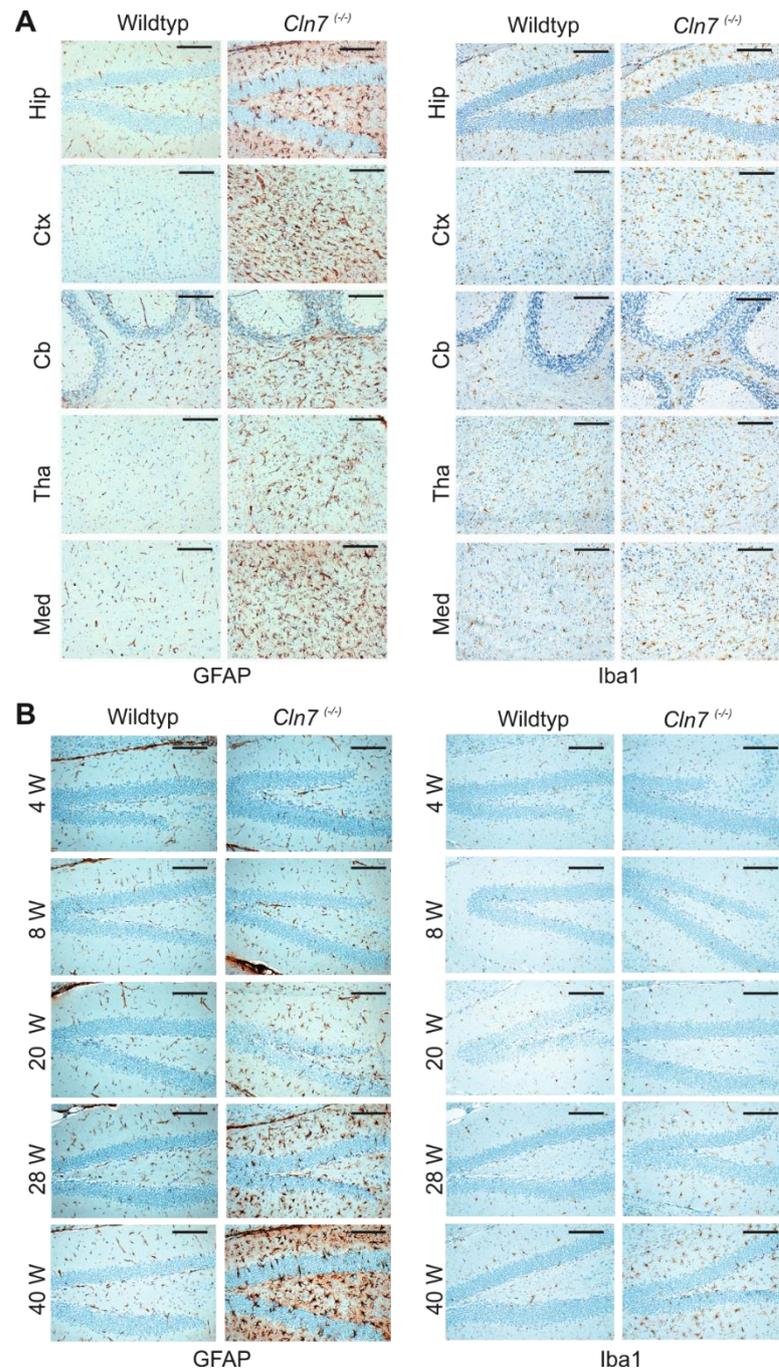


Abb. 13 Progrediente Neuroinflammation im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen.

(A) Sagittale Gehirn-Paraffinschnitte von 40 Wochen alten Wildtyp- und *Cln7*^(-/-) Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Markerproteine für aktivierte Astrozyten (GFAP) und Mikroglia (Iba1) und anschließender Hämalaun-Behandlung gefärbt. Reaktive Astro- und Mikrogliose wurde in allen *Cln7*^(-/-) Gehirnregionen detektiert (Hip: Hippocampus, Ctx; Cortex, Cb: Cerebellum, Tha: Thalamus, Med: Medulla). (B) Früh einsetzende, progredient verlaufende Neuroinflammation in *Cln7*^(-/-) Mäusen. Sagittale Gehirnschnitte von 4, 8, 20, 28 und 40 Wochen (W) alten *Cln7*^(-/-) und Wildtyp- Mäusen wurden mit Antikörpern gegen GFAP und Iba1 gefärbt. GFAP-positive Astrozyten und Iba1-positive Mikrogliazellen wurden ab dem Alter von 20 bzw. 28 Wochen detektiert, die in Gehirnen von gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen fehlten. Die Skalierungsbalken entsprechen 150 μ m

4.1.9 Erhöhung lysosomaler Proteine im *Cln7*^(-/-) Mausmodell

In vielen LSDs inklusive der NCLs ist die Expression löslicher lysosomaler Enzyme, wie Cathepsine, und Membranproteine, wie z.B. Lamp1, erhöht (Götzl *et al.*, 2014; Vitner *et al.*, 2010). In 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen wurden durch immunohistochemische Analysen erhöhte Mengen des LMPs Lamp1 in verschiedenen Gehirnregionen, vor allem in Thalamus und Medulla, detektiert (Abb. 14).

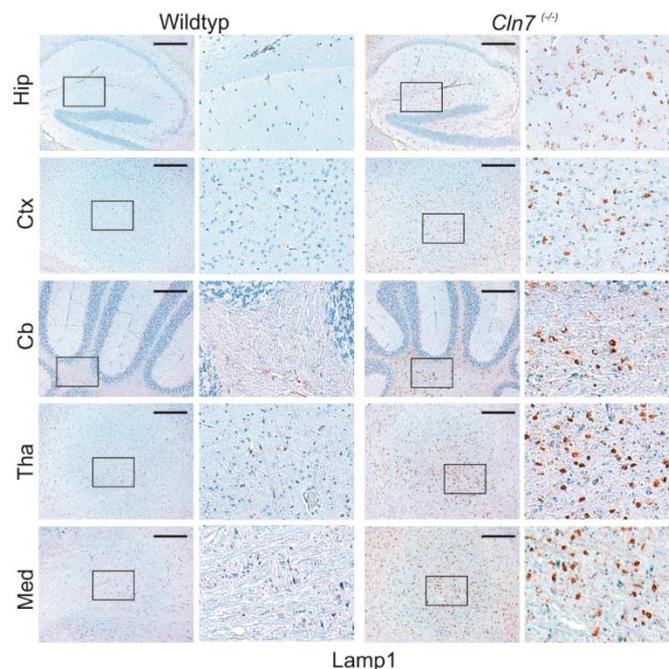


Abb. 14 Erhöhte Lamp1-Proteinexpression in Gehirnen von *Cln7*^(-/-) Mäusen.

Sagittale Gehirnschnitte von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-) und gleichaltrigen Wildtyp Mäusen wurden mit Antikörpern gegen das LMP Lamp1 gefärbt. In allen untersuchten Gehirnregionen (Hip: Hippocampus, Ctx; Cortex, Cb: Cerebellum, Tha: Thalamus, Med: Medulla) wurde eine stark erhöhte Lamp1 Immunreaktivität (braun) im Vergleich zum Wildtyp Mäusen detektiert. Die Skalierungsbalken entsprechen 250 µm. Auf der rechten Seite sind jeweils die 16-fachen Vergrößerungen dargestellt.

Im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen wurde durch Western-Blot-Analysen und quantitative *Realtime* PCR Messungen die Expression von Cathepsin (Cts) B, D und Z untersucht. Im Gehirn von 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen war die Proteinmenge von Cts B ca. 2,5-fach, von Cts D 3-fach und von Cts Z 2-fach im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle erhöht (Abb. 15A und B). Die Transkriptmenge von *Cts D* und *Z* in *Cln7*^(-/-) Gehirnen im Vergleich zu Wildtyp Gehirnen war signifikant ca. 3,5-fach bzw. 2-fach und die Expression von *Cts B* leicht, aber nicht signifikant, erhöht. (Abb. 15C).

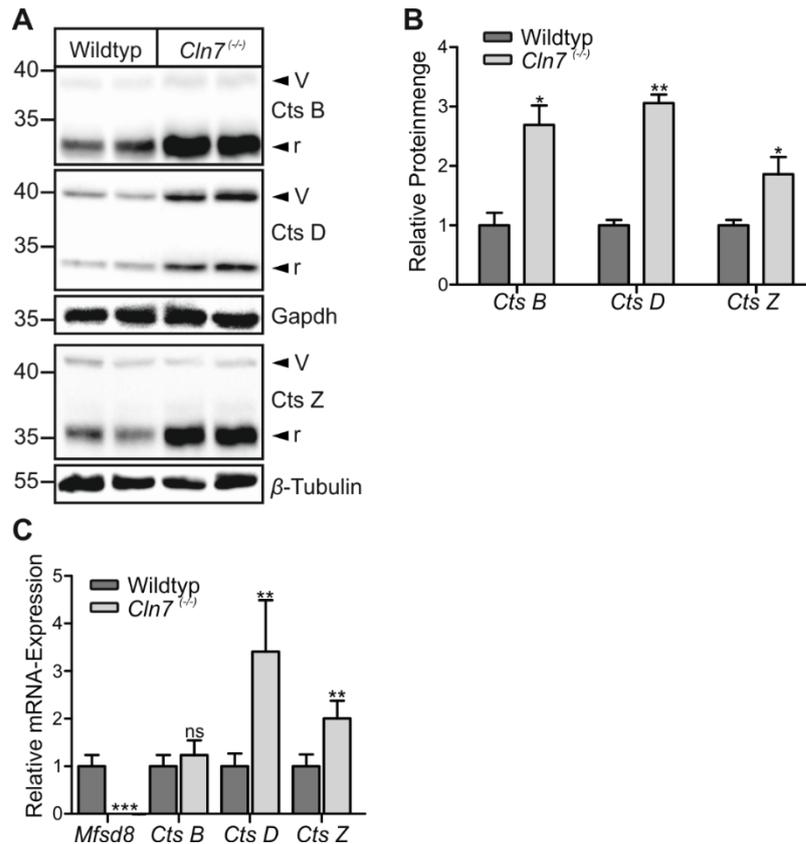


Abb. 15 Erhöhte Expression von Cts B, D und Z auf Protein- und mRNA-Ebene im Gehirn von *Cln7^{-/-}* Mäusen.

(A) Lösliche Fraktionen (100 μ g) von 36 Wochen alten *Cln7^{-/-}* Gehirnen und gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollen (n=2) wurden durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 12,5%) aufgetrennt und durch Cts B, Cts D und Cts Z Western-Blotting analysiert. Als Ladekontrollen dienten Gapdh und β -Tubulin. Die Positionen der Vorläufer (V) und reifen (R) Proteinformen und der Markerproteine (in kDa) sind angegeben. (B) Die Intensität der immunreaktiven Banden wurde densitometrisch ausgewertet und die Cts-Proteinmengen gegen die Ladekontrollen normalisiert. Die relativen Cts B-, Cts D- und Cts Z-Mengen in Wildtyp Gehirnen wurden auf 1 gesetzt (*p < 0,05, **p < 0,01). (C) Aus 36 Wochen alten Wildtyp- und *Cln7^{-/-}* Gehirnen (n=3) wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von *Mfsd8/Cln7*, Cts B, Cts D und Cts Z durch quantitativer Realtime PCR analysiert. Die Werte wurden gegen β -Aktin normalisiert und die Expression im Wildtyp jeweils auf 1 gesetzt (**p < 0,01; ***p < 0,005).

Um herauszufinden, welche Zellen im Gehirn vermehrt Cts Z exprimieren, wurden immunhistochemische Kolokalisations-Analysen mit Antikörpern gegen Cts Z und Markerproteinen von Neuronen (NeuN), Astrozyten (GFAP) und Mikrogliazellen (Iba1) durchgeführt. In Gehirnschnitten von 40 Wochen alten *Cln7^{-/-}* Mäusen wurde eine erhöhte Cts Z-Proteinkonzentration im Hippocampus, Cortex, Cerebellum, Thalamus und Medulla detektiert (Abb. 16A). Die erhöhte Cts Z-Expression wurde hauptsächlich in Iba1-positiven Mikrogliazellen und vereinzelt in NeuN-positiven Neuronen gefunden. In GFAP-positiven Astrozyten wurde keine vermehrte Cts Z-Expression im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp Mäusen detektiert (Abb. 16B).

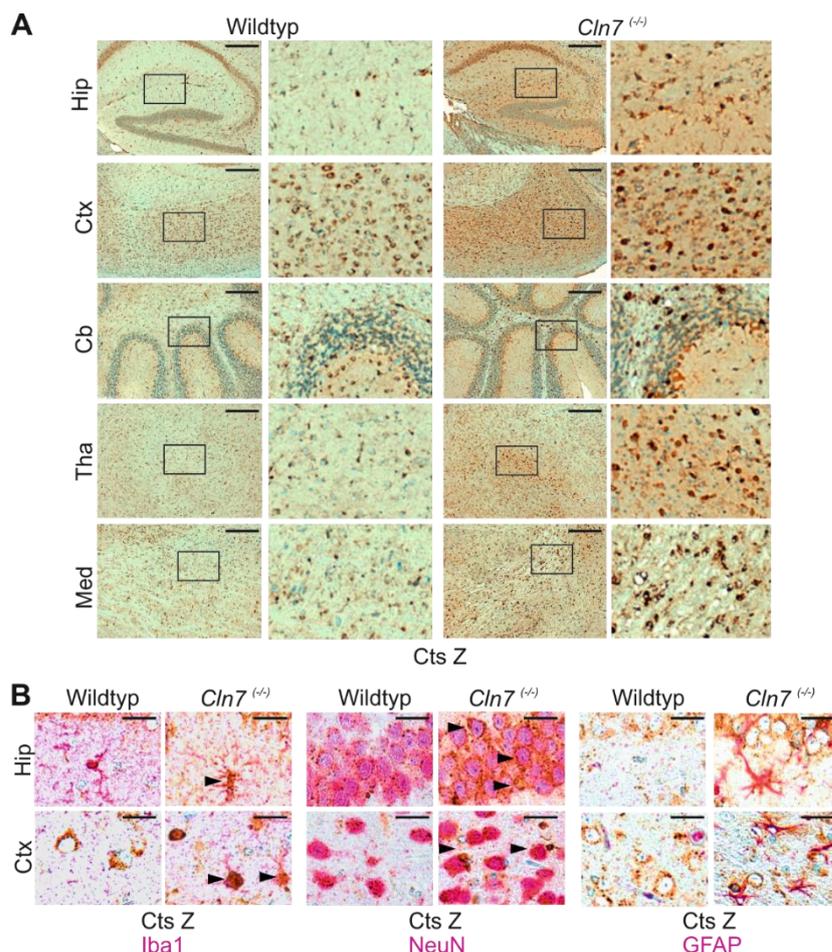


Abb. 16 Erhöhte Cts Z-Expression im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen in Mikroglia und Neuronen. (A) Immunhistochemie von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Gehirnen und gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollen zeigt erhöhte Cts Z (Cts Z) Proteinmengen in Hippocampus (Hip), Cortex (Ctx), Cerebellum (Cb), Thalamus (Tha) und Medulla (Med) von *Cln7*^(-/-) Mäusen. Die Skalierungsbalken entsprechen 250 μ m. Auf der rechten Seite sind die durch die schwarzen Rechtecke markierten Areale in 16-facher Vergrößerung dargestellt. (B) Die gleichen sagittalen Gehirnschnitte wurden mit Antikörpern gegen Cts Z (braun) und Markerproteinen (rosa) von Mikrogliazellen (Iba1), Neuronen (NeuN) und Astrozyten (GFAP) gefärbt. Zellen mit höherer Cts Z Expression sind durch Pfeilköpfe markiert. Es wurde zusätzlich eine Hämalaun-Färbung durchgeführt. Die Skalierungsbalken entsprechen 20 μ m.

4.1.10 Akkumulation von Eisen im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäusen

Im Transkriptom von 10 Wochen alten Hfe-defizienten (hereditäre-Hämochromatose-Protein/ *high iron FE*) Mäusegehirnen wurde eine Dysregulation der NCL-assoziierten Gene *Ppt1*, *Tpp1*, *Cln3*, *Cln5*, *Mfsd8/Cln7* und *Cln8* festgestellt (Johnstone *et al*, 2012). Dabei war die *Cln7* mRNA im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen 1,5-fach hochreguliert. Hfe ist ein Transmembranprotein, das mit dem Transferrinrezeptor interagiert und die Aufnahme von Eisen in die Zelle reguliert (Gao *et al*, 2009). Ferner wurde gezeigt, dass Lipofuszin-Pigmente zu 2% aus Metallionen, wie Eisen, Kupfer, Zink, Aluminium, Mangan und Calcium, zusammengesetzt sind (Gray & Woulfe, 2005).

Es sollte untersucht werden, ob die *Cln7*-Defizienz Einfluss auf die Eisenhomöostase im Gehirn hat.

In Gehirnschnitten von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen wurden durch *Perls Prussian-Blue*-Färbung erhöhte Eisenkonzentrationen im Cortex, Hippocampus (CA1-Region) und Thalamus im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen detektiert (Abb. 17A). Anschließend wurden die Transkriptmengen verschiedener Eisenstoffwechsel-assoziiierter Gene in Wildtyp- und *Cln7*^(-/-) Mäusen mittels quantitativer *Realtime* PCR überprüft. Es wurden signifikant geringere *mRNA*-Expressionen des Transferrinrezeptors (*Tfr*) und des divalenten Metalltransporters (*Dmt 1*) und eine ca. 2-fach erhöhte *mRNA*-Expression der leichten Ferritinkette (*Ftl1*) in Gehirnen 36 Wochen alter *Cln7*^(-/-) Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollen gefunden. Die Transkriptmenge von Ferroportin (*Fpn1*) war gering, aber statistisch nicht signifikant, erniedrigt (Abb. 17B). Die verringerte Expression von *Tfr* und *Dmt1*, sowie die starke Hochregulation von *Ftl1* in *Cln7*^(-/-) Gehirnen, lassen vermuten, dass die Eisenkonzentration in *Cln7*^(-/-) Gehirnen möglicherweise erhöht ist. Western-Blot-Analysen zeigten jedoch, dass die *Tfr*- und *Ftl1*-Proteinmengen in 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollen unverändert waren (Abb. 17C).

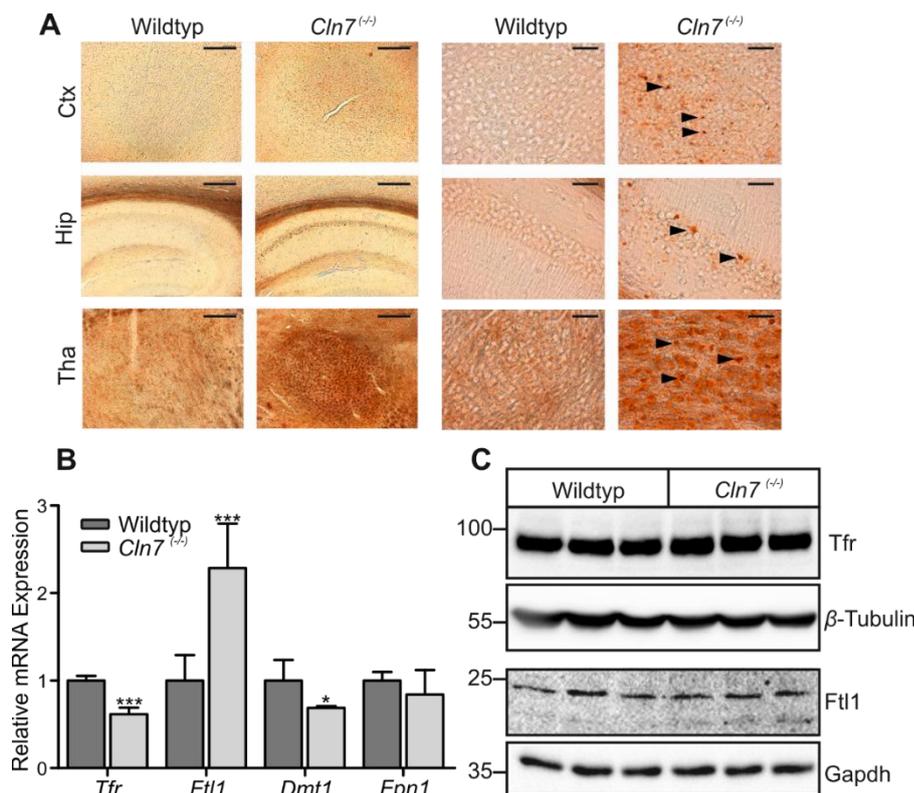


Abb. 17 Eisenspeicherung in *Cln7^{-/-}* Gehirnen.

