

Untersuchungen zu molekularen Veränderungen
der humanen varianten Form der spät infantilen
Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (CLN6) und
des *nclf*-Mausmodells
(*Mus musculus*; Linneaus L., 1758)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt von

Bettina Koch

aus Buchholz in der Nordheide

im Departement Biologie

der Fakultät

für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

an der

Universität Hamburg

Hamburg 2006

Gutachter:

**Prof. Dr. T. Braulke
Prof. Dr. K. Wiese**

Meinen Eltern

Addendum zur Dissertation mit dem Titel:

„Untersuchungen zu molekularen Veränderungen der humanen varianten Form der spät infantilen neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (CLN6) und des *nclf*-Mausmodells (*Mus musculus*: Linnaeus L., 1758)“

Potentiell inkorrekte Zuordnung von Ergebnissen in der oben genannten Dissertation:

Der Hintergrund für eventuell falsch zugeordnete Ergebnisse liegt möglicherweise in der Verwendung von Mäusen mit einem anderen Genotyp, als demjenigen, der den Tieren von der Tierhaltung des UKE-Hamburg Eppendorf zugeordnet wurde. Demnach wurden Experimente möglicherweise nicht mit homozygoten *nclf*-Mäusen durchgeführt, sondern mit *nclf*-Mäusen, in die (versehentlich) eine andere Mauslinie eingekreuzt wurde. Den Experimentator trifft hierbei keine Schuld.

Unter der Leitung von Herrn Prof. Braulke wurden zur Bestimmung des Ausmaßes der Fremdeinkreuzung und zur Eingrenzung des Zeitraums alle noch lebenden Tiere und zur Verfügung stehende DNA und Gewebeprobe mittels PCR auf ihren Genotyp analysiert. Diesen Ergebnissen zufolge ist es möglich, dass unwissentlich für einige der biochemischen Analysen *nclf*-Mäuse eingesetzt wurden, in die ein weiterer Genotyp eingekreuzt war. Nachträglich ist jedoch nicht nachvollziehbar, welche Experimente mit homozygoten *nclf*-Mäusen durchgeführt wurden bzw. bei welchen Experimenten eventuell mit *nclf*-Mäusen mit Fremdeinkreuzungen gearbeitet wurde. Daher könnten einige der erzielten Ergebnisse der oben genannten Doktorarbeit verfälscht sein.

Versicherung:

Hiermit versichere ich, dass ich während meiner Promotion alle Experimente mit dem Wissen durchgeführt habe, rein homozygote *nclf*-Mäuse eingesetzt zu haben und von der Tierhaltung keine Hinweise darauf erhalten habe, dass es zu einer Fremdeinkreuzung gekommen ist.

Ich versichere, dass mir erst nach Abschluss meiner Promotion bekannt wurde, dass eventuell manche *nclf*-Mäuse, die ich während meiner Doktorarbeit für biochemische Experimente eingesetzt habe, durch eine (versehentliche) Fremdeinkreuzung der zentralen Tierhaltung des UKE verändert gewesen sind.

In Absprache mit dem Ombudsman der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Frau Prof. Dr. U. Beisiegel, wurde der Vorgang besprochen, das Addendum verfasst und dem Vorstand des Department Biologie der Universität Hamburg zur Kenntnisnahme am 15.05.2007 zugeleitet.

Dr. rer. nat. Bettina Koch

München, den 04.05.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen	1
1.1.1	CLN6, die spät infantile Variante der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen	5
1.2	Biogenese von Lysosomen	7
1.2.1	Biosyntheseweg der Lysosomen	7
1.2.2	Endocytose-Pathway der Lysosomen	9
2	Zielsetzung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Verwendete Kits	15
3.1.2	Radioaktive Substanzen	15
3.1.3	Plasmide und DNA-Standards	15
3.1.4	Enzyme und Nucleotide	16
3.1.5	Lipide, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards	16
3.1.6	Bakterien- und Hefestämme	17
3.1.7	Zell- und Mauslinien	17
3.1.8	Puffer, Medien und Lösungen	18
3.1.8.1	Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen	18
3.1.8.2	Zellkulturlösungen	18
3.1.9	Antikörper	19

3.1.9.1	Primärantikörper	19
3.1.9.2	Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Substanzen	20
3.2	Molekularbiologische Methoden	21
3.2.1	DNA-Präzipitation mit Ethanol	21
3.2.2	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	21
3.2.3	Enzymatische Modifikation von DNA	21
3.2.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	21
3.2.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten	22
3.2.4	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	22
3.2.4.1	Präparation von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	22
3.2.4.2	Anlegen einer Glyzerolkultur	23
3.2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	23
3.2.5	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	23
3.2.5.1	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	24
3.2.6	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen von Mäusen zur Genotypisierung	24
3.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.2.7.1	Sequenzierung von DNA	25
3.2.8	Das „Yeast Two-Hybrid“-System	25
3.2.8.1	Transformation von Hefen	25
3.2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen	26
3.3	Biochemische Methoden	27
3.3.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	27
3.3.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	27
3.3.3	Proteinfärbemethoden	27
3.3.3.1	Coomassie-Färbung	27
3.3.3.2	Silberfärbung	27
3.3.4	Westernblot-Analyse	28

3.3.5	[¹²⁵ J]-anti Mannose-6-Phosphat-Rezeptor Overlays	28
3.3.6	Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten	28
3.3.7	β -Hexosaminidase-Aktivitätsmessung	29
3.4	Zellbiologische Methoden	30
3.4.1	Kultivierung von Zelllinien	30
3.4.2	Gewinnung primärer Fibroblasten aus Mauslunge	30
3.4.3	Trypsinieren von Zellen	30
3.4.4	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	31
3.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	31
3.4.6	Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵ S]-Methionin	32
3.4.7	Immunpräzipitation von Cathepsin D und β -Hexosaminidase	32
3.4.8	Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie	32
3.4.9	Metabolische Markierung von Zellen zur Untersuchung des Proteinabbaus	33
3.4.10	Endocytose von Arylsulfatase A für die Immunfluoreszenz- Analyse	33
3.4.11	Endocytose von [¹²⁵ J]-Arylsulfatase A und [¹²⁵ J]-proTripepti- dyl Peptidase I	34
3.4.12	Gewinnung [³⁵ S]-markierter Sekrete aus MPR-defizienten Maus- fibroblasten	34
3.4.13	Endocytose von [¹²⁵ J]-Transferrin	35
3.4.14	[¹²⁵ J]-2C2- und [¹²⁵ J]-ASA-Bindungsassay	35
3.4.15	[¹²⁵ J]-2C2-Internalisierungsassay	36
3.4.16	Zelloberflächenbiotinylierung und Präzipitation von biotiny- liertem MPR300	36
3.4.17	Zellpräparation zur Analyse von Inositolphosphaten	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Transport und Prozessierung neu synthetisierter lysosomaler Enzyme	38
4.2	Transport lysosomaler Enzyme im Endocytoseweg	40

4.2.1	Mannose-6-Phosphat-abhängige Endocytose von Arylsulfatase A	40
4.2.2	Mannose-6-Phosphat abhängige Endocytose von proTripeptidyl-Peptidase I	41
4.2.3	Endocytose von Sekreten Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-defizienter Zellen	42
4.2.3.1	Endocytose von holo-Transferrin	44
4.2.4	Mechanismen der Akkumulation endocytierter [¹²⁵ J]-ASA in CLN6-defekten Zellen	45
4.2.4.1	Zelloberflächenkonzentration und Expression des 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR300)	46
4.2.4.2	Internalisierungskinetik des MPR300	49
4.2.4.3	Intrazelluläre Lokalisation endocytierter lysosomaler Enzyme	49
4.2.4.4	Degradation endocytierter lysosomaler Enzyme	54
4.2.5	Protein- und Lipidabbau in CLN6-defekten Zellen	56
4.2.5.1	Allgemeiner Proteinabbau	56
4.3	Einfluss erhöhter Inositolphosphat-Spiegel auf die M6P-abhängige Endocytose	60
4.4	Untersuchung der Gangliosidzusammensetzung im Cortex von <i>nclf</i> -Mäusen verschiedener Altersstufen	62
4.5	Suche nach potentiellen CLN6-Interaktionspartnern mittels des „Yeast two-Hybrid“-Systems	62
4.5.1	„Screen“ einer cDNA-Bank aus humanem Hirn mit einem luminalen CLN6-Fragment	64
5	Diskussion	69
5.1	Biogenese von Lysosomen und lysosomale Funktion bei CLN6-Defekt	69
5.1.1	Biosyntheseweg lysosomaler Hydrolasen	70
5.1.2	Endocytoseweg zum Lysosom	70
5.1.2.1	Endocytose rekombinanter lysosomaler Enzyme ASA und TPP I	71