(A) *Perls Prussian-Blue*-Färbung von Gehirnschnitten mit anschließender 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-Reaktion zeigen Eisenablagerungen (schwarze Pfeilköpfe) in Cortex (Ctx), Hippocampus (Hip) und Thalamus (Tha) von 40 Wochen alten *Cln7^{-/-}* Mäusen, die in Wildtyp-Kontrollen abwesend waren. Die Skalierungsbalken entsprechen 250 μ m (links) bzw. 50 μ m (rechts). (B) Aus Gehirnen von 36 Wochen alten *Cln7^{-/-}* und Wildtyp-Mäusen ($n=3$) wurde die *mRNA* isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von Transferrinrezeptor (*Tfr*), Ferritin (*Ftl1*), divalenten Metalltransporter (*Dmt1*) und Ferroportin (*Fpn1*) durch quantitative *Realtime* PCR analysiert. Die quantifizierte *mRNA*-Mengen wurden auf den Gehalt von β -Aktin *mRNA* in jeder Probe normalisiert und die relative *mRNA*-Expression (Mittelwert \pm Standardabweichung) von Wildtyp- und *Cln7^{-/-}* Mäusen dargestellt. Die *mRNA*-Expression der Wildtyp-Proben wurde auf 1 gesetzt (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$). (C) Gehirnslysate (70 μ g) von 36 Wochen alten *Cln7^{-/-}*- und Wildtyp Mäusen wurden durch SDS-PAGE (Tfr-Detektion: Acrylamid-Konzentration: 8%; Ftl1-Detektion, Acrylamid-Konzentration: 15%) aufgetrennt und durch Western-Blot analysiert. Als Ladekontrollen dienten β -Tubulin bzw. Gapdh. Die Proteinmengen von Tfr und Ftl1 waren in den *Cln7^{-/-}* Mäusegehirnen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nicht verändert. Die molaren Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

4.1.11 Gestörte Autophagie als Pathomechanismus im *Cln7^{-/-}* Mausmodell

In neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und frontotemporaler Demenz, sowie im Gehirn verschiedener NCL-Mausmodelle (*Cln3*, *Cln6*, Cts D/ *Cln10*) wurden vermehrt Autophagosomen detektiert (Koike *et al*, 2005; Mizushima *et al*, 2002; Tanaka *et al*, 2014; Thelen *et al*, 2012).

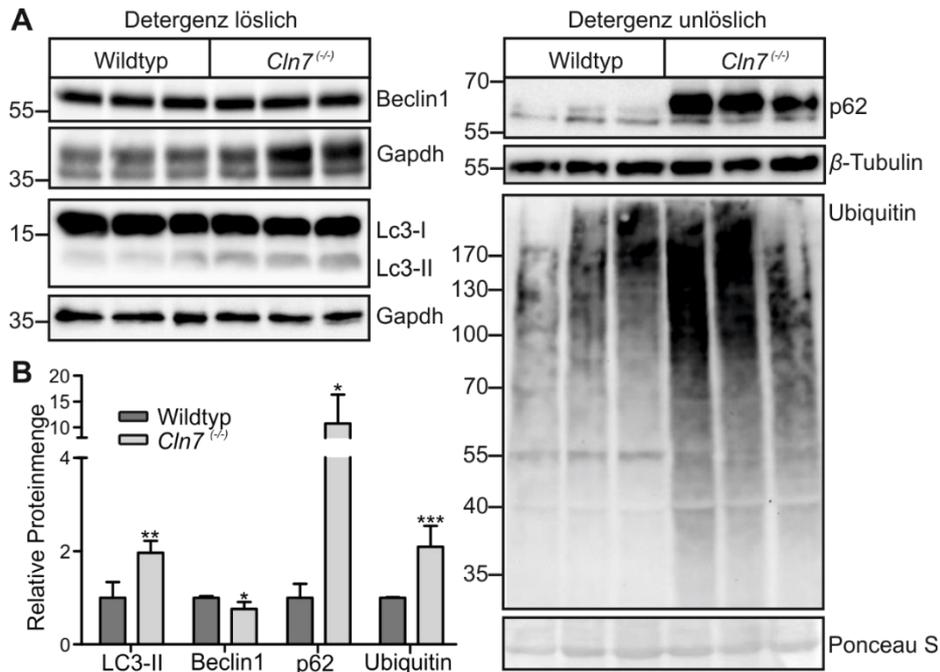


Abb. 18 Aggregation von Autophagie-Adapterproteinen und polyubiquitinierten Proteine in *Cln7*^{-/-} Gehirnen.

(A) Aus Gehirnhomogenaten von 40 Wochen alten Wildtyp- und *Cln7*^{-/-} Mäusen (n=3) wurden Detergenz-lösliche und -unlösliche Fraktionen hergestellt, durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 10%; p62, Beclin1, Ubiquitin; Acrylamid-Konzentration: 15%; LC3) aufgetrennt und durch Western-Blotting analysiert. Als Ladekontrollen dienten β -Tubulin, Gapdh und Ponceau S. Die molaren Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben (B) Nach densitometrischer Quantifizierung der Bandenintensitäten wurden die relativen Mengen von LC3-II, Beclin1, p62 und polyubiquitinierten Protein auf die Konzentration der Ladekontrollen in jeder Probe normalisiert und im Balkendiagramm (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt. Die relative Proteinmenge in Wildtyp-Proben wurde gleich 1 gesetzt (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005).

Um zu überprüfen, ob im Gehirn Störungen der Autophagie Pathomechanismus bei der CLN7-Erkrankung beteiligt sind, wurden Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen etablierte Markerproteine der Autophagie durchgeführt. In 40 Wochen alten *Cln7*^{-/-} Gehirnen wurden in Western-Blot-Analysen 2-fach höhere Mengen des Autophagie-Markerproteins LC3-II in Detergenz-löslichen Fraktionen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen detektiert (Abb. 18A und B). Um zu untersuchen, ob die Akkumulation von Autophagosomen auf eine erhöhte Neubildung und/ oder verminderte Fusion bzw. Abbau in Lysosomen zurückzuführen ist, wurden die Proteinmengen von Beclin1 in Western-Blot-Analysen quantifiziert. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten zeigte nach Normalisierung keine signifikanten Unterschiede der Beclin1-Mengen zwischen *Cln7*^{-/-}- und Wildtyp Gehirnen. Diese Befunde zeigen, dass die höheren Mengen an LC3-II-positiven Autophagosomen nicht auf eine Induktion der Autophagie

zurückzuführen ist. In Detergenz-unlöslichen Fraktionen der *Cln7*^(-/-) Gehirne wurden 10-fach und 2-fach erhöhte Mengen des Autophagie-Adapterproteins p62 bzw. polyubiquitiniertes Proteine im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen gefunden (Abb. 18A und B). Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass p62- und Ubiquitin-positive Aggregate in Neuronen verschiedener Gehirnregionen (Hippocampus, Cortex, Cerebellum, Thalamus und Medulla) detektiert wurde (Abb. 19). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine Störung der Makroautophagie im Endstadium der CLN7-Erkrankung einen Pathomechanismus im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse darstellt, der möglicherweise zur Neurodegeneration beiträgt.

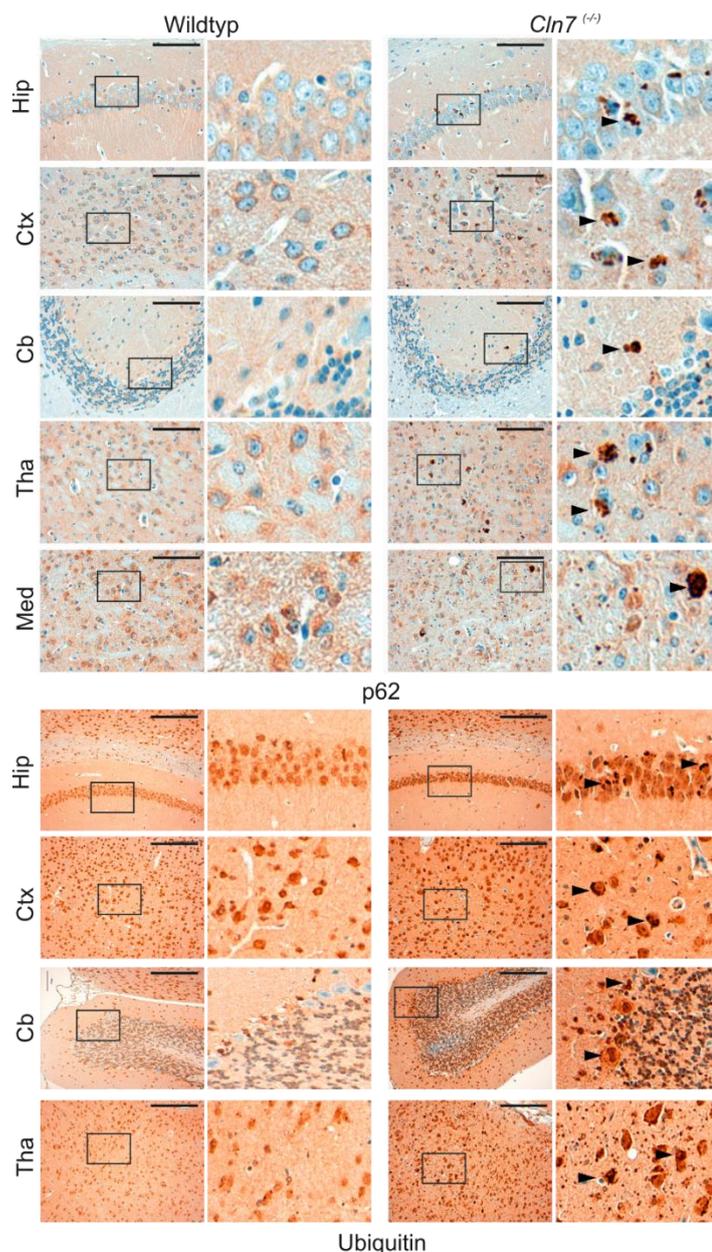


Abb. 19 P62-positive und polyubiquitinierte Proteinaggregate im Gehirn von *Cln7*^{-/-} Mäusen. Immunhistochemie von 40 Wochen alten *Cln7*^{-/-} Mäusen und Wildtyp-Kontrollen zeigen große p62- und Ubiquitin-positive Aggregate (schwarze Pfeilköpfe) in Hippocampus (Hip), Cortex (Ctx), Cerebellum (Cb), Thalamus (Tha) und Medulla (Med). Die Zellkerne sind mit Hämalaun angefärbt. Die Skalierungsbalken entsprechen 200 μ m. Auf der rechten Seite sind die durch die schwarzen Rechtecke markierten Areale in 16-facher Vergrößerung dargestellt.

4.1.12 Neurodegeneration im *Cln7*^{-/-} Mausmodell

In Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen wurde im Gehirn von CLN7 Patienten mit variant spät-infantilem Phänotyp eine schnell fortschreitende, starke Atrophie des Cortex und Cerebellums gefunden (Aiello *et al.*, 2009; Sharifi *et al.*, 2010).

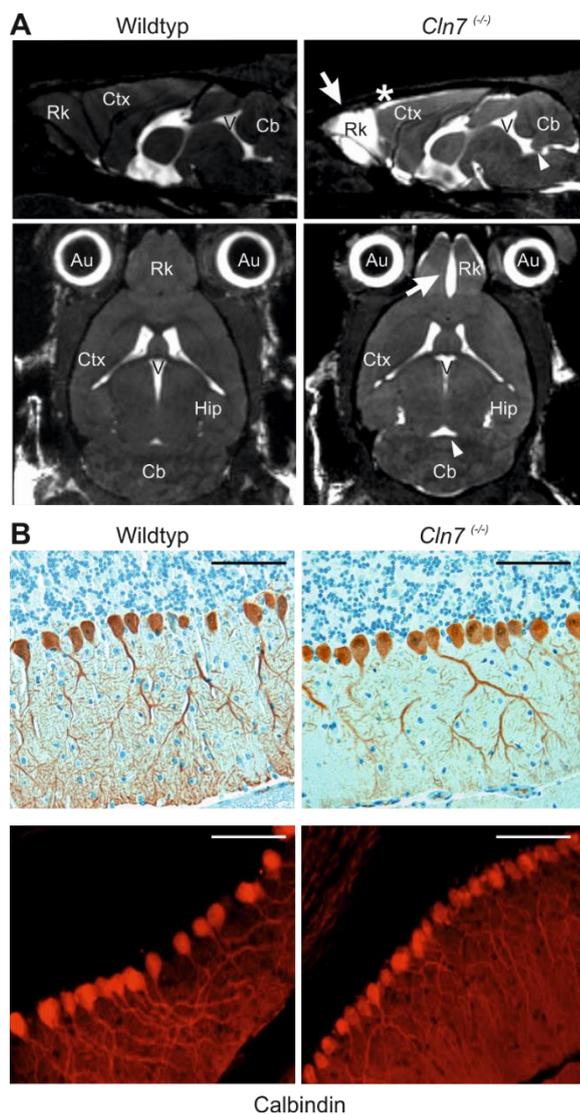


Abb. 20 Neurodegeneration im Riechkolben, Cortex und Cerebellum von *Cln7*^(-/-) Mäusen.

(A) Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen (sagittale Schnittebene) zeigen Gehirnatrophie im Bereich des Riechkolbens (weißer Pfeil), Cerebellums (weißer Pfeilkopf) und zerebralen Cortex (weißer Stern) in 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen (n=5), die in gleichaltrigen Wildtyp-Kontrolltieren nicht zu detektieren war. In Aufnahmen mit transversaler Schnittebene ist Atrophie im Riechkolben (weißer Pfeil) und eine leichte Erweiterung innerer Ventrikel, die das Cerebellum begrenzen (weißer Pfeilkopf), erkennbar. Die verschiedenen Gehirnregionen sind eingezeichnet (Rk: Riechkolben, Au: Auge, Ctx: Cortex, Hip: Hippocampus, V: Ventrikel, Cb: Cerebellum). (B) Keine Veränderung der Morphologie und Zellzahl cerebellärer Purkinjezellen in 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Gehirnen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Gehirnschnitte wurden mit Antikörpern gegen ein Markerprotein für Purkinjezellen (Calbindin) inkubiert. Der Nachweis der Erstantikörper erfolgte durch Biotin-gekoppelte Sekundäntikörper mit abschließender DAB-Detektion (oben). Purkinjezellen sind in braun und Zellkerne in blau dargestellt. In der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte der Nachweis des Erstantikörpers durch Alexa Fluor 546 gekoppelte Sekundäntikörper. Purkinjezellen sind rot dargestellt. Die Skalierungsbalken entsprechen jeweils 70 μm .

Bei MRT-Untersuchungen von 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen wurde Neurodegeneration im Riechkolben, Cortex und Cerebellum beobachtet, die in gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollmäusen fehlte (Abb. 20A). Um zu überprüfen, ob die

Atrophie des Cerebellums auf den Verlust cerebellärer Purkinjezellen zurückzuführen ist, wurden sagittale Gehirnschnitte von 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp-Mäusen immunhistochemisch mit einem gegen ein Markerprotein für cerebelläre Purkinjezellen (Calbindin) gerichteten Antikörper angefärbt. Dabei wurden keine Unterschiede in der Morphologie und Anzahl cerebellärer Purkinjezellen beobachtet (Abb. 20B).

4.1.13 Photorezeptoren-Degeneration und pathologische Veränderungen in der Retina von *Cln7*^(-/-) Mäusen

Ein Hauptmerkmal der CLN7- aber auch anderer NCL-Erkrankungen (CLN1, CLN2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8) stellt die frühzeitige Erblindung der Patienten durch Neurodegeneration in der Retina dar (Jalanko & Braulke, 2009). Da auch andere NCL-Mausmodelle, wie *Cln3*, *Cln6/nclf*, *Cln8* und *Cln11* retinale Degeneration zeigen (Bartsch *et al.*, 2013; Hafler *et al.*, 2014; Seigel *et al.*, 2002; Seigel *et al.*, 2005) wurde in Zusammenarbeit mit Wanda Jankowiak und Udo Bartsch von der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde (UKE) die altersabhängigen morphologischen und biochemischen Veränderungen in der Retina von *Cln7*^(-/-) Mäusen untersucht. Schnitte der zentralen und peripheren Retina von 16 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen und gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollen wurden durch Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Markerproteine von Photorezeptoren (Recoverin) untersucht. Die neuronalen Zellschichten in der Retina wurden mittels einer DAPI-Färbung dargestellt. Die äußere Körnerschicht (*onl*; *outer nuclear layer*) der Retina, in der die Zellkörper der Photorezeptoren lokalisiert sind, ist DAPI- und Recoverin-positiv. In den 16 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen war die Schichtdicke der äußeren Körnerschicht (*onl*) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen bereits um 30 % vermindert (Abb. 21A). In der *onl* der zentralen Retina waren ca. 3-4 Zellschichten, in der *onl* der peripheren Retina ca. 1-2 Zellschichten detektierbar. Um die lysosomale Dysfunktion und Pathologie in der Retina von *Cln7*^(-/-) Mäusen zu analysieren, wurden biochemische Untersuchungen durchgeführt. Da die Schichtdicke der retinalen *onl* bei 16 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen bereits stark vermindert war, wurden die Retinas von 8 Wochen alten Mäusen präpariert und analysiert. Western-Blot-Analysen von Detergenz-unlöslichen- und RIPA-Frakturen zeigten die Speicherung von Scmas und Saposin D in der Retina der *Cln7*^(-/-) Mäuse, die in Wildtyp Mäusen nicht beobachtet wurde. Weiterhin wurden in *Cln7*^(-/-) Retinas im Vergleich zu den Wildtyp-

Kontrollen erhöhte Mengen der lysosomalen Proteinen Lamp1, Cts B, Cts D und Cts Z beobachtet (Abb. 21B).

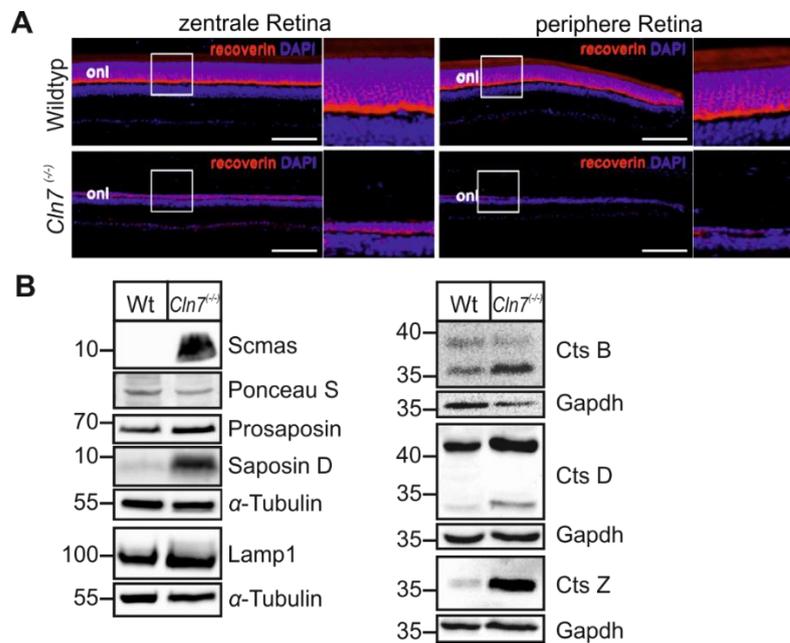


Abb. 21 Progressive Degeneration der Photorezeptoren und lysosomale Dysfunktion in der Retina von *Cln7*^{-/-} Mäusen.

(A) Immunohistochemie retinaler Schnitte von 16 Wochen alten *Cln7*^{-/-}- und Wildtyp Mäusen zeigt die Neurodegeneration der DAPI (blau) und Recoverin- (rot) positiven äußere Körnerzellschicht (*outer nuclear layer*, *onl*) in der zentralen und peripheren Retina. Die Skalierungsbalken entsprechen 100 μ m. Auf der rechten Seite sind die durch die weißen Rechtecke markierten Areale von *Cln7*^{-/-}- und Wildtyp-Retinas in 4-facher Vergrößerungen dargestellt. (B) Akkumulation von Scmas und erhöhte Proteinexpression lysosomaler Proteine. Retinas von acht Wochen alten Wildtyp (Wt) und *Cln7*^{-/-} und Mäusen (n=3) wurden vereint und in gleiche Aliquots zur Gewinnung von Triton X-100-löslichen (Detektion von Cts D, B, Z) und unlöslichen Fraktionen (Detektion von Scmas) bzw. RIPA-Fractionen (Detektion von Prosaposin, Saposin D, Lamp1) aufgeteilt. Aliquots wurden durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 15%) bzw. Tris-Tricin SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 12,5%; Detektion von Prosaposin, Saposin D, und Lamp1) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Western-Blot analysiert. Ponceau S, Gapdh und α -Tubulin dienten als Ladekontrollen. Die molaren Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

4.1.14 Funktionelle Analysen mit *Cln7*^{-/-} embryonalen Mausfibroblasten

Pulse-Chase-Analysen von metabolisch markierten Zellen in Verbindung mit der Immunpräzipitation als Proteindetektion sind eine sehr sensitive und geeignete Methode, um die Biosynthese und die Kinetik des intrazellulären Transports und posttranslationaler Modifikationen von neusynthetisierten lysosomalen Enzymen zu analysieren (Pohl & Hasilik, 2015). Die Untersuchung der Zellüberstände erlaubt Aussagen über eine mögliche Missortierung lysosomaler Enzyme ins Medium. In *Cln7*-defizienten Zellen (MEFs) wurde der Biosyntheseweg zum Lysosom und die proteolytische Prozessierung der beiden neusynthetisierten, M6P-modifizierten lysosomalen Enzyme Cts D und Cts Z

untersucht. Wildtyp- und *Cln7*^(-/-) MEFs wurden aus E-14,5-Embryonen isoliert und kultiviert. Sie wurden auf 3,5 cm-Petrischalen ausplattiert und bei Erreichen der Konfluenz mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert, danach entweder geerntet oder für 5 h lang im *Chase*-Medium inkubiert. Um die Aufnahme möglicher missortierter Cts D- oder Cts Z-Vorläuferformen zu inhibieren, wurde dem Medium während der *Chase*-Periode M6P zugefügt. Analyse der Fluorogramme zeigten keine Veränderungen in der Biosynthese, dem Transports und der proteolytischen Prozessierung von Cts D und Cts Z in *Cln7*^(-/-) MEFs im Vergleich zu Wildtyp MEFs (Abb. 22A und B). Die korrekte Prozessierung der lysosomalen Enzyme im Lysosom zu intermediären bzw. reifen Proteinformen ist ein Hinweis auf einen unveränderten pH im Lysosom von *Cln7*^(-/-) MEFs.