5.1.2.2	Selektivität der Aufnahme lysosomaler Enzyme . . .	72
5.1.3	Selektive Anreicherung von ASA in CLN6-defekten Zellen . .	72
5.1.3.1	Halblebenszeit rekombinanter lysosomaler Enzyme ASA und TTP I	73
5.1.3.2	Spezifität lysosomaler Dysfunktionen bei CLN6 . . .	74
5.1.3.3	Funktion von CLN6	75
5.2	Molekularer Mechanismus der veränderten Endocytose CLN6-defek- ter Zellen	77
5.2.1	Umverteilung von MPR300 an die Plasmamembran in CLN6- defekten Zellen	78
5.2.2	Einfluss von Inositolphosphaten auf die Endocytose	79
5.3	Akkumulation von Gangliosiden im Cortex von <i>nclf</i> -Mäusen	80
6	Zusammenfassung	83
7	Anhang	85
7.1	Abkürzungsverzeichnis	85
7.2	Oligonucleotide (Primer)	86
7.3	PCR-Programme	87
7.4	Ermittelte cDNA-Klone aus der humanen Hirnbibliothek	88
7.5	Chemikalien und Reagenzien	90
7.6	Geräte	92
7.7	Verbrauchsmaterialien	95
	Literaturverzeichnis	96

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des CLN6-Proteins	6
1.2	Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Endocytose von Ligand-Rezeptor-Komplexen	12
4.1	Synthese und Prozessierung von Cathepsin D in CLN6-defekten humanen und murinen Fibroblasten.	39
4.2	Endocytose von [¹²⁵ J]-Arylsulfatase A (ASA) in CLN6-Patientenzellen und <i>nclf</i> -Fibroblasten.	40
4.3	Endocytose von [¹²⁵ J]-proTPP in CLN6-defekten humanen Fibroblasten.	42
4.4	Endocytose von Sekreten Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR)-defizienter Mausfibroblasten in <i>nclf</i> -Fibroblasten.	44
4.5	Endocytose von [¹²⁵ J]-Transferrin in CLN6-Patientenzellen und <i>nclf</i> -Fibroblasten.	45
4.6	Zelloberflächenkonzentration des MPR300 in CLN6-defekten Zellen.	47
4.7	Expression des MPR300 und MPR46 in CLN6- Patientenfibroblasten.	48
4.8	Internalisierungskinetik des MPR300-Antikörpers in Patientenfibroblasten.	50
4.9	Subzelluläre Verteilung von [¹²⁵ J]-ASA nach Dichtegradienten-Zentrifugation	51
4.10	Intrazelluläre Lokalisation endocytierter ASA.	53
4.11	Prozessierung endocytierter [¹²⁵ J]-proTPP in CLN6-Patientenfibroblasten.	54
4.12	Abbau von internalisierter [¹²⁵ J]-ASA in CLN6-1-Patientenzellen.	55
4.13	Abbau von internalisierter [¹²⁵ J]-TPP I in CLN6-2-Patientenzellen.	56

4.14	Abbau von metabolisch markiertem Protein unter Einfluß von Proteaseinhibitoren in <i>nclf</i> - und Wildtypfibroblasten.	57
4.15	Abbau von Glycoproteinen in <i>nclf</i> -Fibroblasten.	58
4.16	Abbau von [³ H]-Sphingomyelin in CLN6-Patientenzellen.	59
4.17	Expression des IP ₃ -Kinase-EGFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen.	60
4.18	Endocytose von [¹²⁵ J]-Arylsulfatase A (ASA) in HEK293-IP ₃ K-Zellen.	61
4.19	Altersabhängige Expression von Gangliosiden im Cortex von <i>nclf</i> -Mäusen.	63
4.20	cDNA-Fragmente der zur Sequenzierung eingesetzten Klone.	65

Tabellenverzeichnis

1.1	Molekulargenetische Einteilung der NCL-Formen nach Genloki. . . .	3
4.1	[¹²⁵ J]-2C2-Bindung in CLN6-defekten Fibroblasten und Kontrollzellen.	48
4.2	Datenbankanalyse β - und α -Galactosidase-positiver Act 2-Klone I . .	66
7.1	Datenbankanalyse β - und α -Galactosidase positiver pAct 2-Klone II .	88

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) stellen die am weitesten verbreitete Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen im Kindesalter dar. Die NCL sind lysosomale Speichererkrankungen und werden mit einer weltweiten Häufigkeit von 1:12.500 autosomal rezessiv vererbt. Nur eine seltene adulte Form (CLN4, Kufs-Disease) zeigt eine autosomal dominante Vererbung (Goebel & Wisniewski, 2004). Der erste klinische Fall wurde schon 1826 beschrieben (Stengel, 1826). Doch der Terminus Neuronale Ceroid Lipofuszinose wurde erst 1969 eingeführt, um die NCLs von den Gangliosidosen zu unterscheiden. Der NCL-Terminus betont zwei Hauptmerkmale der Krankheit: die Beteiligung von Neuronen und die Eigenschaften des lysosomalen Speichermaterials. Das Speichermaterial ähnelt in seinen histochemischen Färbungseigenschaften und seiner Autofluoreszenz den Lipopigmenten Ceroid und Lipofuscin (Zeman & Dyken, 1969). Die Speicherungen kommen in vielen Geweben und Organen der Patienten vor. Jedoch nur im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Retina werden der Verlust von Neuronen und aktivierte Glia beobachtet. Klinisch äußert sich dies durch eine fortschreitende Neurodegeneration, die zu Gehirnatrophie, Erblindung, Demenz, motorischen Störungen, Krampfanfällen und schließlich zum vorzeitigen Tod der Patienten führt.

Bis 2000 wurden die verschiedenen NCL-Formen auf der Grundlage des Erkrankungsbeginns, der klinischen Symptome und der Ultrastruktur des Speichermaterials in infantile, spät infantile, juvenile, adulte und variante Formen unterteilt (Dyken, 1989). Genetische und biochemische Studien führten jedoch zu einer neuen Einteilung der NCL-Formen auf Grund des betroffenen Genlocus, die mit CLN1-8 bezeichnet werden (Tab. 1.1) (Gardiner, 2000; Mole & Gardiner 2001).

Die Hauptkomponente des Speichermaterials bei nahezu allen NCL-Formen ist die c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (sub c), ein kleines, hochkonserviertes, hydrophobes Protein von 7,5 kDa, das auf Grund seines Lösungsverhaltens in Chloroform-Methanol auch als Proteolipid bezeichnet wird (Hall *et al.*, 1991). Morphologische Studien an *mnd*-Mäusen, einem natürlichen Modell für CLN8, zeigten das Speichermaterial der Neuronen in Autophagosomen (Pardo *et al.*, 1994). Von hier aus, so wird angenommen, gelangt das Speichermaterial in die Lysosomen, in denen es nicht abgebaut werden kann (Faust *et al.*, 1994). Einzig bei CLN1 akkumuliert nicht sub c, sondern die Sphingolipid Aktivator Proteine A und D (Saposin A und D), bei denen es sich um kleine hydrophobe Glycoproteine handelt, die für den lysosomalen Abbau von Sphingolipiden benötigt werden (Tyynela *et al.*, 1993).