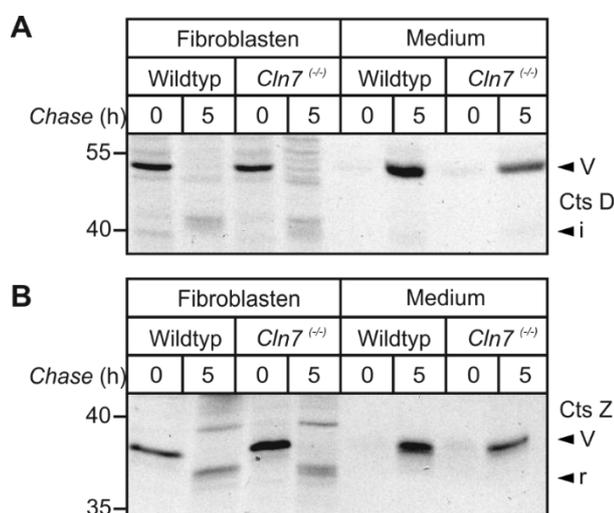


Abb. 22 Biosynthese, Sortierung und proteolytische Spaltung von Cts D und Cts Z sind in *Cln7*^(-/-) MEFs nicht verändert.

Wildtyp- und *Cln7*^(-/-) MEFs wurden für 1 h in Methionin-freiem Hungermedium inkubiert und für 45 min mit *Pulse*-Medium, welches [³⁵S]-Methionin (100 µCi/ml) und 5 mM Mannose-6-Phosphat (M6P) enthielt, metabolisch markiert. MEFs wurden entweder geerntet oder für weitere 5 h in *Chase*-Medium inkubiert. Nach der Zellyse wurden Cts D (**A**) und Cts Z (**B**) jeweils aus den Zellen und Medien immunpräzipitiert, die Präzipitate durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 12,5 %) aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. Die Vorläufer (V)-, intermediären (i)- und reifen (r) Proteinformen, sowie die molaren Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben.

LSDs können sekundär zur Störungen des intrazellulären Membrantransports und der Endozytose führen (Metha, 2012). Zur Analyse der MPR300- und Clathrin-abhängigen Endozytose in *Cln7*-defizienten Zellen wurden *Cln7*^(-/-) und Wildtyp MEFs mit [¹²⁵I]-markierter Arylsulfatase B (ASB) inkubiert und die Zellen entweder geerntet oder für weitere 2 und 4 h mit nicht-radioaktivem Medium kultiviert (*Chase*). Die Fluorogramme

zeigten gleiche Mengen des ~60 kDa ASB-Vorläuferproteins und der prozessierten ~40 kDa ASB-Intermediärform nach dem *Chase* in *Cln7*^(-/-) und Wildtyp MEFs (Abb. 23). Die Spezifität der Aufnahme wurde durch die starke Hemmung der ASB-Endozytose in Medien mit M6P gezeigt (Abb. 23). Die M6P-abhängige Bindung und Aufnahme der ASB durch den MPR300, der intrazelluläre Transport der ASB-haltigen Vesikel zu endosomalen Kompartimenten und die Prozessierung der ASB-Vorläuferformen zu Intermediärformen waren in *Cln7*-defizienten Zellen nicht verändert.

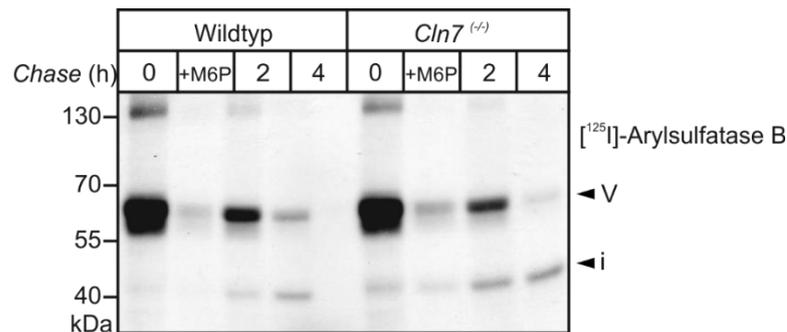


Abb. 23 M6P-abhängige Endozytose von ASB ist in *Cln7*^(-/-) MEFs nicht verändert.

Wildtyp- und *Cln7*^(-/-) MEFs wurden für 20 min mit [¹²⁵I]-markierter ASB in An- (+M6P) und Abwesenheit von 10 mM M6P inkubiert. Zellen wurden entweder geerntet oder für weitere 2 oder 4 h mit Chase-Medium inkubiert. Zelllysate wurden durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 10 %) aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die Vorläufer (V)- und intermediäre (i)- Proteinform, sowie die molaren Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben.

4.2 Adaptorprotein-abhängiger Transport des lysosomalen Membranproteins CLN7

In eukaryotischen Zellen existieren fünf heterotetramere Adaptorproteinkomplexe AP1 bis AP5, die aus zwei großen (AP1- γ/β 1, AP2- α/β 2, AP3- δ/β 3, AP4- ϵ/β 4, AP5 ζ/β 5), einer mittleren (μ 1- μ 5) und einer kleinen Untereinheit (σ 1- σ 5) zusammengesetzt sind. APs interagieren mit Sortierungssignalen in den zytosolischen Domänen der Cargo-Proteine und mit Hüll- und akzessorischen Proteinen und vermitteln den intrazellulären und sekretorischen Transport (Park & Guo, 2014). In Arbeiten von Dr. Steenhuis wurde gezeigt, dass CLN7 ein dominantes N-terminales Di-Leucinmotiv vom Typ [D/E]XXXL[L/I] und zwei funktionelle C-terminale Tyrosinmotive vom Typ YXX \emptyset besitzt (Steenhuis *et al*, 2010). Durch *yeast three-hybrid* (Y3H) Experimente zeigte Dr. Steenhuis, dass die N-terminale CLN7-Domäne mit den AP1- γ/σ 1-, AP2- α/σ 2-, AP3- δ/σ 3-Hemikomplexen, nicht jedoch mit AP4- γ/σ 4 interagiert. Durch Alanin-Substitution der kritischen E9, L13, L14-Reste des N-terminalen Sortierungssignals wurde die

Interaktion inhibiert (Steenhuis, 2015). In *yeast two-hybrid* (Y2H) Experimenten wurde die Interaktion der C-terminalen CLN7-Domäne mit den μ 1A und μ 4-Untereinheiten gezeigt. Die Alanin-Substitution der Tyrosinreste der beiden Tyrosin-Sortierungssignale, allein oder in Kombination, verhinderte die Interaktion (Steenhuis, 2015). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktionen der N- und C-terminalen Domänen von CLN7 mit den APs durch unabhängige Methoden zu bestätigen. Schließlich sollte die Bedeutung der CLN7-AP Interaktionen für den intrazellulären Transport und die Lokalisation von CLN7 *in vivo* mit Hilfe von AP-herunterregulierten (*kd*, *knockdown*) Zelllinien analysiert werden.

4.2.1 Glutathion S-Transferase (GST)-Kopräzipitations-Analysen verifizieren die Interaktion des N-terminalen Di-Leucinmotivs mit AP1 und AP2

Bei den Y2H/ Y3H-Analysen wurde die Interaktion des N- und C-Terminus (NT/CT) von CLN7 mit den AP-Hemikomplexen bzw. den einzelnen AP μ -Untereinheiten untersucht. Um die CLN7-AP Interaktionen zu verifizieren und Aussagen über die Affinität der Bindung zu erhalten, wurden GST-Kopräzipitations-Analysen mit den vollständigen heterotetrameren APs durchgeführt.

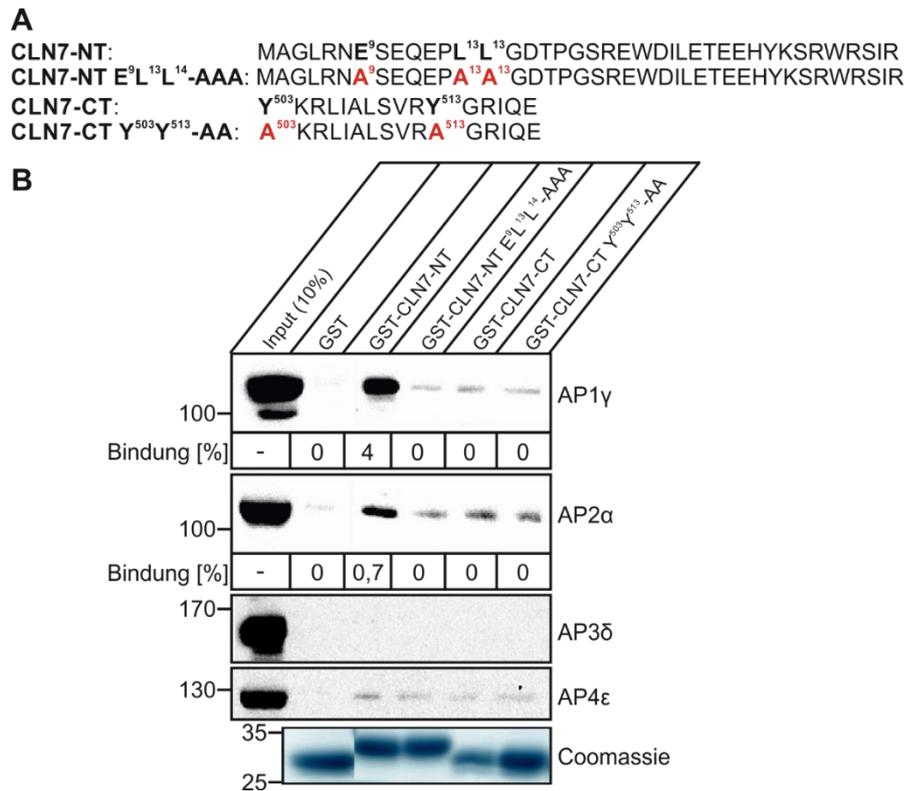


Abb. 24 GST-Pulldown zeigt die Interaktion des CLN7-NT mit AP1 und AP2.

(A) Aminosäuresequenzen des CLN7-NT und CLN7-CT. Die kritischen Reste der N-terminalen Di-Leucin- und Tyrosin-haltigen Motive sind fett dargestellt, durch Alanin-substituierte Reste sind rot eingezeichnet. (B) 100 µg Wildtyp und mutante (GST-CLN7-NT E⁹L¹³L¹⁴-AAA; GST-CLN7-CT Y⁵⁰³Y⁵¹³-AA), an Glutathion-Agarose gebundene, GST-Fusionsproteine wurden für 2 h auf einem Drehrad mit HEK293T-Lysaten (2,5 mg pro Kopräzipitationsansatz) inkubiert. GST diente als Negativkontrolle, um unspezifische Bindung an GST auszuschließen. Gebundene Proteine wurden durch Hitzedenaturierung bei 95 °C solubilisiert und die Eluate durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 8 %) aufgetrennt. Die Anwesenheit von APs in den Eluaten wurde durch AP1γ, AP2α, AP3δ und AP4ε-Western-Blotting überprüft. Es wurden Interaktionen von CLN7-NT mit AP1 und AP2 detektiert. 10% der eingesetzten HEK293T-Lysatmengen wurden zum Vergleich im Western-Blot analysiert. Die Mengen der für die Kopräzipitationen aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden durch Coomassie-Färbung überprüft. Die molaren Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben.

Hierzu wurden rekombinant exprimierte und affinitätsaufgereinigte GST-CLN7 Fusionsproteine mit HEK293T-Lysaten, die alle Adaptorproteine enthalten, inkubiert und gebundene APs durch Western-Blotting quantifiziert. Als Köderproteine wurden GST-Fusionsproteine mit dem CLN7-NT (GST-CLN7-NT; AS 1-40) und CT (GST-CLN7-CT, AS 503-518) in *E. coli* Zellen exprimiert und affinitätsaufgereinigt. Als Negativkontrollen dienten GST und GST-CLN7-Fusionsproteine, bei denen die kritischen AS-Reste des Di-Leucin- (GST-CLN7-NT E⁹L¹³L¹⁴-AAA) und der beiden Tyrosin-Sortierungssignale (GST-CLN7-CT Y⁵⁰³Y⁵¹³-AA) durch Alanin substituiert wurden (Abb. 24A). Die apparenten Molekulargewichte der exprimierten GST bzw. GST-Fusionsproteine stimmten mit den vorhergesagte Größen von etwa 26 kDa für GST,

30,8 kDa für GST-CLN7-NT, 30,6 kDa für GST-CLN7-NT E⁹L¹³L¹⁴-AAA, 28 kDa für GST-CLN7-CT und 27,8 kDa GST-CLN7-CT-Y⁵⁰³A Y⁵¹³A überein (Abb. 24B). An Glutathion-Agarose gebundene Köderproteine wurden mit HEK293T-Lysat auf dem Drehrad inkubiert, gewaschen und die interagierenden Proteine durch Hitzedenaturierung bei 95 °C von der Glutathion-Agarose eluiert. Die Eluate der Kopräzipitation wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die CLN7-AP Interaktion durch AP1 γ -, AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ -Immundetektion überprüft. Nach Abzug der unspezifischen Bindung des GST-CLN7-NT E⁹L¹³L¹⁴-AAA Fusionsproteins wurde AP1 (Kopräzipitation von 4 % des eingesetzten AP1) als Hauptinteraktionspartner des CLN7-NT identifiziert. Es wurde eine schwache Bindung von AP2 (Kopräzipitation von 0.7 % des eingesetzten AP2) an den CLN7-NT, während keine Bindung an AP3 und AP4 detektiert wurde. Eine unspezifische Bindung an GST wurde ausgeschlossen, da keine Interaktion der Negativkontrolle GST mit den AP-Proteinen gefunden wurde. Die CLN7-NT/AP1 und CLN7-NT/AP2 Interaktionen wurden durch das N-terminale Di-Leucinmotiv vermittelt, da die Alanin-Substitution der kritischen Reste (GST-CLN7-NT E⁹L¹³L¹⁴-AAA) die Bindung verhinderte. Es wurden keine, durch Western-Blot-Analysen detektierbare, spezifische Interaktion der GST-CLN7-CT Fusionsproteine mit den untersuchten APs detektiert (Abb. 24B).

4.2.2 Die Tyrosin-Motive der C-terminalen Domäne von CLN7 interagieren mit μ 1A und μ 2

Der CLN7-CT enthält zwei funktionelle Tyrosin Motive (Y⁵⁰³KRL, Y⁵¹³GRI) vom Typ YXX \emptyset . Für die lysosomale Sortierung von CLN7 sind die Tyrosin-Motive nicht essentiell, da die Alanin-Substitution der kritischen Tyrosinreste allein oder in Kombination zu keiner höheren Missortierung von CLN7 an die Plasmamembran führte. Die Alanin-Substitution des Di-Leucin- in Kombination mit den beiden Tyrosinmotiven erhöht jedoch die Missortierung von CLN7 an die Plasmamembran, was eine Bedeutung der Tyrosinmotive für die Endozytose von fehlsortiertem CLN7 vermuten lässt (Steenhuis *et al*, 2010). Zur Verifizierung der im Y2H-System gefundenen Interaktion des CLN7-C Terminus mit der AP1- μ 1 Untereinheit und zur Analyse der Interaktion mit μ 2 und μ 3A, wurden Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Messungen (SPR) mit kommerziell synthetisierten CLN7-CT Peptiden und in *E. coli* rekombinant exprimierten,

über Ni-NTA aufgereinigten 6xHis- μ 1A, 6xHis- μ 2 und 6xHis- μ 3A-Untereinheiten durchgeführt. Die exprimierten Proteine haben die erwartete Größe von etwa 33 kDa für μ 1A (AS 158-423), 35 kDa für μ 2 (AS 158-435) und 31 kDa für μ 3A (AS 178-418) (Abb. 25A). Rekombinant exprimiertes μ 4 stand für die Untersuchungen nicht zur Verfügung, da es in dem *E. coli*-Expressionssystem unlöslich war. Das Wildtyp Peptid CVV-Y⁵⁰³KRLIALSVRY⁵¹³GRIQE und die Alanin-substituierten Peptide CVV-A⁵⁰³KRLIALSVRY⁵¹³GRIQE (Y⁵⁰³A), CVV-Y⁵⁰³KRLIALSVRA⁵¹³GRIQE (Y⁵¹³A) und CVV-A⁵⁰³KRLIALSVRA⁵¹³GRIQE (Y⁵⁰³Y⁵¹³-AA) wurden über die SH-Gruppen der N-terminalen Cysteinreste kovalent an einen CM5-Chips im Biacore 3000-Biosensor gekoppelt (Abb. 25B). Zwischen dem N-terminalen Cysteinrest und dem Y⁵⁰³ Rest von CLN7 wurden zwei Valinreste als *Spacer* eingeführt. Für jedes einzelne, gekoppelte Peptid wurden hintereinander μ 1A, μ 2 und μ 3A (Konzentration 1 μ M) in das Flusssystem injiziert. Die Interaktion des CLN7-CT Y⁵⁰³Y⁵¹³-AA-Peptids und den μ -Untereinheiten dienten als Negativkontrollen und wurde von den Biosensorgrammen subtrahiert. In den SPR-Messungen wurde die stärkste Interaktion des CLN7-CT WT-Peptids mit μ 2 und eine wesentlich schwächere Interaktion mit μ 1A, nicht jedoch mit μ 3A detektiert (Abb. 25C). Die Alanin-Substitution Y⁵⁰³A verminderte die Interaktion der CLN7-CT-Peptide mit μ 2 um 83 % und mit μ 1A um 80 %. Die Alanin-Substitution Y⁵¹³A verminderte die Interaktion der CLN7-CT-Peptide mit μ 2 um 58 % und mit μ 1A um 52,5 %. Das steile Abfallen des Sensorgramms nach Stoppen der AP μ -Injektion in der Dissoziationsphase weist auf eine schwache Bindung und schnelle Dissoziation der μ -Analyten von den immobilisierten CLN7-CT Liganden hin (Abb. 25C).

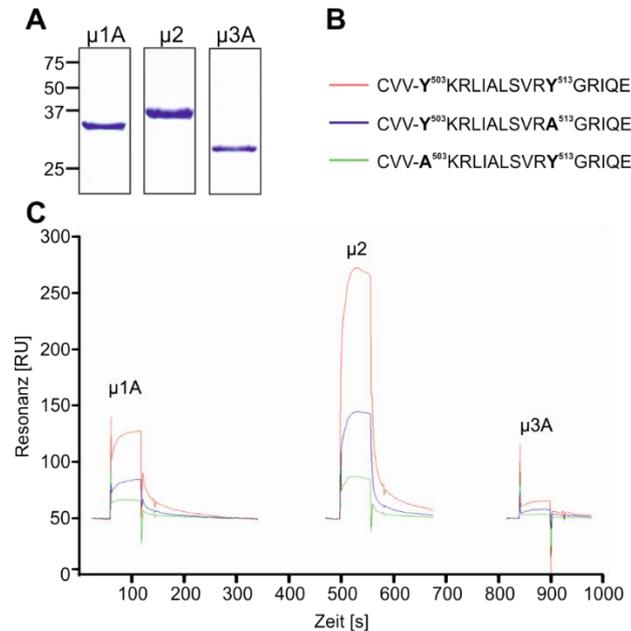


Abb. 25 SPR-Sensorgramm zeigt Interaktion des CLN7-CT mit $\mu 2$ und $\mu 1A$

(A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (Acrylamid-Konzentration 12,5 %) der gereinigten 6xHis- $\mu 1A$, 6xHis- $\mu 2$ und 6xHis- $\mu 3A$ Untereinheiten. Die Reinigung der μ -Untereinheiten erfolgte über den N-terminalen 6xHis-tag durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration. (B) AS-Sequenzen der WT und mutanten CLN7-CT Peptide. Tyrosinreste und durch Alanin substituierte Tyrosinreste im CLN7-CT-Peptid sind fett dargestellt. (C) SPR-basiertes Sensorgramm der Interaktion von auf einem CM5-Chip immobilisiertem CLN7-CT-Peptid mit aufgereinigtem und injiziertem $\mu 1A$, $\mu 2$ und $\mu 3A$ (Konzentration 1 μM) zeigt eine starke Interaktion des Wildtyp-Peptids (rot) mit $\mu 2$, eine schwache Interaktion mit $\mu 1A$ und keine Interaktion mit $\mu 3A$. Dabei hat die Mutation Y⁵⁰³A (blau) einen größeren reprimierenden Effekt auf die Bindung als Y⁵¹³A (grün). Die Sensorgramme des WT CLN7-CT sind in rot, die mutanten CLN7-CT Y⁵⁰³A und Y⁵¹³A Peptide in blau bzw. grün dargestellt. Das Sensorgramme der Doppelmutante Y⁵⁰³Y⁵¹³-AA wurde für diese Darstellung subtrahiert. Die Resonanz in *response units* [RU] ist angegeben.

4.2.3 Kinetische Analysen des lysosomalen Transports von CLN7 in AP-*kd* HEK293T-Zellen

Y2H/ Y3H-Analysen, GST-Kopräzipitations- und Biacore-Interaktions-Analysen zeigen, dass die CLN7-NT und -CT sowohl mit den AP1/AP2 Hemikomplexen als auch mit den AP1- $\mu 1A$ und AP2- $\mu 2$ Untereinheiten interagieren. Die Daten lassen vermuten, dass der intrazelluläre Transport von CLN7 in Clathrin-beschichteten Vesikeln sowohl direkt über AP1 als auch indirekt über AP2, durch Internalisierung an der Plasmamembran, erfolgt. Um die Bedeutung der CLN7-AP-Interaktionen *in vivo* zu analysieren, wurde die Kinetik des intrazellulären Transports von CLN7 zum Lysosom in AP-*kd* HEK293T-Zellen untersucht. HEK293T-Zellen wurden zweimal in 48 h-Intervallen mit einer *non-target* siRNA (als Negativkontrolle) oder siRNA gegen die AP1 γ -, AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ -Untereinheiten transfiziert. 24 Stunden vor Beginn der Analysen wurden die Zellen transient mit 3xFLAG-CLN7 oder 3xFLAG-CLN7 E⁹L¹³L¹⁴-AAA cDNAs transfiziert.