CLN1-Gendefekte verursachen die infantile NCL (INCL), die sich im ersten Lebensjahr manifestiert und zum frühen Tod der Patienten in einem Alter von 10-12 Jahren führt. Neben der infantilen Verlaufsform wurden auch vereinzelt Patienten mit spät infantiler, juveniler oder adulter Formen beschrieben (Haltia, 2003; Gobel & Wisniewski, 2004). *CLN1* kodiert für die Palmitoyl-Protein Thioesterase I (PPT I). PPT I wird als Propeptid bestehend aus 306 Aminosäuren am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, anschließend prozessiert, glycosyliert, über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-(MPR)-abhängigen Weg zum Lysosom transportiert und dort zu einer löslichen aktiven 38 kDa-Form gespalten (Camp *et al.*, 1994, Hellsten *et al.*, 1996; Verkruyse & Hofmann, 1996). PPT I hydrolysiert Fettsäureketten (C14-C18) von Cysteinresten postranslational modifizierter Proteine wie Ha-Ras und Peptiden neurospezifischer Proteine wie Gap43, (Camp & Hofmann, 1993, Cho *et al.*, 2000).

CLN2 wird traditionell als klassische spät infantile Form bezeichnet, die sich jedoch auch juvenil manifestieren kann (Wisniewski *et al.*, 2001). Das Gen kodiert für die Tripeptidyl Peptidase I (TPP I), eine lösliche Mannose-6-Phosphat- (M6P)-haltige lysosomale Serinprotease, die als Vorläuferprotein von 563 Aminosäuren am ER synthetisiert, anschließend glycosyliert und im Lysosom zur aktiven 46 kDa-Form prozessiert wird (Lin *et al.*, 2001; Golabek *et al.*, 2003). TPP I katalysiert die Abspaltung N-terminaler Tripeptide von Polypeptiden (Sleat *et al.*, 1997; Vines & Warburton, 1999). *In vivo* Substrat der TPP I ist die sub c (Ezaki *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001). Weitere TPP I-Substrate sind das Neuropeptid Angiotensin II, aber auch neurotoxische Peptide, wie die Substanz P oder β -Amyloid (Junaid *et al.*, 2000; Bernadini & Warburton, 2002; Warburton & Bernadini, 2001).

CLN3, oder Batten Disease, wird durch Defekte im *CLN3*-Gen hervorgerufen. Diese als juvenile NCL bezeichnete Krankheit wird nach den Autoren der ersten Beschreibung auch Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Disease genannt. *CLN3* kodiert ein hy-

Tabelle 1.1: Molekulargenetische Einteilung der NCL-Formen nach Genloki.

Genet. Symbol	Phänotyp (Klinische Bezeichnung)	Genlokus	Genprodukt/Lokalisation	Krankheitsbeginn [Jahre]	Speicher-material
CLN1	Infantil (Harberg-Santavuori-Haltia)	1p32	Palmitoyl-Protein-Thioesterase I (löslich)/Lysosom	0.1-1	SAP A SAP D
CLN2	Klassisch spätinfantil (Bielschowsky)	11p15	Tripeptidylpeptidase I (löslich)/Lysosom	2-8	sub c
CLN3	Juvenil (Batten)	16p11.2-12.1	CLN3, "Battenin" (Transmembranprotein)/Lysosom	4-10	sub c
CLN4	Adult (Kufs)	?	?	11-55	sub c
CLN5	Spätinfantil (finnische Variante)	13q21-q32	CLN5 (löslich)/Lysosom	4-7	sub c
CLN6	Spät infantil (indische und tschechische Variante) Früh juvenil (Lake-Cavanagh)	15q21-23	CLN6 (Transmembranprotein)/ Endoplasmatisches Retikulum	1,5-8	sub c
CLN7	Spätinfantil (türkische Variante)	?	?	1-6	sub c
CLN8	Spät infantil (türkische Variante) nördliche Epilepsie	8p23	CLN8 (Transmembranprotein)/ Endoplasmatisches Retikulum	5-10	sub c

SAP A bzw. D: Saposin A bzw. D; sub c: c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase.

drophobes Protein mit 6-8 Transmembrandomänen und einer molaren Masse von 43 kDa (Janes *et al.*, 1996). In neuronalen und nicht-neuronalen Zellen konnte überexprimiertes sowie endogenes CLN3 in der Leber der Maus in späten Endosomen/Lysosomen nachgewiesen werden (Järvela *et al.*, 1998, Ezaki *et al.*, 2003). In transfizierten primären Neuronen ist CLN3 in frühen Endosomen lokalisiert (Kyttälä *et al.*, 2004). Die Funktion des CLN3-Proteins ist bislang unbekannt. Es wurde jedoch beschrieben, dass CLN3 in den ATP-abhängigen Arginin-Transport involviert sei (Ramirez-Montealegre & Pearce, 2005). Der Transport von CLN3 zum Lysosom erfolgt M6P-unabhängig über ein komplexes Sortierungssignal, dass aus einem neuartigen Di-Leucin Signal (EEEX(8)LI) in der zweiten zytoplasmatischen Schlei-

fe und einem unkonventionellen MX(9)G-Motif im C-Terminus besteht (Storch *et al.*, 2004; Kyttälä *et al.*, 2004). CLN3 weist Homologien zu dem Hefeprotein *btn1* auf, das eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des vakuolären pH in der Hefe spielt (Pearce & Sherman, 1997; Pearce *et al.*, 1999).

Die adulte NCL, **CLN4**, oder Kufs-Disease zeichnet sich im Vergleich zu den anderen NCL-Formen durch einen milden Krankheitsverlauf aus, der hauptsächlich durch starke epileptische Anfälle, Verhaltensstörungen und Demenz charakterisiert ist. Das betroffene Gen konnte noch nicht identifiziert werden (Goebel & Wisniewski, 2004).

CLN5 ist eine seltene, spät infantile Variante der NCL, die vor allem in Finnland vorkommt. *CLN5* kodiert ein glycosyliertes Protein unbekannter Funktion von 407 Aminosäuren mit zwei putativen Transmembrandomänen im N- und C-Terminus, das in nicht-neuronalen Zellen in den Lysosomen lokalisiert ist. Aufgrund der Benutzung verschiedener Methioninreste als Translationsstartsignal soll CLN5 in löslicher (44 kDa, 41 kDa und 39) und membrangebundener Form (47 kDa) vorkommen. Das 47kDa-Polypeptid interagiert mit den NCL-Proteinen CLN2 (TPP I) und CLN3, jedoch nicht mit CLN1. Ferner ist die TPP I Aktivität in Fibroblasten von CLN5-Patienten erhöht (Isosomppi *et al.*, 2002; Vesa *et al.*, 2002).

Der türkischen spät infantilen Variante der NCLs werden Gendefekte im **CLN7** zugrunde gelegt. Bislang konnten weder der Genlocus noch das betroffene Protein identifiziert werden. In einigen der türkischen Patienten wurden Mutationen im *CLN8*-Gen gefunden, die darauf hinweisen, dass die türkische spät infantile Variante allelisch zu CLN8 ist (Mitchell *et al.*, 2001).

Unterschiedliche Mutationen im **CLN8**-Gen rufen zwei Krankheitsbilder hervor: zum einen die türkische spät infantile variante Form mit einem rasch fortschreitenden Krankheitsverlauf und zum anderen eine progressive Epilepsie-Form mit mentaler Retardierung (EPMR), oder „Northern Epilepsy“, die hauptsächlich in der finnischen Bevölkerung vertreten ist und einen sehr milden Phänotyp ausweist (Ranta *et al.*, 1999; Ranta *et al.*, 2004). *CLN8* kodiert für ein 33-kDa-Transmembranprotein, das in nicht-neuronalen Zellen im ER und im ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und in neuronalen Zellen im ER lokalisiert ist (Lonka *et al.*, 2000; Lonka *et al.*, 2004). Auf Grund homologer Domänen wird CLN8 der TLC- (TRAM, Lag1p, CLN8) Protein-Familie zugeordnet, die an der Translokation neusynthetisierter Transmembranproteine in das ER und die Ceramidsynthese beteiligt sind (Winter & Ponting, 2002; Guillas *et al.*, 2003).