CLN7 mit mutiertem N-terminalen Di-Leucin-Motiv (3xFLAG-CLN7 E⁹L¹³L¹⁴-AAA) diente als Positivkontrolle für CLN7 mit erhöhter Konzentration an der Plasmamembran (Steenhuis *et al*, 2010). 96 h nach Beginn der siRNA-Transfektion wurden die Zellen in Methionin-freiem Medium inkubiert, für 1 h mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und für 5 h in *Chase*-Medium kultiviert. Nach FLAG-Immunpräzipitation wurden die Präzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. Da neu synthetisiertes CLN7 nach Erreichen des Lysosoms von Cts L zu einem 38 kDa großen Fragment gespalten wird (Steenhuis *et al*, 2012), diente das CLN7-Fragment als Indikator für die lysosomalen Lokalisation von CLN7. In 3xFLAG-CLN7 E⁹L¹³L¹⁴-AAA überexprimierenden HEK293T-Zellen wurde hauptsächlich die 55-70 kDa Form präzipitiert und der Anteil der prozessierten 38 kDa Form war gering, da die Kinetik des Transports zum Lysosom aufgrund der Missortierung an die Plasmamembran verlangsamt ist (Abb. 26A). Die densitometrische Quantifizierung der 38 kDa-Bande im Vergleich zur CLN7-Gesamtproteinmenge zeigte, dass in 3xFLAG-CLN7 E⁹L¹³L¹⁴-AAA transfizierten HEK293T-Zellen die Proteinmenge der 38 kDa-Bande um ca. 80 % reduziert war, in den AP-*kd* Zellen jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu 3xFLAG-CLN7 transfizierten und mit *non-target* siRNA behandelten Zellen detektierbar war (Abb. 26B). Die Herunterregulierung der APs wurde in einer Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen AP1 γ , AP2 α , AP3 δ und AP4 ϵ überprüft. Die AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ -Untereinheiten konnten fast vollständig herunterreguliert werden, während bei AP1 γ noch Restprotein detektierbar war (Abb. 26C).

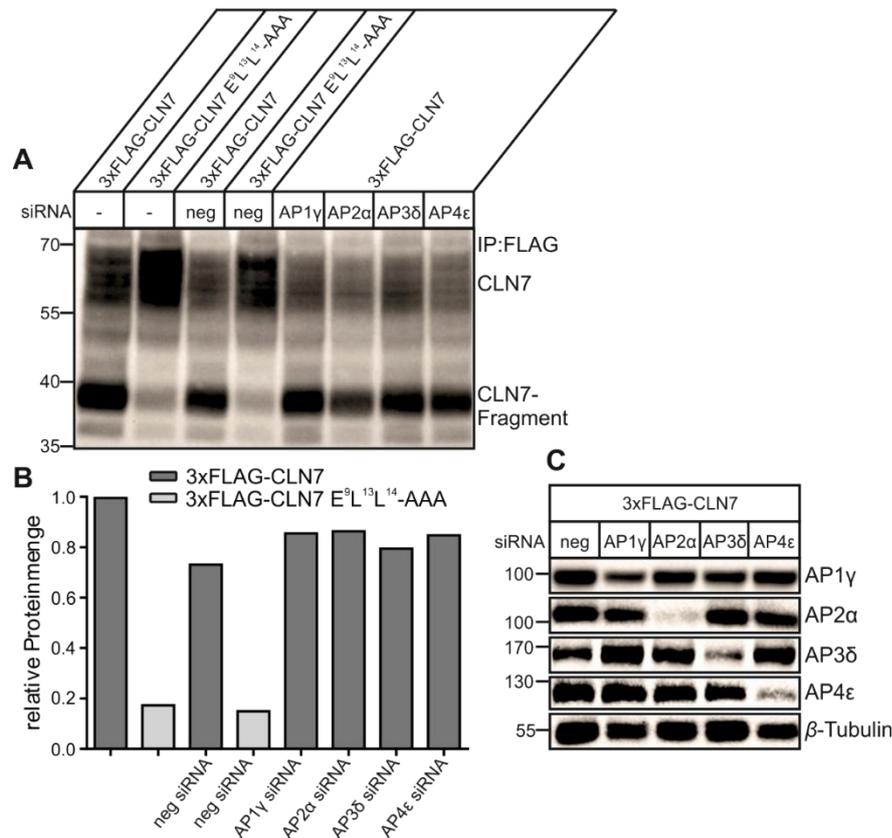


Abb. 26 Pulse-Chase-Analysen zeigen keine veränderte proteolytische Spaltung von [³⁵S]-markiertem 3xFLAG-CLN7 in AP1 γ -, AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ -kd HEK293T-Zellen

(A) HEK293T-Zellen wurden zwei Mal in einem 48 h-Intervall mit einer *non-target* siRNA (neg) oder siRNA gegen AP1 γ , AP2 α , AP3 δ und AP4 ϵ transfiziert. 72 h nach Beginn der ersten siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit 3xFLAG-CLN7 bzw. 3xFLAG-CLN7 E^{9L13L14}-AAA transfiziert. 24 nach der letzten Transfektion wurden die Zellen für 1 h in Methionin-freiem Hungermedium inkubiert und für 1 h mit *Pulse*-Medium, welches [³⁵S]-Methionin (100 μ Ci/ml) enthielt, metabolisch markiert. Nach Abnahme des *Pulse*-Mediums wurden die Zellen für 5 h in *Chase*-Medium inkubiert. Nach der Zelllyse und FLAG-Immunpräzipitation wurden die Präzipitate durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 12,5 %) aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. Die molaren Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben. (B) Densitometrische Quantifizierung der Proteinmenge der 38 kDa-Bande relativ zur CLN7-Gesamtproteinmenge. Die Proteinmenge der mit 3xFLAG-CLN7 transfizierten HEK293T-Zellen wurde gleich 1 gesetzt. (C) Gesamtproteininhomogenate der oben beschriebenen HEK293T-Zellen wurden durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 8 %) aufgetrennt. Die Effizienz des AP-kd wurde durch Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen AP1 γ , AP2 α , AP3 δ und AP4 ϵ untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Tubulin.

4.2.4 Herstellung von stabil exprimierenden (CLN7-HA-lum) HeLa-Zellen durch retrovirale Transduktion

Um die Oberflächenkonzentration von Membranproteinen zu bestimmen, können biochemische oder Fluoreszenz-basierte Methoden, wie Totalreflexionsfluoreszenz-Mikroskopie (TIRF)-Mikroskopie oder Durchflusszytometrie- (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*/ FACS)-Analysen durchgeführt werden. Aufgrund der im Vergleich zu Zelloberflächenbiotinylierung höheren Sensitivität wurden FACS-Analysen

durchgeführt, um die Konzentration von CLN7 an der Zelloberfläche zu bestimmen. Dafür wurde ein Antikörper benötigt, der eine der extrazellulär lokalisierten CLN7-Schleifen oder alternativ ein eingeführtes Epitop detektiert. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers wurde ein CLN7-cDNA Konstrukt kloniert, bei dem ein HA-Epitop *Tag* in die große luminal Schleife L9 hinter dem Asn-Rest in Position 395 (CLN7-HA lum) inseriert wurde (Abb. 27A). Expressionsexperimente zeigten, dass bei transienter Transfektion von HeLa-Zellen nur wenige Zellen (< 10 %) CLN7-HA lum exprimierten. Um stabile, CLN7-HA lum-exprimierende HeLa-Zellen herzustellen, wurde eine retrovirale Transduktion durchgeführt. Die CLN7-HA lum und CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA cDNAs wurden in den retroviralen Expressionsvektor pLXIN inkloniert und die Konstrukte zur Virusproduktion in Phoenix Zellen, einer HEK293T-basierten Verpackungszelllinie, transient transfiziert. CLN7 mit mutiertem Di-Leucin Sortierungssignal (CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA) diente als Positivkontrolle für erhöhte Zelloberflächenkonzentration des Proteins. HeLa-Zellen wurden mit den retroviralen Überständen transduziert, nach antibiotischer Selektion vereinzelt und zu Einzelklon-Zellpopulationen herangezüchtet. Zum Nachweis der Expression von CLN7-HA und CLN7-HA L¹³L¹⁴-AA in den Einzelklonen wurden HA-Western-Blot-Analysen mit Membranfraktionen durchgeführt. In stabilen, CLN7-HA lum transduzierten Zellen wurden eine 15 kDa und eine 18 kDa Bande detektiert. In CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA exprimierenden Zellen wurde im HA-Western-Blot eine immunreaktive Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 50-75 kDa detektiert (Abb. 27B). Um zu überprüfen, ob CLN7-HA lum in allen stabil transfizierten Zellen exprimiert wird und dass die Insertion des HA-Epitop *Tags* nicht zur Fehlfaltung und Retention von CLN7-HA lum im ER bzw. zur Misssortierung in nicht-lysosomale Kompartimente führt, wurden Kolokalisierungs-Analysen durchgeführt. In Immunfluoreszenz-Analysen kolokalisierte CLN7-HA lum mit dem lysosomalen Markerprotein Cts D, während CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA hauptsächlich an der Plasmamembran detektiert wurde (Abb. 27C). Die Experimente zeigen, dass die Insertion des HA-Epitop *Tags* nicht zur Fehlfaltung und Misssortierung von CLN7 führt und das HA-Epitop zur Detektion durch Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen mit den verfügbaren Antikörpern geeignet ist.

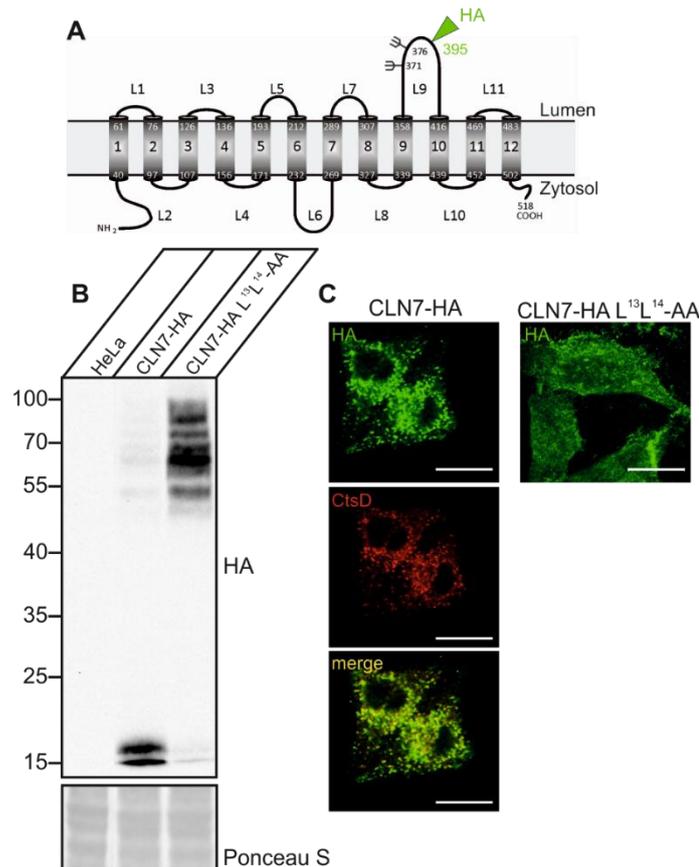


Abb. 27 Stabile Expression von CLN7-HA lum und CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA in HeLa-Zellen

(A) Schematische Darstellung des CLN7-HA lum Konstrukts. Das humane CLN7-HA lum-Protein besitzt 12 putative Transmembrandomänen, zwei benutzte *N*-Glykosylierungsstellen, 11 Schleifen (L1-11), einen zytosolischen N und C Terminus und einen luminalen HA-Tag, der hinter dem Asn-Rest in Position 395 in die luminalen Schleife L9 eingefügt wurde. (B) Stabile Expression von CLN7-HA lum und CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA in HeLa-Zellen: zur Produktion von retroviralen Partikeln wurde die Verpackungszelllinie Phoenix- mit pLXIN-CLN7-HA lum bzw. pLXIN-CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA-Expressionsvektoren transient transfiziert. HeLa-Zellen wurden nach 48 h Virusproduktion mit den viralen Überständen transduziert und 24 h später mit G418 selektioniert. G418-resistente HeLa-Zellklone wurden trypsinisiert und durch FACS- Zellsortierung zu Einzelzellklonen vereinzelte. Membranfraktionen der stabil exprimierenden Einzelklonpopulationen wurden per SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 10 %) aufgetrennt und durch HA-Western-Blotting analysiert. Ponceau S diente als Ladekontrolle. Die molaren Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben. (C) Lokalisation von CLN7-HA lum in Lysosomen. Stabile CLN7-HA lum bzw. CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA exprimierende HeLa-Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen HA (grün) und dem lysosomalen Markerprotein Cts D (rot) inkubiert. Nach Inkubation mit Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Präparate mit 63xfacher Vergrößerung durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die überlagerten Bilder (*merge*, gelb) zeigen die Kolokalisation von CLN7-HA lum mit Cts D und die Zelloberflächenlokalisation von CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA. Die Skalierungsbalken entsprechen 20 μm.

4.2.5 Erhöhte CLN7-Konzentration an der Plasmamembran in AP1γ und AP2α-*kd* HeLa-Zellen

Die stabil CLN7-HA lum bzw. CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA exprimierenden HeLa-Einzelklonpopulationen wurden für die quantitativen FACS-Analysen verwendet. CLN7-HA lum-exprimierenden Zellen wurden zweimal in 48 h Intervallen entweder mit *non-*

target siRNA (Negativkontrolle) oder siRNA gegen AP1 γ , AP2 α , AP3 δ oder AP4 ϵ transfiziert. Die Zelloberflächenkonzentration von CLN7 in AP-*kd* Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen diente als Maß für die Missortierung in Abwesenheit eines APs (Janvier & Bonifacino, 2005). Zur Detektion von CLN7-HA lum an der Plasmamembran wurden die Zellen zunächst mit einem HA-Antikörper bei 4 °C und anschließend mit einem gegen den HA-Antikörper gerichteten, Alexa Fluor 647-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert und die Fluoreszenz im APC-A-Kanal des FACS Canto II quantifiziert. In AP1 γ - bzw. AP2 α -*kd* Zellen war der relative Median der detektierten Fluoreszenz 1,2- bzw. 1,6-fach im Vergleich zu *non-target*-siRNA *kd*-Zellen erhöht. In CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA-exprimierenden Zellen war der relative Median der Fluoreszenz 7,5-fach erhöht im Vergleich zu HA-CLN7 exprimierenden, *non-target*-siRNA *kd*-Zellen. In CLN7-HA lum-exprimierenden, AP3 δ - bzw. AP4 ϵ -*kd* HeLa Zellen wurde keine erhöhte Konzentration von CLN7-HA an der Zelloberfläche im Vergleich zu *non-target*-siRNA knockdown-Zellen gemessen (Abb. 28A und B). Um die Effektivität des AP-*kd* nach zweifacher siRNA-Transfektion zu kontrollieren, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die AP1 γ -, AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ -Untereinheiten effektiv und spezifisch herunterreguliert wurden. Die Herunterregulierung einer AP-Untereinheit führte nicht zur unspezifischen Herunterregulierung bzw. kompensatorischen Hochregulation der anderen AP-Untereinheiten. Gleichzeitig waren die β -Tubulin-Mengen in AP-*kd* Zellen im Vergleich zu *non-target*-siRNA *kd* Zellen unverändert (Abb. 28C).

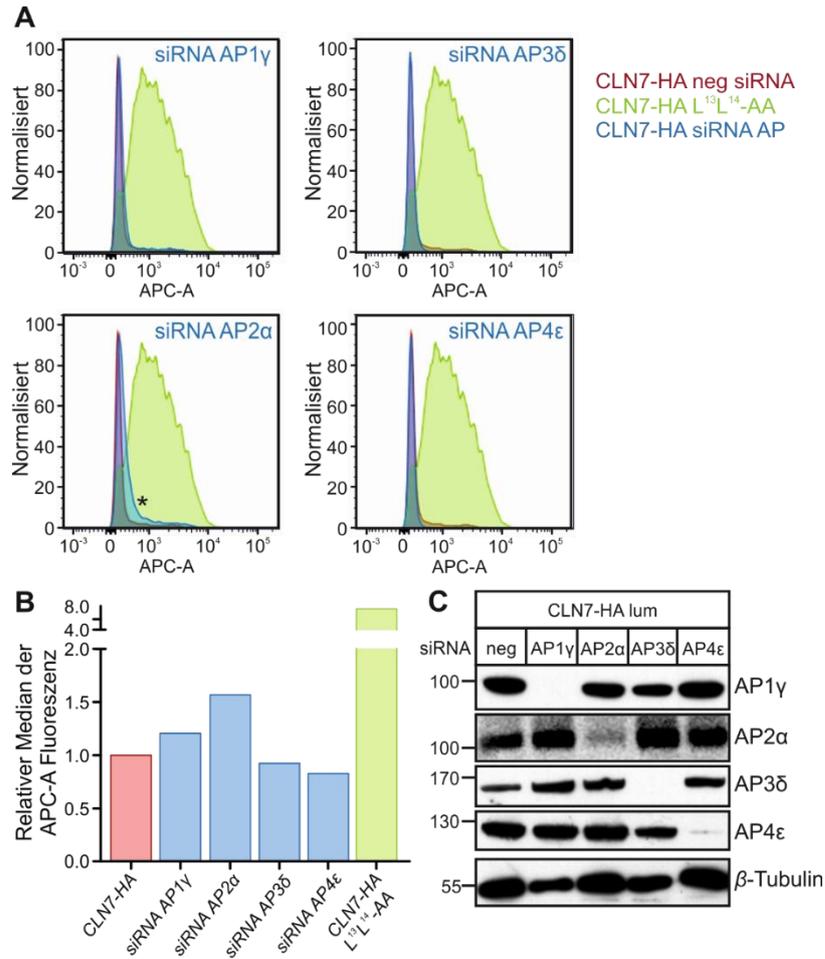


Abb. 28 Erhöhte Zelloberflächenkonzentration von CLN7 in AP1 γ - und AP2 α -kd HeLa-Zellen.

(A) CLN7-HA lum-exprimierende Zellen wurden zweimal in einem 48 Std. Intervall mit *non-target* siRNA (als Negativkontrolle, rot) bzw. siRNA gegen AP1 γ , AP2 α , AP3 δ oder AP4 ϵ (blau) transfiziert. 96 h nach Beginn der ersten siRNA-Transfektion wurden die Zellen bei 4°C mit HA-Antikörpern und Alexa Fluor 647-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt und die Fluoreszenz im APC-A Kanal des FACS Canto II quantifiziert. CLN7-HA lum L¹³L¹⁴-AA-exprimierende Zellen (grün) dienen als Positivkontrolle für erhöhte Zelloberflächenkonzentration von CLN7. In AP1 γ - und AP2 α -kd Zellen wurde eine 1,2- bzw. 1,6-fach höhere CLN7-Zelloberflächenkonzentration im Vergleich zu *non-target*-siRNA *kd* Zellen gemessen, während in AP3 δ - und AP4 ϵ -kd Zellen keine Unterschiede detektiert wurden (*). (B) Quantifizierung der relativen Konzentration von CLN7-HA lum an der Zelloberfläche. Der relative Median der Fluoreszenz von CLN7-HA-exprimierenden, *non-target* siRNA *kd* Zellen wurde auf 1 gesetzt (roter Balken). Der Median der Fluoreszenz in AP-*kd* (blauer Balken) und in CLN7-HA L¹³L¹⁴-AA exprimierenden HeLa-Zellen (grüner Balken) sind angegeben. (C) HeLa-Zelllysate wurden durch SDS-PAGE (Acrylamid-Konzentration: 8 %) aufgetrennt. Die Effektivität der Herunterregulierung der APs wurde in der Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen AP1 γ , AP2 α , AP3 δ und AP4 ϵ analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Tubulin.

5. Diskussion

Die CLN7-Erkrankung ist eine autosomal-rezessiv vererbte, neurodegenerative lysosomale Speichererkrankung des Kindesalters, die durch Mutationen im *MFSD8/CLN7* Gen verursacht wird. Das *MFSD8/CLN7* Gen kodiert für ein polytopes lysosomales Membranglykoprotein mit putativer Transporterfunktion. Klinisch manifestiert sich die CLN7-Erkrankung im Alter von zwei bis sechs Jahren durch Epilepsien und Entwicklungsverzögerung. Im Laufe der Erkrankung treten weitere Symptome, wie psychische und motorische Retardierung, Sehverlust, Myoklonien und Ataxien auf. Die Erkrankung ist bisher unheilbar und CLN7 Patienten versterben frühzeitig im Alter von 6,5-18 Jahren (Kousi *et al*, 2009). Die Mehrzahl der CLN7 Patienten präsentiert sich mit einem spät-infantilen Phänotyp; kürzlich wurden jedoch auch CLN7 Patienten mit juvenilen und asymptomatischen Krankheitsverläufen beschrieben (Kousi *et al*, 2009; Roosing *et al*, 2015). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der begrenzten Verfügbarkeit von humanem Gehirngewebe sind der Beginn und die Progression der neurodegenerativen Veränderungen im Gehirn und in der Retina, die betroffenen Gehirnregionen sowie die beteiligten Pathomechanismen weitgehend unbekannt. Bei CLN7 Patienten wurden die wichtigsten neuropathologischen Veränderungen durch MRT-Untersuchungen oder immunhistochemische Analysen an Gehirnen im Endstadium der Erkrankung *post mortem* dokumentiert (Anderson *et al*, 2013; Mole *et al*, 2011). Um die morphologischen, neurodegenerativen und biochemischen Veränderungen der CLN7-Erkrankung besser zu verstehen, sollte durch Ausschalten des homologen *Mfsd8/Cln7*-Gens der Maus ein Tiermodell generiert werden. Außerdem wurde ein polyklonaler anti-Cln7 Antikörper generiert, der das endogene Cln7 Protein in Western-Blot-Analysen detektiert und Studien zur gewebespezifischen Expression von Cln7 erlaubte.

5.1 Generierung und phänotypische Analyse eines *Cln7-lacZ* Gene-trap Mausmodells

Zur Generierung von Cln7-Mausmodellen wurden kommerziell erhältliche ES-Zellen vom EUCOMM-Konsortium verwendet, bei denen durch *FRT*-Sequenzen flankierte

lacZ- und Neomycin-Expressions-kassetten zwischen Exon 1 und 2 des murinen *Mfsd8/Cln7*-Gens inseriert wurden. In den *Cln7-lacZ Gene-trap* (*Cln7*^(tm1a/tm1a))-Mäusen wird die Sequenz von Exon 1 mit der *lacZ*-Sequenz gespleißt, sodass in der resultierenden *mRNA* die Sequenzen der Exone 2-12 fehlten. Homozygote *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäuse waren überlebensfähig, fertil und zeigten keine erhöhte Mortalität im Vergleich zu Kontrolltieren. In diesen Mäusen wurde keine neurologische Symptomatik, wie ein *Clasping*-Phänotyp, motorische Defizite, Epilepsien oder Ataxien bis zu einem Alter von 24 Monaten beobachtet. Neurone mit stärkster Autofluoreszenz waren cerebelläre Purkinjezellen, pyramidale Neuronen in der CA3-Region des Hippocampus und Neurone im Thalamus von *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen (Damme *et al.*, 2014). Die Ultrastruktur des elektronendichten Speichermaterials in hippocampalen und cerebellären Neuronen der *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäuse enthielt lamelläre Profile. Immunhistochemische Untersuchungen an *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen zeigten Scmas-Speicherung hauptsächlich in Purkinje- und Körnerzellen des Cerebellums. Parallel wurde eine progrediente Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen im Gehirn und Rückenmark gefunden. Die Photorezeptorenschicht in der Retina von 8,5 Monate alten *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen war degeneriert und retinale Astrozyten waren aktiviert. Im Gehirn der *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäuse wurde weder eine offensichtliche Gehirnatrophie, noch ein Verlust von Neuronen im cerebellären Cortex gefunden (Damme *et al.*, 2014).

5.1.1 Analyse der Expression und subzellulären Lokalisation von *Cln7*

Aufgrund der niedrigen Abundanz von *Cln7* und des Fehlens spezifischer CLN7-Antikörper existieren bisher nur Daten zur *Cln7 mRNA* Expression beim Menschen und bei der Ratte, die durch Northern-Blot-Analysen, quantitative *Realtime* PCR- und *in situ* Hybridisierung gewonnen wurden (Sharifi *et al.*, 2010; Siintola *et al.*, 2007). Da bei *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen die Expression der *lacZ*-Kassette unter der Kontrolle des endogenen *Mfsd8/Cln7*-Promotors steht, war es möglich, die gewebespezifische *Cln7*-Expression indirekt an Gehirnschnitten adulter, heterozygoter *Cln7*^(+/tm1a) Mäuse über enzymatische Aktivitätsmessungen der β -Galaktosidase zu bestimmen. Die stärkste Expression von *Cln7* im Mausgehirn wurde in Neuronen-reichen Regionen des Hippocampus und des gesamten zerebralen Cortex detektiert. Im Caudate putamen, Thalamus und Cerebellum war die Expression geringer, wobei Purkinje Zellen stärker

exprimierten als Neuronen der Körnerzellschicht (Damme *et al.*, 2014). Western-Blot-Analysen von Wildtyp Mäusen zeigten eine ubiquitäre Cln7-Expression im Gehirn und peripheren Organen. Eine besonders starke Expression von Cln7 wurde im Cortex und Cerebellum festgestellt (Abb. 7). Beim Vergleich der Cln7-Expression durch β -Galaktosidase Aktivitätsbestimmung und durch Western-Blot-Untersuchungen wurden Unterschiede festgestellt. So wurde in Gewebeschnitten von Herz und Leber keine β -Galaktosidase Aktivität detektiert (Damme *et al.*, 2014), während Western-Blot-Analysen zeigten, dass Cln7 in allen untersuchten Organen exprimiert war (Abb. 7). Die starke Scmas Speicherung im Herz der *Cln7*^(-/-) Mäuse würde die Expressionsdaten aus den Western-Blot-Analysen bekräftigen (Abb. 11). Im Cerebellum war die β -Galaktosidase Aktivität geringer als im Cortex und Hippocampus (Damme *et al.*, 2014), während im Western-Blot gleiche Cln7 Proteinmengen in Cortex und Cerebellum gefunden wurden (Abb. 7). Im Unterschied zur indirekten β -Galaktosidase Aktivitätsbestimmung stellt die Cln7 Western-Blot Analyse jedoch eine direkte Nachweismethode dar. Außerdem wird die Cln7 Proteinmenge nicht nur durch die Biosynthese, sondern auch durch unterschiedliche Halbwertszeiten von Cln7, z.B. aufgrund unterschiedlicher Raten von Proteolyse durch Cysteinproteasen, bestimmt (Steenhuis *et al.*, 2010). Die neu generierten Ergebnisse zur Cln7 Proteinexpression stimmen mit Northern-Blot-Analysen von humanem Gewebe, die eine ubiquitäre CLN7-Expression im Gehirn und in peripheren Organen zeigen, überein (Siintola *et al.*, 2007). Regionale Unterschiede der Cln7-Expression im Mausgehirn mit höherer Cln7 Expression in Hippocampus und Cortex wurden durch quantitative *Realtime* PCR Analysen im Rattengehirn bestätigt (Sharifi *et al.*, 2010). Die starke β -Galaktosidase Expression in neuronalen Schichten (Gyrus dentatus, CA1/CA3-Region, Purkinjezellen, Körnerzellschicht) des *Cln7*^(+/tm1a) Gehirns weist auf eine hohe Cln7-Expression in Neuronen hin (Damme *et al.*, 2014). In Übereinstimmung damit wurde in kultivierten Gehirnzellen der Ratte durch quantitative *Realtime* PCR Analysen gezeigt, dass die *Cln7 mRNA* in Neuronen stärker als in Astrozyten und Mikroglia exprimiert wird (Sharifi *et al.*, 2010). Autofluoreszenz und lysosomalen Speicherung von Scmas in Neuronen des Hippocampus (CA3-Region), des cerebellären Cortex (Purkinje- und Körnerzellschicht) und des zerebralen Cortex lassen vermuten, dass Cln7 hauptsächlich in Neuronen eine wichtige Funktion besitzt.

Subzelluläre Fraktionierungen und Analyse von Tritosomen aus Lebergewebe von Wildtyp Mäusen zeigten, dass endogenes Cln7 in lysosomalen Membranen lokalisiert ist (Damme *et al.*, 2014). Diese Ergebnisse bestätigten die Lokalisation von CLN7 in aufgereinigten Lysosomen, die aus humaner Plazenta und Rattenleber gewonnen, und massenspektrometrisch analysiert wurden (Bagshaw *et al.*, 2005; Schröder *et al.*, 2007) und die Kolokalisierung von CLN7 mit lysosomalen Markerproteinen in kultivierten hippocampalen Neuronen (Sharifi *et al.*, 2010). Der generierte polyklonale anti-Cln7 Antikörper war aufgrund von unspezifischer Kreuzreaktivität mit einem Kernprotein nicht zur Bestimmung der Expression und subzellulären Lokalisation von endogenem Cln7 durch Immunhistochemie geeignet. Der generierte Antikörper detektiert jedoch spezifisch endogenes Cln7 in der Western-Blot-Analyse, was durch Abwesenheit immunreaktiver Cln7-Proteine in lysosomalen Fraktionen von *Cln7*^(tmla/tmla) und *Cln7*^(-/-) Mäusen, sowie die Detektion immunreaktiver Cln7-Proteine in Wildtyp Fraktionen mit erhöhter elektrophoretischer Mobilität nach enzymatischer Deglykosylierung zeigten (Abb. 6 und 7; Damme *et al.*, 2014).

5.2 Generierung und phänotypische Analyse eines Cln7-knockout Mausmodells

Durch Kreuzung der *Cln7*^(tmla/tmla) Mäuse mit *Flp*- und *Cre*-Deleter Mäusen wurden *knockout*-Mäuse (*Cln7*^(-/-)) mit einer Deletion des Exon 2 im *Mfsd8/Cln7* Gen generiert. Die Deletion von Exon 2 in der *Cln7 mRNA* wurde durch quantitative *Realtime* PCR Analysen verifiziert (Abb. 6). Sequenzierungs-Analysen von cDNA aus Gehirn, Leber und Niere zeigten, dass die Deletion von Exon 2 auf *mRNA*-Ebene zur Deletion c.Cln7 del67_115 führt, die in der abgeleiteten Proteinsequenz in der *frameshift*-Mutation p. Cln7 E23F fsX16 resultiert (Abb. 5). In dem trunkierten Cln7 Protein, das aus den 22 N-terminalen AS des Wildtyp-Proteins und 15 neuen AS zusammengesetzt ist, fehlen alle 12 putativen Transmembrandomänen und das in HEK293T-Zellen überexprimierte mutante Cln7-Protein wurde weder in Gesamt-Proteinhomogenaten noch in Membranfraktionen detektiert (nicht gezeigt). In Übereinstimmung damit bestätigten Expressions-Analysen von Geweben der *Cln7*^(-/-) Maus den ubiquitären Verlust von endogenem Cln7 im Gehirn, in der Retina und in verschiedenen peripheren Organen. Die Ergebnisse zeigen, dass das verkürzte p. Cln7 E23F fsX16 Protein wahrscheinlich

instabil ist und bei der Translation nicht in Membranen inseriert wird und folglich auch das Lysosom nicht erreicht. Die generierten *Cln7*^(-/-) Mäuse sind genetisch CLN7 Patienten mit der *nonsense*-Mutation p.CLN7 R35X ähnlich (Kousi *et al*, 2009). Die Mutation p.CLN7 R35X stellt eine schwere Mutation mit wahrscheinlich komplettem Funktionsverlust von CLN7 dar, weil ebenfalls sämtliche 12 Transmembrandomänen des mutanten CLN7 fehlen und CLN7 Patienten mit dieser Mutation einen schweren Krankheitsverlauf vom variant spät-infantilen Phänotyp zeigen.

5.2.1 Lysosomale Dysfunktion im *Cln7*^(-/-) Mausmodell

Im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen wurde das für NCLs charakteristische autofluoreszierende Speichermaterial im Hippocampus (CA3-Region), Cortex, Cerebellum (Purkinje- und Körnerzellschicht), Thalamus und Riechkolben detektiert (Abb. 9). Im Hippocampus (Gyrus dentatus, CA3-Region) und Cerebellum (Purkinjenzellen) wurde die Speicherung von Lipofuszin durch Färbungen mit Luxolblau verifiziert. Analysen der Ultrastruktur des Speichermaterials in Purkinjenzellen von *Cln7*^(-/-) Mäusen zeigten, dass hauptsächlich kurvilineare Einlagerungen und vereinzelt *fingerprint*-Strukturen detektierbar waren (Abb. 10). In Übereinstimmung mit dem neuropathologischen Phänotyp der *Cln7*^(-/-) Mäuse zeigen CLN7 Patienten im Endstadium der Erkrankung die stärkste Autofluoreszenz im Cerebellum (Purkinjenzellen), Cortex, Thalamus und Hippocampus (CA3-Region; Anderson *et al*, 2013; Mole *et al*, 2011). Die Ultrastruktur des Speichermaterials in Purkinjenzellen der *Cln7*^(-/-) Mäuse ist morphologisch dem Speichermaterial im zerebralen Cortex von CLN7 Patienten ähnlich, wo rektilineare Einschlüsse und *fingerprint*-Profile detektiert wurden (Anderson *et al*, 2013; Mole *et al*, 2011). In einer kürzlich publizierte Fallstudie eines chinesischen Schopfhundes mit der *frameshift*-Mutation p.Cln7 F282fs*13 und typischen vLINCL-Symptomen war das Speichermaterial in Purkinjenzellen ultrastrukturell aus *fingerprint*-Profilen zusammengesetzt (Guo *et al*, 2014). Die Akkumulation von Scmas im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen wurde im Hippocampus (CA3-Region), Cortex, Cerebellum (Purkinjenzellen) und Thalamus detektiert und war etwas geringer ausgeprägt als in der bereits gut charakterisierten *Cln6*^{(-/-)/*ncl*f}-Maus (Thelen *et al*, 2012), jedoch war Scmas in den gleichen Gehirnregionen lokalisiert. Zudem entspricht die Lokalisation von Scmas den Gehirnregionen der *Cln7*^(-/-) Maus, in denen bereits die Autofluoreszenz

detektiert wurde (Abb. 9Abb. 11). In peripheren Organen kommt es bei *Cln7*^(-/-) Mäusen zur Scmas-Speicherung in Herzmuskelzellen und etwas schwächer in Nierentubuli und Leber (Abb. 11). In Gewebe von CLN7 Patienten wurde Scmas-Speicherung ebenfalls im Herzmuskel, Niere und Leber gefunden (Mole *et al*, 2011), was zeigt, dass das *Cln7*^(-/-) Mausmodell die pathologischen Eigenschaften der humanen CLN7-Erkrankung gut rekapituliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig biochemisch gezeigt, dass der proteinogene Anteil des lysosomalen Speichermaterials im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse sowohl Scmas als auch Saposin D enthält. Da deutlich mehr Saposin D (6-fach erhöht) als Prosaposin (2-fach erhöht) in den *Cln7*^(-/-) Mäusen detektiert wurde (Abb. 12), ist es wahrscheinlich, dass die Saposin D-Speicherung auf verminderten Abbau und nicht auf erhöhte Biosynthese des Prosaposin-Vorstufenproteins zurückzuführen ist. Saposin A und D wurden als Hauptproteinkomponenten des Speichermaterials im Gehirn von CLN1, CLN4 und CLN10 Patienten und eines *Cln1*-Hundemodells beschrieben, das ultrastrukturell hauptsächlich GRODs aufweist (Nijssen *et al*, 2003; Palmer, 2015; Tyynelä *et al*, 1993). Das Speichermaterial im Gehirn von CLN7 Patienten und *Cln7*^(-/-) Mäusen besitzt jedoch keine GRODs, sondern hauptsächlich kurvilineare Einlagerungen mit *fingerprint*-Profilen (Anderson *et al*, 2013). Die Ultrastruktur des Speichermaterials im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse ist damit den infantilen (CLN2) und spät-infantilen NCL-Formen (CLN5, CLN6, CLN8), bei denen kurvilineare und rektilineare Einlagerungen dominieren, ähnlich (Cotman & Staropoli, 2012). Der biochemische Nachweis der Saposin D-Speicherung im Gehirn von *Cln7*^(-/-) und *Cln11*^(-/-) Mäusen sowie von CLN2 und CLN3 Patienten (Götzl *et al*, 2014) zeigt, dass die Ultrastruktur des Speichermaterials keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Speichermaterials und die gespeicherten Proteinkomponenten erlaubt.

Die erhöhte Expression von Cathepsinen, die bereits bei neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer), aber auch in vielen LSDs wie der Niemann-Pick-Krankheit, Morbus Gaucher, CLN1 und CLN11 beschrieben wurde, ist ein weiterer Hinweis auf lysosomale Dysfunktion im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse (Amritraj *et al*, 2009; Cataldo *et al*, 1995; Chandra *et al*, 2015; Götzl *et al*, 2014; Vitner *et al*, 2010). In Gehirnen von *Cln7*^(-/-) Mäusen war die Protein- und *mRNA*-Expression von Cts D, Cts B und Cts Z signifikant erhöht (Abb. 15), was die transkriptionelle Hochregulation der

Cathepsin-Expression zeigt. Immunohistochemische Kollokalisierungs-Analysen zeigten, dass Cts Z hauptsächlich in Mikrogliazellen und Neuronen, nicht jedoch in Astrozyten vermehrt exprimiert wird (Abb. 16). Aufgrund der erhöhten Cts Z-Expression in Neuronen kann ausgeschlossen werden, dass erhöhte Cts Z-Mengen in Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse auf die erhöhte Anzahl von Mikrogliazellen zurückzuführen sind. Weiterhin wurden erhöhte Cts-Mengen deutlich früher (12 Wochen) detektiert als die Aktivierung der Mikrogliazellen (28 Wochen; Abb. 13). Die physiologische Bedeutung der Hochregulation lysosomaler Cathepsine ist unklar. Erhöhte Cathepsin-Konzentrationen könnten die lysosomale Membran destabilisieren, was zu erhöhter Membranpermeabilität, Apoptose und neuronaler Degeneration führt (Boya & Kroemer, 2008; Repnik *et al*, 2012).

5.2.2 Akkumulation von Eisen im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse

Dysregulierte Konzentrationen von Zink, Eisen und Kupfer in NCL-Mausmodellen, veränderte *Cln7 mRNA*-Konzentrationen in Mäusen mit diätetischer Eisenbelastung oder in Mausmodellen mit genetisch bedingter Eisenspeicherung sowie die Akkumulation von Metallionen im Lipofuszin-Speichermaterial waren die Gründe, um eine direkte oder indirekte Bedeutung von CLN7 für die Eisenhomöostase im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse zu überprüfen (Grubman *et al*, 2014; Höhn *et al*, 2010; Johnstone *et al*, 2012; Johnstone & Milward, 2010). Um zu analysieren, ob *Cln7* direkt oder indirekt am Eisentransport im Gehirn beteiligt ist, wurden quantitative *Realtime* PCR Analysen von Genen, deren Transkription durch Fe²⁺ reguliert wird, durchgeführt. In Gehirnen von 36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen war die Expression von *Tfr* und *Dmt1* signifikant erniedrigt und von *Ftl1* im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht (Abb. 17 B). Der TfR ist an der Zelloberfläche lokalisiert und internalisiert via Rezeptor-vermittelter Endozytose Transferrin-gebundenes Eisen (Aisen, 2004). Der endosomale DMT1-Transporter gehört zur Gruppe der intrazellulären MFS-Transporter und transportiert Fe²⁺ aus dem endosomalen Lumen ins Zytosol (Skjorringe *et al*, 2015). Ferritin ist der intrazelluläre Eisenspeicher, welcher als Puffer für schwankende intrazelluläre Eisenkonzentrationen fungiert (Shi *et al*, 2008). Die verringerte Expression von *Tfr* und *Dmt1*, sowie die starke Hochregulation von *Ftl1* in *Cln7*^(-/-) Gehirnen, lassen darauf schließen, dass die Eisenkonzentration in *Cln7*^(-/-) Gehirnzellen erhöht ist (Shi *et al*, 2008). Es ist allerdings

unklar, weshalb die Proteinmengen von Tfr und Ftl1 in *Cln7*^(-/-) Gehirnen unverändert waren (Abb. 17C).

Im Hippocampus, Cortex und Thalamus von *Cln7*^(-/-) Mäusen wurden durch *Perls Prussian-Blue*-Färbung (Reaktion für die Detektion von Fe³⁺) jedoch eine erhöhte Eisenkonzentration detektiert (Abb. 17 A). Es gibt die Gruppe der Neurodegeneration mit Eisenakkumulation (NBIA)-Erkrankungen, die entweder durch Defekte in Genen ausgelöst werden, die für Proteine des Eisenstoffwechsels kodieren (z.B. *FTL*) oder für Proteine, die an anderen zellulären Funktionen, wie z.B. der lysosomalen Aktivität, beteiligt sind (z.B. *ATP13A2*; Levi & Finazzi, 2014). Durch MRT-Untersuchungen wurde in diesen Patienten Eisenakkumulation in verschiedenen Gehirnregionen wie dem Globus pallidus und der Substantia nigra detektiert. Da bei MRT-Untersuchungen des Gehirns von 35 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen keine Akkumulation von Eisen detektiert wurde (nicht gezeigt) und histochemische Analysen keine erhöhten Eisenmengen im Globus pallidus und der Substantia nigra von *Cln7*^(-/-) Mäusen zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass die CLN7-Erkrankung zur Gruppe der NBIA-Erkrankungen zählt und CLN7 eine direkte oder indirekte Funktion im Eisenstoffwechsel hat. Die Speicherung von Eisen in Gehirnregionen der *Cln7*^(-/-) Mäuse mit Autofluoreszenz und Scmas-Speicherung (Hippocampus, Cortex und Thalamus) lässt vermuten, dass das in Lipofuszin enthaltene Eisen zu der Erhöhung der Eisenkonzentration in *Cln7*^(-/-) Gehirnen führt (Höhn *et al*, 2010). Es wurde gezeigt, dass artifiziell hergestelltes Lipofuszin mit inkorporiertem Eisen in Zellen Caspase-3 hochreguliert, was wiederum zur Apoptose führt und es zudem zur Freisetzung von freien Radikalen kommt, was einen möglicher Mechanismus darstellt, der zur Neurodegeneration führt (Höhn & Grune, 2013). Um die Hypothese zu überprüfen, dass Lipofuszin-Speicherung sekundär zur Akkumulation von Fe²⁺ im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse führt, müssten altersabhängige Untersuchungen durchgeführt werden, um eine mögliche Korrelation zwischen Lipofuszin-Speicherung und Eisenakkumulation zu überprüfen. Um die Spezifität der Fe²⁺ Akkumulation für das *Cln7* Mausmodell zu analysieren, müssten parallel andere vLINCL-Mausmodelle, wie die *Cln6/nclf* oder die *Cln8/mnd* Maus getestet werden.