Kürzlich wurden Fibroblasten von Patienten mit klinisch juveniler NCL, die jedoch keine Mutationen im *CLN3*-Gen aufwiesen, biochemisch charakterisiert und abnorme Genexpressionsmuster und Ceramidstoffwechselferänderungen festgestellt,

woraufhin ein neuer Gendefekt postuliert wurde, **CLN9** (Schulz *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2006)

Analysen von Tiermodellen lassen vermuten, dass auch Defekte in den lysosomalen Proteinen Cathepsin D, den Chloridkanälen *CLC3* und *CLC7* zu den NCL gerechnet werden müssen (Tyynela *et al.*, 2000; Koike *et al.*, 2000; Yoshikawa, *et al.*; 2002; Kasper *et al.*, 2005)

1.1.1 CLN6, die spät infantile Variante der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen

Mutationen im *CLN6*-Gen verursachen die spät infantile variante Form der NCLs, die jedoch auch in einer früh juvenilen Verlaufsform beobachtet werden kann (Lake-Cavanagh-Disease; Williams *et al.*, 1999). Die Krankheit kann mit 18 Monaten aber auch erst im 8. Lebensjahr beginnen und ist durch progressiven Sehverlust bis zur Erblindung, Krämpfe und den Verlust sämtlicher motorischer Fähigkeiten charakterisiert. Die Patienten versterben häufig in der zweiten oder dritten Lebensdekade und zeigen, abhängig vom Gewebetyp oder Organ, rectilineare, curvilineare und „fingerprint“-Speichermuster der sub c (Goebel & Wisniewski, 2004).

Das humane *CLN6*-Gen ist auf Chromosom 15q23 lokalisiert und kodiert ein 28 kDa nicht-glycosyliertes Protein mit 5 oder 7 Transmembrandomänen (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002). Die Funktion dieses im ER lokalisierten Proteins ist unbekannt und weist keine Homologien zu anderen Proteinen oder funktionelle Domänen auf (Heine *et al.*, 2004, Mole *et al.*, 2004). Der N-Terminus von CLN6 hat eine cytosolische, der C-Terminus eine luminalen Orientierung (Abb. 1.1). CLN6 besitzt zwar typische ER-Retentionssignale im N- und C-terminalen Bereich (Tripel-Arginin Cluster, Di-Leucin und Di-Lysin-Motive), deren Deletion jedoch keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Lokalisation des Proteins hat. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sowohl die N-terminale cytosolische Domäne als auch das distale Paar an Transmembrandomänen Signale enthält, die für die Retention im ER verantwortlich sind (Dr. Heine; persönliche Mitteilung). CLN6 kann Homodimere bilden, nicht jedoch heterodimere Komplexe mit einem anderen ER-lokalisierten NCL-Protein, CLN8 (Heine *et al.*, 2004, Dr. Heine; persönliche Mitteilung). CLN6-Transkripte von 2,4 kb und 3,7 kb wurden in allen Geweben nachgewiesen. Im Skelettmuskel wurden zwei weitere Transkripte von 1,1 kb und 5,9 kb detektiert (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002). Die Aminosäuresequenz des Transmembranproteins ist unter Vertebraten stark konserviert. Die murine und Hunde-Sequenzen sind bis zu 90 %

mit der humanen identisch (Gao *et al.*, 2002; Drögemüller *et al.*, 2005).

Bisher sind 20 verschiedene Mutationen bei CLN6 bekannt, die jedoch auf keine Foundermutationen zurückzuführen sind. Es treten lediglich bestimmte Mutation gehäuft in Familien des gleichen Ursprungs auf, wie z. B. eine 3 bp Deletion, c.460_462del ATC, die zum Verlust der Aminosäure Isoleucin 154 führt (Abb. 1.1) (Teixera *et al.*, 2003, Sharp *et al.*, 2003; Siintola *et al.*, 2005).