5.2.3 Neurodegeneration im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen

In MRT-Untersuchungen von 35-36 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen, wurde Neurodegeneration im Bereich des Riechkolbens, Cortex und Cerebellums festgestellt (Abb. 20). Der Phänotyp der Mäuse stimmt mit CLN7 Patienten überein, bei denen Gehirnatrophie hauptsächlich im Cerebellum und zerebralen Cortex detektiert wurde (Mole *et al*, 2011). Immunhistochemische Analysen zeigten jedoch, dass die cerebelläre Neurodegeneration in *Cln7*^(-/-) Mäusen nicht auf Schädigung und Verlust von Neuronen der Purkinje- und Körnerzellschichten oder auf Demyelinisierung zurückzuführen ist (Abb. 20). Der Phänotyp der *Cln7*^(-/-) Mäuse unterscheidet sich daher von den CLN7 Patienten, wo die cerebellären Körnerzellen altersunabhängig komplett absterben und die Purkinjezellen und kortikalen Neuronen altersabhängig reduziert sind (Sharifi *et al*, 2010). Ferner ist die Neurodegeneration bei *Cln7*^(-/-) Mäusen schwächer ausgeprägt als bei CLN7 Patienten und wird nur im Endstadium der Erkrankung detektiert. Die *lacZ*-Reporter-gen-abhängigen *Cln7*-Expressions-Analysen im *Cln7*^(tmla/tmla) Mausmodell zeigten eine starke *Cln7*-Expression in den bei CLN7 Patienten neurodegenerativ betroffenen Arealen (Damme *et al*, 2014). In Purkinje- und Körnerzellen, sowie in kortikalen Neuronen kommt es im *Cln7*^(-/-) Mausmodell zur starken Speicherung von Scmas. Es ist wahrscheinlich, dass die beobachtete neurologische Symptomatik der *Cln7*^(-/-) Mäusen, wie fortschreitende Lähmung der Hinterbeine, *Clasping* (Abb. 8), Tremor, Hypotonie und Myoklonien im Endstadium der Erkrankung auf Neurodegeneration zurückzuführen ist.

5.2.4 Neuroinflammation im *Cln7*^(-/-) Mausmodell

Ein gemeinsames Merkmal der NCLs ist eine progressive, Regionen-spezifische Neuroinflammation in frühen Stadien der Erkrankung (Cooper *et al*, 2006). Es wird vermutet, dass die Aktivierung von Astrozyten bei NCLs eine neuroprotektive Funktion besitzt und bei Tiermodellen in Gehirnregionen mit späterer Neurodegeneration am ausgeprägtesten ist (Cooper *et al*, 2015). Der frühere Beginn der Neurodegeneration in Gehirnen von *Gfap/Vimentin/Cln1*-defizienten, bei denen Intermediärfilamente der Astrozyten fehlen, im Vergleich zu *Cln1*^(-/-) defizienten Mäusen zeigte, dass die Aktivierung von Astrozyten eine neuroprotektive Funktion bei der CLN1-Erkrankung besitzt (Macauley *et al*, 2011). Im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen wurde eine generalisierte

Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia in allen untersuchten Regionen gezeigt. Der zeitliche Beginn der Astrozytose mit 20 Wochen ist vergleichbar mit anderen vLINCL-Mausmodellen, wie den *Cln6*^(-/-)/*nclf* und *Cln8*^(-/-)/*mnd* Mäusen (Kuronen *et al*, 2012; Thelen *et al*, 2012). Die Mikroglia-Aktivierung setzte in *Cln7*^(-/-) Mäusen mit 28 Wochen später ein und war weniger ausgeprägt als die Astrozytose. Die Neuroinflammation war progressiv fortschreitend und im Endstadium der Erkrankung bei *Cln7*^(-/-) Mäusen am stärksten ausgeprägt (Abb. 13). Im Gehirn der CLN7 Patienten wurde Astrozytose im Cerebellum und eine generalisierte Mikroglia-Aktivierung im zerebralen Cortex (Schichten I-VI, außer V) und den CA2- und CA3-Regionen des Hippocampus beschrieben (Sharifi *et al*, 2010). Da bei CLN7 Patienten nur Daten aus *post mortem* Analysen existieren, fehlen Informationen zu Beginn und Progression der Neuroinflammation im Gehirn. Astrozyten besitzen eine wichtige Funktion für die Homöostase des zentralen Nervensystems, indem sie Nährstoffe für Neuronen bereitstellen, am Recycling von synaptischen Neurotransmittern beteiligt sind und den extrazellulären Kaliumhaushalt aufrechterhalten (Di Malta *et al*, 2012). Mikroglia werden durch pathologische Veränderungen in Neuronen aktiviert und sezernieren neuroprotektive Faktoren wie den Nervenwachstumsfaktor NGF, Neurotrophin-4/5, den Transformierenden Wachstumsfaktor TGF- β , den *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF), den Fibroblasten Wachstumsfaktor FGF und Interleukin 3 (Nakajima *et al*, 2007). Allerdings werden auch proinflammatorische und neurotoxische Substanzen, wie der Tumornekrosefaktor TNF- α , Interleukin-6 und Stickstoffmonoxid sezerniert (Hanisch & Kettenmann, 2007). Es ist unklar, ob die Neurodegeneration in *Cln7*^(-/-) Mäusen und CLN7 Patienten auf zellautonome Defekte in Neuronen zurückzuführen ist, oder ob CLN7 auch in Astrozyten und Mikroglia eine wichtige Funktion besitzt und deshalb die neuroprotektive Wirkung der Gliazellen in *Cln7*^(-/-) Mäusen gestört ist. Um die Bedeutung von *Cln7* für die Funktion von Astrozyten zu untersuchen, müssten *knockout*-Mäusen mit konditionaler Ausschaltung des *Mfsd8/Cln7*-Gens in Astrozyten generiert werden. Bei einem Mausmodell für die LSD multiple Sulfatasedefizienz, bei dem der Sulfatase modifizierende Faktor 1 (SUMF1) Astrozyten-spezifisch ausgeschaltet wurde, führte die lysosomale Speicherung und Dysfunktion von Astrozyten zur Neurodegeneration kortikaler Neurone (Di Malta *et al*, 2012). Im Gegensatz dazu wurde in einem Mausmodell für die NPC1-Erkrankung mit Astrozyten spezifischer

Ausschaltung von NPC1 keine Neurodegeneration detektiert. Die zelltypspezifische Ausschaltung von NPC1 in Neuronen führte hingegen zur Neurodegeneration, sodass hier ein zellautonomer Mechanismus diskutiert wird (Yu *et al*, 2011).

5.2.5 Störungen der Autophagie im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen

Bei der Makroautophagie werden Zytosol, Organellen, große Proteinaggregate oder Pathogene von einer Doppelmembran umschlossen und der Inhalt der Autophagosomen nach Fusion mit Lysosomen abgebaut (Glick *et al*, 2010). Autophagie ist wichtig für die Homöostase postmitotischer Zellen, wie Neuronen, die die Konzentration von Proteinaggregaten oder geschädigten Organellen nicht durch Zellteilung vermindern können (Damme *et al*, 2015). Die gezielte Ausschaltung der *Atg5*- oder *Atg7*-Gene in Mäusen führt zur Akkumulation intrazellulärer Proteinaggregate und Einschlüssen in Neuronen und schließlich zur Neurodegeneration (Hara *et al*, 2006; Komatsu *et al*, 2006). Störungen der Autophagie in Verbindung mit Neurodegeneration wurde in Mausmodellen für LSDs, wie z.B. Mucopolidose Typ II, und verschiedenen NCLs, wie CLN2, CLN3, CLN6 und CLN10, beschrieben (Cao *et al*, 2006; Koike *et al*, 2005; Kollmann *et al*, 2012; Micsenyi *et al*, 2013; Thelen *et al*, 2012). Um zu überprüfen, ob die beobachtete lysosomale Dysfunktion im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse zu Störungen in der Makroautophagie führt, wurden Western-Blot- und immunhistochemische Analysen mit etablierten Antikörpern gegen Markerproteine der Makroautophagie durchgeführt. Im Gehirn von 40 Wochen alten *Cln7*^(-/-) Mäusen wurden zweifach erhöhte Mengen des Autophagosomen-assoziierten Proteins LC3-II detektiert (Abb. 18). Eine Akkumulation von Autophagosomen kann durch eine vermehrte Induktion der Autophagie, durch verminderten Abbau von Autophagosomen oder durch einen Fusionsdefekt zwischen Autophagosomen und Lysosomen verursacht werden (Settembre *et al*, 2008). Um herauszufinden, ob die Autophagie in *Cln7*^(-/-) Mäusen induziert ist, wurde die Proteinexpression von Beclin1 überprüft. Beclin1 wird als Markerprotein für induzierte Autophagie verwendet, da der Beclin1/Vps34-Komplex die Bildung des Phagophors aktiviert (Glick *et al*, 2010). Da die Beclin1-Mengen im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse unverändert waren (Abb. 18), ist die Autophagie in *Cln7*^(-/-) Mäusen nicht aktiviert. Neben der erhöhten Anzahl von Autophagosomen wurden im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse auch große Aggregate des Autophagie-Adapterproteins p62 und polyubiquitinerter

Proteine detektiert (Abb. 18Abb. 19). P62 fungiert als Adapterprotein und bindet an LC3-II, um die selektive Aufnahme und Degradation von polyubiquitinierten Proteinaggregaten zu gewährleisten (Bjorkoy *et al*, 2005). Eine Störung der Makroautophagie in Verbindung mit der Akkumulation von p62-positiven Aggregaten wurde auch im Gehirn von Mausmodellen der CLN2- und CLN6-Erkrankungen sowie in Arylsulfatase G-defizienten Mäusen gezeigt (Kollmann *et al*, 2012; Kowalewski *et al*, 2015; Micsenyi *et al*, 2013). Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse lassen vermuten, dass die konstitutive Makroautophagie und der p62-vermittelte Abbau von polyubiquitinierten Proteinen durch die lysosomale Dysfunktion im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse gestört sind. Eine alternative Ursache für die Akkumulation von p62- und Ubiquitin-positiven Aggregaten könnte aber auch eine erhöhte Permeabilität der lysosomalen Membran sein, wie sie im Gehirn von *Cln2*^(-/-) Mäusen beschrieben wurde (Micsenyi *et al*, 2013). Um diese Hypothese im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse zu überprüfen, müsste die intra- oder extralysosomale Lokalisation der p62/ Ubiquitin-positiven Aggregate durch immunhistochemische Kolokalisierungsanalysen untersucht werden. P62 ist auch an anderen Prozessen in der Zelle beteiligt, so wirkt die p62-abhängige Aktivierung des TRAF-NF κ B Signalwegs positiv auf das Zellüberleben (Sanz *et al*, 2000), während die Interaktion von p62 mit Caspase 6 zur Apoptose führt (Jin *et al*, 2009). Eine Störung in Autophagieprozesse in der Zelle sowie eine Dysregulation von p62 und eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen könnte zur Apoptose führen und damit einen Pathomechanismus für die in *Cln7*^(-/-) Mäusen auftretende Neurodegeneration darstellen.

5.2.6 Retinale Pathologie der CLN7-Erkrankung

Der Visusverlust mit finaler Erblindung durch Degeneration von Photorezeptoren in der Retina sind typische Merkmale bei NCL-Patienten (Radke *et al*, 2015). In Mausmodellen für die CLN3-, CLN5-, CLN6- und CLN8-Erkrankungen wurde ein Verlust von Photorezeptoren beschrieben (Bartsch *et al*, 2013; Kopra *et al*, 2004; Seigel *et al*, 2002; Seigel *et al*, 2005). In Übereinstimmung mit den Daten aus den vLINCL-Mausmodellen wurde eine Degeneration von Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht der Retina in beiden generierten CLN7-Mausmodellen detektiert (Abb. 21; Damme *et al*, 2014). In der Retina von *Cln7*^(-/-) Mäusen kommt es bereits in einem Alter von vier Wochen zum

Absterben der ersten Photorezeptoren. Die lysosomale Speicherung von Scmas und Saposin D konnte ebenfalls nachgewiesen werden und durch die Detektion von erhöhten Mengen an Cathepsinen kann man auch in der Retina von einer von einer lysosomalen Dysfunktion ausgehen (Abb. 21). Das sehr frühe Einsetzen der Neurodegeneration von Photorezeptoren ist ein Hinweis darauf, dass Cln7 in diesen Zellen eine wichtige Funktion hat. In dem hypomorphen *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mausmodell, welches aufgrund von Restaktivität des Cln7 Proteins keinerlei auffälligen Symptome und keine verkürzte Lebensdauer hat, sondern nur Speicherung von Scmas und eine Aktivierung der Gliazellen aufweist, kommt es trotzdem zur Photorezeptorendegeneration (Damme *et al*, 2014). Die besondere Bedeutung der vollständigen Cln7-Aktivität für die Homöostase neuronaler Zellen in der Retina wird durch die Identifizierung adulter CLN7 Patienten betont, die eine retinale Pathologie in Abwesenheit neurologischer NCL-Symptomatik aufweisen (Roosing *et al*, 2015). Weshalb es in der Retina beider Cln7 Mausmodelle zur Neurodegeneration kommt, ist bisher noch unklar. Es könnte, ähnlich wie im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse, eine gestörte Autophagie zur Neurodegeneration führen, allerdings konnten in der Retina von *Cln6*^{(-/-)/nclf} Mäusen keine Veränderungen der Autophagie-Markerproteine LC3-II und p62 detektiert werden (Bartsch *et al*, 2013). Ein anderer Pathomechanismus, der zur Degeneration von Photorezeptoren führt, könnte eine Störung des lysosomalen Abbaus von Rhodopsin sein. Nach lichtabhängiger Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rhodopsinrezeptors, wird Rhodopsin endozytiert und lysosomal abgebaut. In *Drosophila*-Mutanten mit einem defekten endosomalen/ lysosomalen Transport wurde gezeigt, dass es zur Akkumulation von Rhodopsin in frühen Endosomen kommt, was durch einen noch unbekanntem Mechanismus zum Zelltod führt (Chinchore *et al*, 2009).

5.2.7 Normale Biosynthese, Sortierung und proteolytische Prozessierung neusynthetisierter lysosomaler Hydrolasen in *Cln7*^(-/-) MEFs

Störungen der Biosynthese, intrazellulären Sortierung zu Lysosomen und proteolytische Aktivierung von neusynthetisierten, löslichen lysosomaler Hydrolasen könnten Ursachen für die beobachtete lysosomale Dysfunktion in Cln7-defizienten Geweben sein. Durch Immunpräzipitation der lysosomalen Proteasen Cts D und Cts Z aus metabolisch markierten *Cln7*^(-/-)- und Wildtyp MEFs sind Aussagen über die Biosynthese, Kinetik des Transports und die Prozessierung in Lysosomen möglich. Humanes Cts D wird als 53

kDa Vorstufenprotein synthetisiert, zu Endosomen transportiert und zu einer 47 kDa intermediären und anschließend zu zwei 31 kDa und 13-14 kDa reifen Proteinformen prozessiert (Gieselmann *et al*, 1985). Murines Cts Z wird als 38 kDa Vorstufenprotein synthetisiert und im Lysosom zu einer 35 kDa großen reifen Form prozessiert (Pohl & Hasilik, 2015). *Pulse-Chase*-Analysen an primären *Cln7*-defizienten MEFs zeigten keine Veränderungen in der Biosynthese, im lysosomalen Transport und in der proteolytischen Prozessierung von neusynthetisiertem Cts D und Cts Z. Außerdem wurde keine erhöhte Sezernierung von Cts D- und Cts Z-Vorläuferformen ins Medium von *Cln7*^(-/-) MEFs gefunden. Die korrekte Prozessierung von Cts D und Cts Z in Lysosomen von *Cln7*^(-/-) MEFs und im Gehirn von *Cln7*^(-/-) Mäusen (Abb. 15) zeigt, dass die lysosomale Azidifizierung durch die *Cln7*-Defizienz nicht gestört ist. Aufgrund dieser Daten kann ausgeschlossen werden, dass die lysosomale Dysfunktion in MEFs und im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse durch die verminderte Aktivität von Cts D und Cts Z verursacht wird. Bei anderen NCL-Erkrankungen (CLN1 und CLN3) wurden Prozessierungsdefekte bzw. der komplette Verlust von Cts D (CLN10) als mögliche Ursache für lysosomale Dysfunktion und Störungen der Makroautophagie beschrieben (Chandra *et al*, 2015; Fossale *et al*, 2004; Saftig *et al*, 1995). Im Gehirn, kultivierten Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen eines *Cln1*^(-/-) Mausmodells wurden eine gestörte Prozessierung von Cts D zu reifen Formen detektiert, die möglicherweise durch eine Störung der lysosomalen Azidifizierung und verminderte enzymatische Aktivitäten von Cts L und Cts B bedingt sind (Chandra *et al*, 2015).

Radioaktive Aufnahmeexperimente mit *Cln7*^(-/-) MEFs zeigten, dass Bindung, Internalisierung, lysosomaler Transport und Degradation von endozytierter ASB im Vergleich zu Wildtyp MEFs nicht verändert waren. ASB wird M6P-abhängig internalisiert und in den Lysosomen über ein Intermediat von 47 kDa zu einer reifen Form von 15 kDa proteolytisch aktiviert (Steckel *et al*, 1983). In *Cln6*^(-/-)/*nclf* MEFs wurde eine vermehrte Aufnahme sowie eine verminderte Degradation des lysosomalen Proteins Arylsulfatase A gezeigt (Heine *et al*, 2004). Die Ergebnisse zeigen, dass die lysosomale Dysfunktion in *Cln7*^(-/-) MEFs nicht auf Störungen der Biosynthese und Endozytosepfade zu Lysosomen, Veränderungen des lysosomalen pH-Werts und der proteolytischen Prozessierung neusynthetisierter lysosomaler Hydrolasen beruht.

5.2.8 Unterschiede zwischen den *Cln7*^(tm1a/tm1a)- und *Cln7*^(-/-) Mausmodellen

Das *Cln7*^(-/-) Mausmodell rekapituliert wichtige klinische und neuropathologische Merkmale der humanen CLN7-Erkrankung vom vLINCL-Phänotyp: neurologische Symptome, motorische Defizite, erhöhte Mortalität, Autofluoreszenz und lysosomale Speicherung von Scmas, Neuroinflammation und Neurodegeneration im Gehirn und in der Retina. Im Unterschied zu CLN7 Patienten wurden bei den *Cln7*^(-/-) Mäusen die neurologischen und motorischen Störungen erst im Endstadium der Erkrankung manifest und die Neurodegeneration war weniger stark ausgeprägt. Trotzdem stellt die *Cln7*^(-/-) Maus ein geeignetes Modell dar, um CLN7-spezifische Pathomechanismen im Gehirn und in der Retina zu analysieren. Die phänotypischen Analysen zeigten klare Unterschiede zwischen den *Cln7*^(-/-) und den hypomorphen *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen. Symptome und neuropathologische Veränderungen, die in *Cln7*^(-/-) Mäusen, nicht jedoch in *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen detektiert wurden, waren eine erhöhte Mortalität, motorische und neurologische Defizite, erhöhte Expression von Cathepsinen in Mikrogliazellen und Neuronen im Gehirn, Störungen der Makroautophagie und Neurodegeneration im Riechkolben, Cortex und Cerebellum (Tabelle 6). Es ist wahrscheinlich, dass geringe Mengen des Wildtyp Cln7-Proteins in den hypomorphen *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen ausreichen, um die in *Cln7*^(-/-) Mäusen beobachtete neurologische Symptomatik, erhöhte Mortalität und Neurodegeneration im Gehirn zu vermeiden. Die beobachtete Neurodegeneration in der Retina von *Cln7*^(tm1a/tm1a) Mäusen lässt vermuten dass Cln7 eine bedeutende Funktion für die Homöostase von Photorezeptoren besitzt und eine retinale Pathologie bereits bei einer Verminderung der CLN7-Aktivität resultiert (Damme *et al*, 2014). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde bei compound heterozygoten adulten Patienten, die einen kombinierten Defekt mit einer schweren (p.CLN7 E381* oder p.CLN7 K333K fs*3) und einer milden Mutation (p.CLN7 E336Q) im *MFSD8/CLN7* Gen besitzen, ein asymptomatischer Krankheitsverlauf mit makularer Dystrophie aber ohne typische NCL-Symptome wie Neurodegeneration im Gehirn beschrieben (Roosing *et al*, 2015).

Tabelle 6 Vergleich der Neuropathologie bei CLN7 Patienten mit den *Cln7*^(tm1a/tm1a)- und *Cln7*^(-/-) Mausmodellen

| Neuropathologie/ Symptome | Humane CLN7-Erkrankung | <i>Cln7</i> ^(tm1a/tm1a) Mausmodell | <i>Cln7</i> ^(-/-) Mausmodell |
|-------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Epilepsien/Myoklonien/Ataxien | +++ | - | ++ |
| Erhöhte Mortalität | + | - | + |
| Neuroinflammation | +++ | + | +++ |
| Neurodegeneration im Gehirn | ++ | - | + |
| Retinadegeneration | +++ | +++ | +++ |
| Autofluoreszenz | +++ | ++ | +++ |
| Speicherung von Scmas | +++ | ++ | +++ |
| Speicherung von Saposin D | ? | ? | +++ |
| Ultrastruktur des Speichermaterials in Neuronen | rektilinear/ <i>fingerprint</i> | elektronendicht, lamellar | kurvilinear/ <i>fingerprint</i> |
| Erhöhte Expression lysosomaler Enzyme und LMPs | ? | - | +++ |

5.2.9 Signal-abhängiger Transport von CLN7 zu Lysosomen

CLN7 ist ein LMP und besitzt ein dominantes N-terminales Di-Leucinmotiv vom Typ [D/E]XXXL[L/I] und zwei funktionelle C-terminale Tyrosinmotive vom Typ YXXØ (Steenhuis *et al*, 2010). Di-Leucin- und Tyrosinmotive interagieren mit den Untereinheiten der APs, die den intrazellulären Transport von Membranproteinen vermitteln (Park & Guo, 2014). Durch Y3H Experimente konnte Dr. Steenhuis zeigen, dass die N-terminale CLN7-Domäne mit den AP1- γ/σ 1, AP2- α/σ 2, AP3- δ/σ 3-Hemikomplexen, nicht jedoch mit AP4- γ/σ 4 interagiert. Durch Alanin-Substitution der kritischen E9, L13, L14-Reste des N-terminalen Sortierungssignals wurde die Interaktion inhibiert. In Y2H Experimenten wurde die Interaktion des CLN7-CT, der zwei Tyrosinmotive enthält, mit μ 1A und μ 4, den Untereinheiten von AP1 und AP4, gezeigt (Steenhuis, 2015). Um die gefundenen CLN7/AP-Interaktionen zu verifizieren und die Bindungsaffinitäten zu analysieren, wurden in dieser Arbeit SPR- und GST-Kopräzipitations-Analysen durchgeführt. Die SPR-Analysen zeigten eine 3-fach stärkere Interaktion des CLN7-CT mit μ 2 im Vergleich zu μ 1A und keine Interaktion mit μ 3A

(Abb. 25). Die CLN7-CT/ μ 4 Interaktion wurde aufgrund fehlender rekombinanter μ 4-Untereinheit nicht quantifiziert. Während die Interaktion mit μ 1A und die fehlende Bindung an μ 3 in der SPR die Y2H Ergebnisse verifizierte, wurde eine Diskrepanz bei der CLN7-CT/ μ 2 Interaktion detektiert (Steenhuis, 2015). Gründe für die nicht-beobachtete CLN7-CT/ μ 2-Interaktion im Y2H könnten eine geringe oder fehlende Expression des Gal4AD- μ 2 Fusionsproteins in den Hefezellen sein. In Übereinstimmung mit den Y2H Daten wurde gezeigt, dass für die CLN7-CT/ μ 1A bzw. μ 2-Interaktion die Präsenz beider Tyrosinmotive wichtig war. SPR-Interaktionsstudien mit mutierten CLN7-CT Peptiden zeigten jedoch, dass die Interaktionen mit dem Y⁵⁰³KRL-Motiv stärker war als die Interaktion mit dem Y⁵¹³GRI-Motiv. Nach Alanin-Substitution von Y⁵⁰³ wurde eine stärkere Abnahme der CLN7-CT μ 1A bzw. μ 2-Interaktion (80% bzw. 83%) als nach Alanin-Substitution von Y⁵¹³ (52,5% bzw. 58%) gefunden. Die stark abfallende Dissoziationskurven der CLN7-CT/ μ 1A bzw. μ 2-Biacore-Sensorgramme deuten auf eine schwache Interaktion zwischen dem CLN7-CT und den μ 1A- und μ 2-Untereinheiten hin (Abb. 25). In Übereinstimmung damit wurde in GST-Kopräzipitations-Analysen keine Bindung des CLN7-CT mit den heterotetrameren APs aus HEK293T-Lysaten detektiert (Abb. 24). Aufgrund der vorhergesagten Position des Y⁵⁰³KRL-Motivs direkt in Anschluss an den Valinrest in Position 502 der Transmembrandomäne und des resultierenden fehlenden Abstandes zur Membran ist dessen Interaktion mit den AP1- μ 1A- und AP2- μ 2-Untereinheiten *in vivo* unwahrscheinlich. Funktionelle Tyrosinmotive benötigen einen Mindestabstand von sechs bis neun AS von der Transmembrandomäne (Bonifacino & Traub, 2003). Für Lamp1 wurde gezeigt, dass die Deletion von einer AS oder die Insertion von fünf AS zwischen Tyrosinmotiv und Transmembrandomäne den Transport zu Lysosomen fast vollständig verhinderte (Rohrer *et al*, 1996). Zusammenfassend lassen die Daten vermuten, dass der CLN7-CT keine bedeutende Rolle für die lysosomale Sortierung von CLN7 besitzt. Die erhöhte Zelloberflächenkonzentration von CLN7, bei der das Di-Leucinmotiv mit den Tyrosinmotiven in Kombination mutiert wurde, im Vergleich zu CLN7 mit mutiertem Di-Leucinmotiv allein, ist wahrscheinlich auf verminderte AP2-vermittelte Endozytose von fehlsortiertem CLN7 zurückzuführen (Steenhuis *et al*, 2010). In Y3H-Analysen wurde Interaktion des Di-Leucinmotivs des CLN7-NT mit den AP1 γ / σ 1-, AP2 α / σ 2- und AP3 δ / σ 3-Hemikomplexen gezeigt (Steenhuis, 2015). In der

vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen des Di-Leucinmotivs des CLN7-NT durch GST-Kopräzipitations-Analysen mit AP1 und AP2 bestätigt, nicht jedoch mit AP3 (Abb. 24). Im Unterschied zu den Y3H-Interaktionsanalysen findet die Wechselwirkung des CLN7-NT bei den GST-Kopräzipitations-Analysen in Anwesenheit aller fünf verschiedenen APs statt, sodass Aussagen über die Affinität der Wechselwirkung möglich sind. Die Daten zeigen, dass das Di-Leucin Motiv des CLN7-NT am stärksten mit AP1 und schwächer mit AP2 interagiert (Abb. 24). In ähnlichen Kopräzipitations-Analysen mit HeLa- und Mausleberlysaten wurde die Interaktion des CLN7-NT mit AP1, nicht jedoch mit AP2 und AP3 gezeigt (Sharifi *et al*, 2010). Aufgrund der starken Wechselwirkung des dominanten Di-Leucin Motivs mit AP1 ist zu vermuten, dass CLN7 hauptsächlich auf direktem Weg vom TGN zu endosomalen Kompartimenten transportiert wird. Die fehlende Segregation von CLN7 mit mutiertem Di-Leucinmotiv in Clathrin-beschichtete Vesikel im TGN durch AP1 würde zu dessen erhöhter Zelloberflächenkonzentration führen (Steenhuis *et al*, 2010).

Neben der Wechselwirkung der Sortierungssignale mit den AP-Untereinheiten sind *in vivo* weitere Faktoren, wie die Anwesenheit von Lipiden, Cofaktoren und akzessorischen Proteine wichtig. Auch die Expressionshöhen und unterschiedlichen Konzentrationen der APs in verschiedenen Zellkompartimenten spielen eine Rolle (Braulke & Bonifacino, 2009). Um zu überprüfen, ob CLN7 unter physiologischen Bedingungen über den direkten oder indirekten Weg zum Lysosom transportiert wird und welche APs dabei wichtig sind, wurden die Kinetik des Transports zu Lysosomen und die Missortierung von CLN7 an die Plasmamembran in AP-*kd* HEK293T und HeLa-Zellen untersucht (Abb. 26Abb. 28). Um die Kinetik des CLN7-Transports zu Lysosomen zu untersuchen, wurden *Pulse-Chase* Experimente an metabolisch markierten AP-*kd* HEK293T-Zellen mit einer kurzen Chase-Zeit von 5 h durchgeführt. Das Verhältnis der im Lysosom gespaltenen 38 kDa CLN7-Fragmente zur ungespaltenen CLN7-Proteinfraction wurde als Maß für den lysosomalen Transport verwendet. Die Analysen zeigten keine Unterschiede in der Kinetik des Transports von CLN7 zu Lysosomen in AP-*kd* Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 26). Bei einer Positivkontrolle mit Alanin-Substitution des N-terminalen Di-Leucinmotivs von CLN7 wurde eine stark verlangsamte Kinetik mit einer Verminderung des 38 kDa CLN7 Fragments um 80% gefunden. Western-Blot-Analysen zeigten, dass durch siRNA-vermitteltem *kd* die AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ -

Proteinmengen quantitativ reduziert waren, während von der AP1 γ -Untereinheit Restproteinmengen verblieben. Die Daten zur Kinetik des CLN7-Transports sind daher nur für AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ *kd* Zellen zu interpretieren. FACS-Analysen stellen eine alternative, etablierte und sensitive Methode zur Quantifizierung der Missortierung durch Zelloberflächen-Expressionsanalysen von LMPs dar (Janvier *et al*, 2003). Aufgrund der höheren Effizienz des siRNA-vermittelten *kd* der APs, insbesondere von AP1 γ , wurden HeLa- anstatt HEK293T-Zellen verwendet (Abb. 28). Für die FACS-Analysen wurde ein CLN7-Konstrukt mit einem eingefügtem HA-Epitop Tag in der luminalen Schleife L9 verwendet. Um Missortierung an die Plasmamembran durch die hohe Überexpression bei transienter Transfektion zu vermeiden, wurden stabile, CLN7-HA und CLN7-HA L13L14-AA exprimierende HeLa-Zelllinien hergestellt. In Western-Blot-Analysen wurden eine 15/18 kDa-CLN7-Doppelbande in stabil CLN7-HA exprimierenden HeLa-Zellen detektiert, die dem C-terminalen HA-CLN7-Fragment nach proteolytischer Spaltung im Lysosom entspricht (Abb. 27). Der inserierte luminale HA-Tag ist in der Schleife L9 von CLN7 lokalisiert, die in Lysosomen durch Cysteinproteasen zweifach gespalten wird (Steenhuis *et al*, 2012). Im Unterschied zu HEK293-Zellen waren die AP1 γ -, AP2 α -, AP3 δ - und AP4 ϵ -Proteinmengen in AP-*kd* HeLa-Zellen signifikant reduziert. In den FACS-Analysen wurde eine erhöhte Menge an CLN7 an der Zelloberfläche in AP1 γ - (1,2-fach) und AP2 α -*kd* (1,6-fach) Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert (Abb. 28). Es ist wahrscheinlich, dass CLN7 sowohl über den direkten Weg über AP1, als auch über den indirekten Weg über AP2 zum Lysosom sortiert wird. Aufgrund der nur geringen Erhöhung der CLN7 Konzentration an der Zelloberfläche in AP1 γ - bzw. AP2 α -*kd* Zellen im Vergleich zur 7,5-fachen Erhöhung der CLN7-HA L¹³L¹⁴-AA Mutante ist es möglich, dass sowohl AP1 als auch AP2 wichtig für die lysosomale Sortierung von CLN7 sind und die Funktion untereinander kompensierbar sind. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist CLN7 in AP1-defizienten MEFs in Lysosomen lokalisiert (Sharifi *et al*, 2010). Um eine gegenseitige Kompensation experimentell zu überprüfen, müssten AP1 und AP2 in Kombination oder alternativ die schwere Kette von Clathrin herunterreguliert werden (Janvier *et al*, 2003). Die Bedeutung von AP1 und AP2 wurde für den lysosomalen Transport des MFS-Transporters GLUT8 gezeigt (Diril *et al*, 2009).

6. Zusammenfassung

Die CLN7-Erkrankung ist eine neurodegenerative, autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speichererkrankung, die durch Defekte im *MFSD8/CLN7*-Gen verursacht wird. Das CLN7-Membranglykoprotein ist ein lysosomaler MFS-Transporter mit unbekanntem Substrat. In dieser Arbeit wurden durch Deletion des Exon 2 des murinen *Mfsd8/Cln7*-Gens zwei Mausmodelle für die CLN7-Erkrankung generiert: eine *Cln7 lacZ Gene-trap* (*Cln7^(tm1a/tm1a)*) Maus und eine *Cln7 knockout* (*Cln7^(-/-)*) Maus. Mit Hilfe dieser Mausmodelle wurden der Beginn und die altersabhängige Progression neurodegenerativer, morphologischer und biochemischer Veränderungen im Gehirn, sowie die Beteiligung von Pathomechanismen bei der CLN7-Erkrankung analysiert.

- Analysen der β -Galaktosidase-Expression in der *Cln7^(+/tm1a)* Maus zeigten die stärkste Expression von Cln7 in Neuronen des Hippocampus und zerebralem Cortex
- es wurde ein polyklonaler anti-Cln7 Antikörper generiert, der das endogene Cln7 der Maus in Western-Blot-Analysen detektiert
- Western-Blot-Analysen von Tritosomen aus Lebergewebe zeigten, dass Cln7 ein integrales lysosomales Membranprotein ist
- die hypomorphen *Cln7^(tm1a/tm1a)* Mäuse rekapitulieren wichtige, aber nicht alle Merkmale der humanen CLN7-Erkrankung wie Speicherung von Scmas, Autofluoreszenz in Neuronen, Aktivierung von Astrozyten, und Degeneration von Photorezeptoren in der Retina
- phänotypische Analysen zeigten, dass die *Cln7^(-/-)* Mäuse ein geeignetes Modell zum Studium der CLN7-Erkrankung mit variant spät-infantilem Phänotyp darstellen
- bei den *Cln7^(-/-)* Mäusen wurden erhöhte Mortalität und neurologische und motorische Symptomatik im Endstadium der Erkrankung detektiert
- in der Retina von *Cln7^(-/-)* Mäusen wurde eine im Alter von einem Monat einsetzende, progredient fortschreitende Neurodegeneration von Photorezeptoren der äußeren Körnerschicht, Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen gefunden
- es wurden eine erhöhte Expression der löslichen lysosomalen Enzyme Cts Z, Cts D und Cts B im Gehirn der *Cln7^(-/-)* Mäuse gefunden

- die *Cln7*-Defizienz führt im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse zur generalisierten Akkumulation von autofluoreszierendem Speichermaterial in Lysosomen, das aus Scmas und Saposin D zusammengesetzt ist und ultrastrukturell hauptsächlich kurvilineare Einlagerungen und vereinzelt *fingerprint*-Profile enthält
- im Gehirn der *Cln7*^(-/-) Mäuse waren verschiedene Pathomechanismen beteiligt, wie die Aktivierung neuroinflammatorischer Zellen, lysosomale Dysfunktion und Störungen der Makroautophagie
- MRT-Analysen von *Cln7*^(-/-) Mäusen zeigten Neurodegeneration im Riechkolben, im zerebralen und im cerebellären Cortex im Endstadium der Erkrankung

Für den signalabhängigen Transport von CLN7 zu Lysosomen sind ein dominantes N-terminales Di-Leucinmotiv und zwei C-terminale Tyrosinmotive wichtig.

- durch *in vitro* GST-Kopräzipitations-Experimente wurde eine Interaktion des N-terminalen Di-Leucinmotivs mit AP1 und AP2 verifiziert
- Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Analysen bestätigten die Interaktion der C-terminalen Tyrosinmotive mit μ 1A und zeigten eine bisher nicht detektierte Interaktion mit μ 2
- Fluoreszenz-basierte FACS-Analysen zeigten, dass CLN7 in AP1 γ - und AP2 α -*knockdown* Zellen an die Plasmamembran fehlsortiert wird.

7. Literaturverzeichnis

Adam T, Alexandrescu L, Voinea F, Toringhibel M, Hancu A (2006) Fabry's disease. *Rom J Intern Med* 44: 455-464

Aiello C, Terracciano A, Simonati A, Discepoli G, Cannelli N, Claps D, Crow YJ, Bianchi M, Kitzmüller C, Longo D, Tavoni A, Franzoni E, Tessa A, Veneselli E, Boldrini R, Filocamo M, Williams RE, Bertini ES, Biancheri R, Carrozzo R, Mole SE, Santorelli FM (2009) Mutations in MFSD8/CLN7 are a frequent cause of variant-late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mutat* 30: E530-540

Aisen P (2004) Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2137-2143

Amritraj A, Peake K, Kodam A, Salio C, Merighi A, Vance JE, Kar S (2009) Increased activity and altered subcellular distribution of lysosomal enzymes determine neuronal vulnerability in Niemann-Pick type C1-deficient mice. *Am J Pathol* 175: 2540-2556

Anderson GW, Goebel HH, Simonati A (2013) Human pathology in NCL. *Biochim Biophys Acta* 1832: 1807-1826

Appelqvist H, Waster P, Kagedal K, Ollinger K (2013) The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* 5: 214-226

Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW (2005) Lysosomal membrane proteomics and biogenesis of lysosomes. *Mol Neurobiol* 32: 27-41

Ballabio A, Gieselmann V (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793: 684-696

Bartsch U, Galliciotti G, Jofre GF, Jankowiak W, Hagel C, Braulke T (2013) Apoptotic photoreceptor loss and altered expression of lysosomal proteins in the nclf mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 6952-6959

Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603-614

Blumstein J, Faundez V, Nakatsu F, Saito T, Ohno H, Kelly RB (2001) The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *J Neurosci* 21: 8034-8042

Boehm M, Aguilar RC, Bonifacino JS (2001) Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J* 20: 6265-6276

Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72: 395-447

Bonnemaison M, Back N, Lin Y, Bonifacino JS, Mains R, Eipper B (2014) AP-1A controls secretory granule biogenesis and trafficking of membrane secretory granule proteins. *Traffic* 15: 1099-1121

Borner GH, Antrobus R, Hirst J, Bhumbra GS, Kozik P, Jackson LP, Sahlender DA, Robinson MS (2012) Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles. *J Cell Biol* 197: 141-160

Boya P, Kroemer G (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27: 6434-6451

Braulke T, Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793: 605-614

Braun M, Waheed A, von Figura K (1989) Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *EMBO J* 8: 3633-3640

Bronson RT, Donahue LR, Johnson KR, Tanner A, Lane PW, Faust JR (1998) Neuronal ceroid lipofuscinosis (nclf), a new disorder of the mouse linked to chromosome 9. *Am J Med Genet* 77: 289-297

Burgos PV, Mardones GA, Rojas AL, daSilva LL, Prabhu Y, Hurley JH, Bonifacino JS (2010) Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. *Dev Cell* 18: 425-436

Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8: 569-581

Cao Y, Espinola JA, Fossale E, Massey AC, Cuervo AM, MacDonald ME, Cotman SL (2006) Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 281: 20483-20493

Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon RA (1995) Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* 14: 671-680

Chandra G, Bagh MB, Peng S, Saha A, Sarkar C, Moralle M, Zhang Z, Mukherjee AB (2015) Cln1 gene disruption in mice reveals a common pathogenic link between two of the most lethal childhood neurodegenerative lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* doi: 10.1093/hmg/ddv266

Chapel A, Kieffer-Jaquinod S, Sagne C, Verdon Q, Ivaldi C, Mellal M, Thirion J, Jadot M, Bruley C, Garin J, Gasnier B, Journet A (2013) An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol Cell Proteomics* 12: 1572-1588

- Cherqui S, Kalatzis V, Trugnan G, Antignac C (2001) The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem* 276: 13314-13321
- Chinchore Y, Mitra A, Dolph PJ (2009) Accumulation of rhodopsin in late endosomes triggers photoreceptor cell degeneration. *PLoS Genet* 5: e1000377
- Cooper JD, Messer A, Feng AK, Chua-Couzens J, Mobley WC (1999) Apparent loss and hypertrophy of interneurons in a mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis: evidence for partial response to insulin-like growth factor-1 treatment. *J Neurosci* 19: 2556-2567
- Cooper JD, Russell C, Mitchison HM (2006) Progress towards understanding disease mechanisms in small vertebrate models of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 873-889
- Cooper JD, Tarczyluk MA, Nelvagal HR (2015) Towards a new understanding of NCL pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*
- Cotman SL, Staropoli JF (2012) The juvenile Batten disease protein, CLN3, and its role in regulating anterograde and retrograde post-Golgi trafficking. *Clin Lipidol* 7: 79-91
- Damme M, Brandenstein L, Fehr S, Jankowiak W, Bartsch U, Schweizer M, Hermans-Borgmeyer I, Storch S (2014) Gene disruption of Mfsd8 in mice provides the first animal model for CLN7 disease. *Neurobiol Dis* 65: 12-24
- Damme M, Suntio T, Saftig P, Eskelinen EL (2015) Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions. *Acta Neuropathol* 129: 337-362
- Davies MJ, Cooper M, Perry VH, O'Connor V (2015) Reduced expression of the presynaptic co-chaperone cysteine string protein alpha (CSPalpha) does not exacerbate experimentally-induced ME7 prion disease. *Neurosci Lett* 589: 138-143
- de Duve C (1983) Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* 137: 391-397
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Bonifacino JS (1999) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* 274: 7278-7285
- Di Malta C, Fryer JD, Settembre C, Ballabio A (2012) Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2334-2342
- Diril MK, Schmidt S, Krauss M, Gawlik V, Joost HG, Schurmann A, Haucke V, Augustin R (2009) Lysosomal localization of GLUT8 in the testis--the EXXXLL motif of GLUT8 is sufficient for its intracellular sorting via AP1- and AP2-mediated interaction. *FEBS J* 276: 3729-3743

Eskelinen EL, Saftig P (2009) Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1793: 664-673

Fossale E, Wolf P, Espinola JA, Lubicz-Nawrocka T, Teed AM, Gao H, Rigamonti D, Cattaneo E, MacDonald ME, Cotman SL (2004) Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Neurosci* 5: 57

Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA (2009) Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 9: 217-227

Gieselmann V, Hasilik A, von Figura K (1985) Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J Biol Chem* 260: 3215-3220

Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221: 3-12

Götzl JK, Mori K, Damme M, Fellerer K, Tahirovic S, Kleinberger G, Janssens J, van der Zee J, Lang CM, Kremmer E, Martin JJ, Engelborghs S, Kretzschmar HA, Arzberger T, Van Broeckhoven C, Haass C, Capell A (2014) Common pathobiochemical hallmarks of progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration and neuronal ceroid lipofuscinosis. *Acta Neuropathol* 127: 845-860

Gray DA, Woulfe J (2005) Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005: re1

Grubman A, Pollari E, Duncan C, Caragounis A, Blom T, Volitakis I, Wong A, Cooper J, Crouch PJ, Koistinaho J, Jalanko A, White AR, Kanninen KM (2014) Deregulation of biometal homeostasis: the missing link for neuronal ceroid lipofuscinoses? *Metallomics* 6: 932-943

Guo J, O'Brien DP, Mhlanga-Mutangadura T, Olby NJ, Taylor JF, Schnabel RD, Katz ML, Johnson GS (2014) A rare homozygous MFSD8 single-base-pair deletion and frameshift in the whole genome sequence of a Chinese Crested dog with neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Vet Res* 10: 960

Hafler BP, Klein ZA, Jimmy Zhou Z, Strittmatter SM (2014) Progressive retinal degeneration and accumulation of autofluorescent lipopigments in Progranulin deficient mice. *Brain Res* 1588: 168-174

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10: 1387-1394

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885-889

- Heine C, Koch B, Storch S, Kohlschütter A, Palmer DN, Braulke T (2004) Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A. *J Biol Chem* 279: 22347-22352
- Hickey AJ, Chotkowski HL, Singh N, Ault JG, Korey CA, MacDonald ME, Glaser RL (2006) Palmitoyl-protein thioesterase 1 deficiency in *Drosophila melanogaster* causes accumulation of abnormal storage material and reduced life span. *Genetics* 172: 2379-2390
- Hirst J, Barlow LD, Francisco GC, Sahlender DA, Seaman MN, Dacks JB, Robinson MS (2011) The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol* 9: e1001170
- Hirst J, Irving C, Borner GH (2013) Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. *Traffic* 14: 153-164
- Höhn A, Grune T (2013) Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 1: 140-144
- Höhn A, Jung T, Grimm S, Grune T (2010) Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. *Free Radic Biol Med* 48: 1100-1108
- Höning S, Ricotta D, Krauss M, Spate K, Spolaore B, Motley A, Robinson M, Robinson C, Hauke V, Owen DJ (2005) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* 18: 519-531
- Horvath J, Ketelsen UP, Geibel-Zehender A, Boehm N, Olbrich H, Korinthenberg R, Omran H (2003) Identification of a novel LAMP2 mutation responsible for X-chromosomal dominant Danon disease. *Neuropediatrics* 34: 270-273
- Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *EMBO J* 30: 3481-3500
- Jabs S, Quitsch A, Kakela R, Koch B, Tyynela J, Brade H, Glatzel M, Walkley S, Saftig P, Vanier MT, Braulke T (2008) Accumulation of bis(monoacylglycero)phosphate and gangliosides in mouse models of neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurochem* 106: 1415-1425
- Jalanko A, Braulke T (2009) Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1793: 697-709
- Janvier K, Bonifacino JS (2005) Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell* 16: 4231-4242
- Janvier K, Kato Y, Boehm M, Rose JR, Martina JA, Kim BY, Venkatesan S, Bonifacino JS (2003) Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol* 163: 1281-1290

- Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A (2009) Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137: 721-735
- Johnstone D, Graham RM, Trinder D, Delima RD, Riveros C, Olynyk JK, Scott RJ, Moscato P, Milward EA (2012) Brain transcriptome perturbations in the Hfe(-/-) mouse model of genetic iron loading. *Brain Res* 1448: 144-152
- Johnstone D, Milward EA (2010) Genome-wide microarray analysis of brain gene expression in mice on a short-term high iron diet. *Neurochem Int* 56: 856-863
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18: 571-580
- Kaushik S, Cuervo AM (2012) Chaperones in autophagy. *Pharmacol Res* 66: 484-493
- Kett LR, Stiller B, Bernath MM, Tasset I, Blesa J, Jackson-Lewis V, Chan RB, Zhou B, Di Paolo G, Przedborski S, Cuervo AM, Dauer WT (2015) alpha-Synuclein-independent histopathological and motor deficits in mice lacking the endolysosomal Parkinsonism protein Atp13a2. *J Neurosci* 35: 5724-5742
- Kohlschütter A, Schulz A (2009) Towards understanding the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Brain Dev* 31: 499-502
- Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, Saftig P, Uchiyama Y (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167: 1713-1728
- Kollmann K, Damme M, Markmann S, Morelle W, Schweizer M, Hermans-Borgmeyer I, Rochert AK, Pohl S, Lubke T, Michalski JC, Kakela R, Walkley SU, Braulke T (2012) Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucopolidosis II 'knock-in' mice. *Brain* 135: 2661-2675
- Kollmann K, Pohl S, Marschner K, Encarnacao M, Sakwa I, Tiede S, Poorthuis BJ, Lubke T, Muller-Loennies S, Storch S, Braulke T (2010) Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol* 89: 117-123
- Kollmann K, Uusi-Rauva K, Scifo E, Tyynela J, Jalanko A, Braulke T (2013) Cell biology and function of neuronal ceroid lipofuscinosis-related proteins. *Biochim Biophys Acta* 1832: 1866-1881
- Kolter T, Sandhoff K (2010) Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett* 584: 1700-1712
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-884

Kopra O, Vesa J, von Schantz C, Manninen T, Minye H, Fabritius AL, Rapola J, van Diggelen OP, Saarela J, Jalanko A, Peltonen L (2004) A mouse model for Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, CLN5, reveals neuropathology associated with early aging. *Hum Mol Genet* 13: 2893-2906

Kornfeld S, Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5: 483-525

Kousi M, Siintola E, Dvorakova L, Vlaskova H, Turnbull J, Topcu M, Yuksel D, Gokben S, Minassian BA, Elleder M, Mole SE, Lehesjoki AE (2009) Mutations in CLN7/MFSD8 are a common cause of variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain* 132: 810-819

Kowalewski B, Heimann P, Ortkras T, Lullmann-Rauch R, Sawada T, Walkley SU, Dierks T, Damme M (2015) Ataxia is the major neuropathological finding in arylsulfatase G-deficient mice: similarities and dissimilarities to Sanfilippo disease (mucopolysaccharidosis type III). *Hum Mol Genet* 24: 1856-1868

Kuronen M, Lehesjoki AE, Jalanko A, Cooper JD, Kopra O (2012) Selective spatiotemporal patterns of glial activation and neuron loss in the sensory thalamocortical pathways of neuronal ceroid lipofuscinosis 8 mice. *Neurobiol Dis* 47: 444-457

Kyttälä A, Yliannala K, Schu P, Jalanko A, Luzio JP (2005) AP-1 and AP-3 facilitate lysosomal targeting of Batten disease protein CLN3 via its dileucine motif. *J Biol Chem* 280: 10277-10283

Levi S, Finazzi D (2014) Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms. *Front Pharmacol* 5: 99

Macauley SL, Pekny M, Sands MS (2011) The role of attenuated astrocyte activation in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosci* 31: 15575-15585

Matsuda S, Miura E, Matsuda K, Kakegawa W, Kohda K, Watanabe M, Yuzaki M (2008) Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron* 57: 730-745

Metha W. (2012) Lysosomal Storage Disorders. Wiley-Blackwell.

Micsenyi MC, Sikora J, Stephney G, Dobrenis K, Walkley SU (2013) Lysosomal membrane permeability stimulates protein aggregate formation in neurons of a lysosomal disease. *J Neurosci* 33: 10815-10827

Miedel MT, Weixel KM, Bruns JR, Traub LM, Weisz OA (2006) Posttranslational cleavage and adaptor protein complex-dependent trafficking of mucolinipin-1. *J Biol Chem* 281: 12751-12759

Miller EH, Obernosterer G, Raaben M, Herbert AS, Deffieu MS, Krishnan A, Ndungo E, Sandesara RG, Carette JE, Kuehne AI, Ruthel G, Pfeffer SR, Dye JM, Whelan SP, Brummelkamp TR, Chandran K (2012) Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J* 31: 1947-1960

- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27: 421-429
- Mole SE, Williams RE, Goebel HH (2011) *The neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease)*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press.
- Myllykangas L, Tyynelä J, Page-McCaw A, Rubin GM, Haltia MJ, Feany MB (2005) Cathepsin D-deficient *Drosophila* recapitulate the key features of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurobiol Dis* 19: 194-199
- Nakajima K, Tohyama Y, Maeda S, Kohsaka S, Kurihara T (2007) Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochem Int* 50: 807-820
- Nakatsu F, Hase K, Ohno H (2014) The Role of the Clathrin Adaptor AP-1: Polarized Sorting and Beyond. *Membranes (Basel)* 4: 747-763
- Neverman NJ, Best HL, Hofmann SL, Hughes SM (2015) Experimental therapies in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* doi: 10.1016/j.bbadis.2015.04.026
- Nijssen PC, Ceuterick C, van Diggelen OP, Elleder M, Martin JJ, Teepen JL, Tyynelä J, Roos RA (2003) Autosomal dominant adult neuronal ceroid lipofuscinosis: a novel form of NCL with granular osmiophilic deposits without palmitoyl protein thioesterase 1 deficiency. *Brain Pathol* 13: 574-581
- Noskova L, Stranecky V, Hartmannova H, Pristoupilova A, Baresova V, Ivanek R, Hulkova H, Jahnova H, van der Zee J, Staropoli JF, Sims KB, Tyynelä J, Van Broeckhoven C, Nijssen PC, Mole SE, Elleder M, Kmoch S (2011) Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet* 89: 241-252
- Ooi CE, Dell'Angelica EC, Bonifacino JS (1998) ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol* 142: 391-402
- Palmer DN (2015) The relevance of the storage of subunit c of ATP synthase in different forms and models of Batten disease (NCLs). *Biochim Biophys Acta* doi: 10.1016/j.bbadis.2015.06.014
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131-24145
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1-34
- Park SY, Guo X (2014) Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep* 34

- Pohl S, Hasilik A (2015) Biosynthesis, targeting, and processing of lysosomal proteins: pulse-chase labeling and immune precipitation. *Methods Cell Biol* 126: 63-83
- Pohl S, Marschner K, Storch S, Braulke T (2009) Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biol Chem* 390: 521-527
- Radke J, Stenzel W, Goebel HH (2015) Human NCL Neuropathology. *Biochim Biophys Acta* doi: 10.1016/j.bbadis.2015.05.007
- Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131: 770-783
- Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B (2012) Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1824: 22-33
- Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S (1996) The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* 132: 565-576
- Roosing S, van den Born LI, Sangermano R, Banfi S, Koenekoop RK, Zonneveld-Vrieling MN, Klaver CC, van Lith-Verhoeven JJ, Cremers FP, den Hollander AI, Hoyng CB (2015) Mutations in MFSD8, encoding a lysosomal membrane protein, are associated with nonsyndromic autosomal recessive macular dystrophy. *Ophthalmology* 122: 170-179
- Ruivo R, Anne C, Sagne C, Gasnier B (2009) Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1793: 636-649
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 15: 741-750
- Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL (2008) LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 4: 510-512
- Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Köster A, Hess B, Evers M, von Figura K, et al. (1995) Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 14: 3599-3608
- Saftig P, Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 623-635
- Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J (2000) The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J* 19: 1576-1586

Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325: 473-477

Schlotawa L, Radhakrishnan K, Baumgartner M, Schmid R, Schmidt B, Dierks T, Gärtner J (2013) Rapid degradation of an active formylglycine generating enzyme variant leads to a late infantile severe form of multiple sulfatase deficiency. *Eur J Hum Genet* 21: 1020-1023

Schneider SA, Dusek P, Hardy J, Westenberger A, Jankovic J, Bhatia KP (2013) Genetics and Pathophysiology of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA). *Curr Neuropharmacol* 11: 59-79

Schröder B, Wrocklage C, Pan C, Jager R, Kösters B, Schäfer H, Elsässer HP, Mann M, Hasilik A (2007) Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic* 8: 1676-1686

Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P (2010) The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10: 4053-4076

Schulze H, Sandhoff K (2011) Lysosomal lipid storage diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3

Schwake M, Schröder B, Saftig P (2013) Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic* 14: 739-748

Seigel GM, Lotery A, Kummer A, Bernard DJ, Greene ND, Turmaine M, Derksen T, Nussbaum RL, Davidson B, Wagner J, Mitchison HM (2002) Retinal pathology and function in a Cln3 knockout mouse model of juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (batten disease). *Mol Cell Neurosci* 19: 515-527

Seigel GM, Wagner J, Wronska A, Campbell L, Ju W, Zhong N (2005) Progression of early postnatal retinal pathology in a mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Eye (Lond)* 19: 1306-1312

Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A (2008) A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* 17: 119-129

Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 283-296

Shacka JJ (2012) Mouse models of neuronal ceroid lipofuscinoses: useful pre-clinical tools to delineate disease pathophysiology and validate therapeutics. *Brain Res Bull* 88: 43-57

Sharifi A, Kousi M, Sagne C, Bellenchi GC, Morel L, Darmon M, Hulkova H, Ruivo R, Debacker C, El Mestikawy S, Elleder M, Lehesjoki AE, Jalanko A, Gasnier B, Kyttälä A (2010) Expression and lysosomal targeting of CLN7, a major facilitator superfamily transporter associated with variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet* 19: 4497-4514

Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC (2008) A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 320: 1207-1210

Siintola E, Topcu M, Aula N, Lohi H, Minassian BA, Paterson AD, Liu XQ, Wilson C, Lahtinen U, Anttonen AK, Lehesjoki AE (2007) The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *Am J Hum Genet* 81: 136-146

Simmen T, Höning S, Icking A, Tikkanen R, Hunziker W (2002) AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* 4: 154-159

Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A (2011) A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474: 337-342

Skjorringe T, Burkhardt A, Johnsen KB, Moos T (2015) Divalent metal transporter 1 (DMT1) in the brain: implications for a role in iron transport at the blood-brain barrier, and neuronal and glial pathology. *Front Mol Neurosci* 8: 19

Soldati T, Neyrolles O (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic* 13: 1042-1052

Steckel F, Hasilik A, von Figura K (1983) Biosynthesis and maturation of arylsulfatase B in normal and mutant cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 258: 14322-14326

Steenhuis P (2015) Intracellular Sorting and Biochemical Analysis of the Lysosomal Membrane Protein CLN7. PhD Thesis, Hamburg

Steenhuis P, Froemming J, Reinheckel T, Storch S (2012) Proteolytic cleavage of the disease-related lysosomal membrane glycoprotein CLN7. *Biochim Biophys Acta* 1822: 1617-1628

Steenhuis P, Herder S, Gelis S, Braulke T, Storch S (2010) Lysosomal targeting of the CLN7 membrane glycoprotein and transport via the plasma membrane require a dileucine motif. *Traffic* 11: 987-1000

Storch S, Pohl S, Braulke T (2004) A dileucine motif and a cluster of acidic amino acids in the second cytoplasmic domain of the batten disease-related CLN3 protein are required for efficient lysosomal targeting. *J Biol Chem* 279: 53625-53634

Tanaka Y, Chambers JK, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M (2014) Possible involvement of lysosomal dysfunction in pathological changes of the brain in aged progranulin-deficient mice. *Acta Neuropathol Commun* 2: 78

Tang CH, Lee JW, Galvez MG, Robillard L, Mole SE, Chapman HA (2006) Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease. *Mol Cell Biol* 26: 2309-2316

Thelen M, Damme M, Schweizer M, Hagel C, Wong AM, Cooper JD, Braulke T, Galliciotti G (2012) Disruption of the autophagy-lysosome pathway is involved in neuropathology of the nclf mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *PLoS One* 7: e35493

Traub LM (2005) Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1744: 415-437

Tylki-Szymanska A (2014) Mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev* 12 Suppl 1: 107-113

Tyynelä J, Palmer DN, Baumann M, Haltia M (1993) Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *FEBS Lett* 330: 8-12

Vitner EB, Dekel H, Zigdon H, Shachar T, Farfel-Becker T, Eilam R, Karlsson S, Futerman AH (2010) Altered expression and distribution of cathepsins in neuronopathic forms of Gaucher disease and in other sphingolipidoses. *Hum Mol Genet* 19: 3583-3590

Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* 114: 299-310

Watts C (2012) The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. *Biochim Biophys Acta* 1824: 14-21

Wilke S, Krausze J, Bussow K (2012) Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycocalyx. *BMC Biol* 10: 62

Williams RE, Mole SE (2012) New nomenclature and classification scheme for the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurology* 79: 183-191

Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9: 1102-1109

Yap CC, Murate M, Kishigami S, Muto Y, Kishida H, Hashikawa T, Yano R (2003) Adaptor protein complex-4 (AP-4) is expressed in the central nervous system neurons and interacts with glutamate receptor delta2. *Mol Cell Neurosci* 24: 283-295

Yogalingam G, Bonten EJ, van de Vlekkert D, Hu H, Moshiah S, Connell SA, d'Azzo A (2008) Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. *Dev Cell* 15: 74-86

Yu T, Shakkottai VG, Chung C, Lieberman AP (2011) Temporal and cell-specific deletion establishes that neuronal Npc1 deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 20: 4440-4451

Zhao H (2012) Membrane trafficking in osteoblasts and osteoclasts: new avenues for understanding and treating skeletal diseases. *Traffic* 13: 1307-1314

8. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Damme M, **Brandenstein L**, Fehl S, Jankowiak W, Bartsch U, Schweizer M, Hermans-Borgmeyer I, Storch S (2014) Gene disruption of *Mfsd8* in mice provides the first animal model for CLN7 disease. *Neurobiol Dis* 65: 12-24

Brandenstein L, Schweizer M, Storch, S Impaired autophagy contributes to lysosomal storage and neurodegeneration in a mouse model for CLN7 disease. Manuskript in Vorbereitung, Einreichung bei *Human Molecular Genetics*

Jankowiak, W, **Brandenstein L**, Hagel, C, Storch, S, Bartsch, U Retinal degeneration in a mouse model for CNL7 disease. Manuskript in Vorbereitung, Einreichung bei *Investigative Ophthalmology and Visual Science*

Kongressbeiträge (Vorträge)

- ESGLD (European Study Group on Lysosomal Diseases) Workshop, Graz, Österreich 09/2013
- Retreat des Graduiertenkolleg 1459, Wismar 10/2013
- APS (Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen) Jahrestagung, Fulda 03/2014
- SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium, Innsbruck, Österreich 09/2014
- Retreat des Graduiertenkolleg 1459, Hohewacht 10/2014

Kongressbeiträge (Poster)

- DGZ (Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie) Jahrestagung, Heidelberg 03/2013
- 3rd International Symposium on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg 09/2014
- NCL (Neuronal Ceroid Lipofuscinosis) Konferenz, Cordoba, Argentinien 10/2014

Kongressteilnahmen

- 2nd International Symposium on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg 09/2012
- Retreat des Graduiertenkolleg 1459, Wedel 10/2012

Auslandsaufenthalt

Cambridge Institute for Medical Research, Clinical Biochemistry, Labor von Prof. Margaret Robinson, 01.02.2015-30.04.15

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 16.09.2015

Unterschrift

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit und während der letzten drei Jahre unterstützt haben:

Zunächst möchte ich mich bei Stephan Storch und Thomas Braulke für die Bereitstellung eines sehr spannenden Projekts und für die Unterstützung und anregenden Diskussionen mit konstruktiver Kritik bedanken.

Bei Thomas Braulke möchte ich mich für die Leitung der Graduiertenschule 1459 bedanken, die dieses Projekt finanziell unterstützt hat und für die fachlichen Weiterbildungsmöglichkeiten, Retreats, Symposien und natürlich den 3-monatigen Auslandsaufenthalt in Cambridge.

Bei PD Dr. rer. nat. Sabine Lühje bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Pieter Steenhuis möchte ich mich für die Einarbeitung und Vorarbeiten bedanken.

Ich danke Wanda Jankowiak, Udo Bartsch (besonders hervorzuheben sind die „Bartsch und Tratsch“ Meetings), Michaela Schweizer und Markus Damme, Jan Sedlacik, Irm Hermans-Borgmeyer, Susanne Fehr, Stefan Höning und Kristin Hartmann (Mauspathologie) für die Mithilfe bei den Projekten.

Ich möchte mich bei allen Labormitgliedern von Margaret Scottie Robinson bedanken, die mich während meines Aufenthalts in Cambridge sehr unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Caro, Sarah, Jessica, Raffaella, Georgia, Mine, Giorgia, Noelia, Johannes, Lisa-Marie, Renata, Sandra und Sandra und alle weiteren Labormitglieder für eine sehr harmonische Arbeitsatmosphäre und viel Spaß während der Arbeit.

Danke Caro und Sarah (die Laborratten) für viele schöne Aktivitäten außerhalb des Labors (Argentinien, Kiez, 90er Party...). Und danke für die Ballspiel-Ablenkungen im Büro (manchmal auch Labor...) während der Schreibphase.

Bei Lisa-Marie und Sarina möchte ich mich für die Mithilfe im Labor bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Eltern, meine Schwestern, Marcel und alle meine Freunde für die Unterstützung in jeder Lebenslage und die immerzu aufmunternden Worte.