Bei Mäusen und Schafen, die natürliche Mutationen im *CLN6*-Gen aufweisen (*nclf* bzw. *OCL6*), treten ähnliche Symptome und Krankheitsverläufe auf wie bei CLN6-Patienten. Das *CLN6*-Homolog der Maus liegt auf Chromosom 9, ist synthenisch zum humanen *CLN6* und kodiert für ein Polypeptid von 308 Aminosäuren. Bei der *nclf*-Maus liegt eine 1 bp Insertion in Exon 4 vor, die zu einem Frame-Shift nach der Aminosäure Prolin 102 und zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führt (Bronson *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2002).

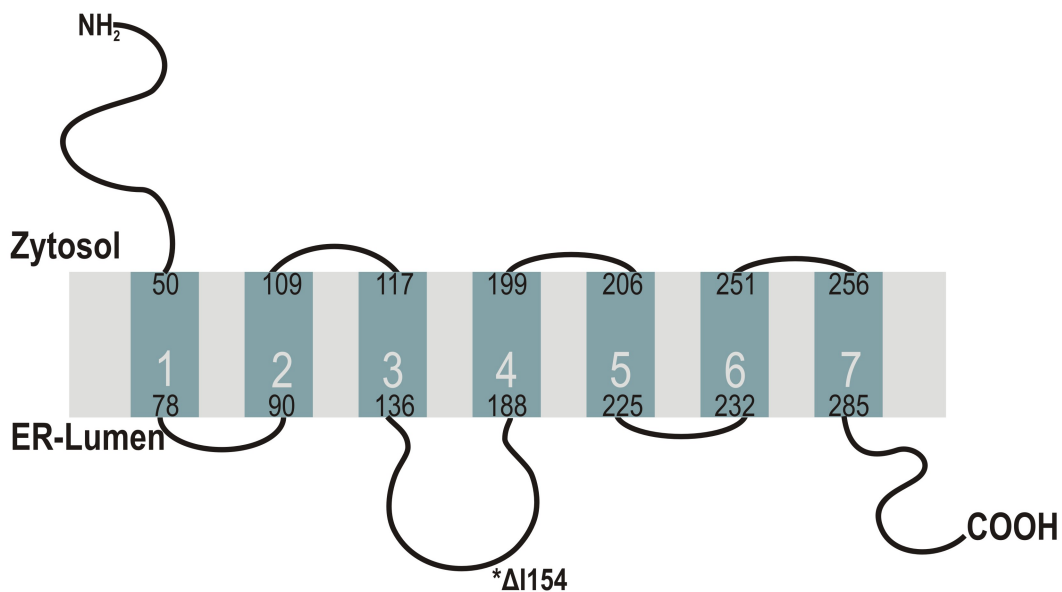


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des CLN6-Proteins. Das Schema zeigt CLN6 mit sieben Transmembrandomänen (1-7). Jeweils die erste und die letzte Aminosäure einer Transmembrandomäne sind nummeriert. Der N-Terminus von CLN6 ist cytosolisch lokalisiert und der C-Terminus im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Die Mutation eines CLN6-Patienten (CLN6-1), eine Deletion eines Isoleucin an Position 154 ist mit einem Stern gekennzeichnet (Wheeler *et al.*, 2002).

Bereits 11 Tage nach der Geburt ist in *nclf*-Mäusen Speicher material in allen Hirnregionen nachweisbar. Ab dem 4. Monat wird die Degeneration der Retina beobachtet und ab dem 6. Monat wächst die Anzahl hypertropher Astrocyten im cerebralen Cortex, Hippocampus, Thalamus und Hirnstamm, was auf eine reaktive Gliose hindeutet. Vom 8. Lebensmonat an treten progressive Lähmungserscheinungen an den Hinterbeinen auf, die sich zu einer kompletten Lähmung ausweiten. Krämpfe, die zum Ende der Krankheit auftreten, führen wahrscheinlich zum vorzeitigen Tod der Tiere mit ca. 12 Monaten (Bronson *et al.*, 1998). Im Hirn von *nclf*-Mäusen wurde die Akkumulation von Dolichol-Pyrophosphoryl Oligosacchariden (Lipid-gebundene Oligosaccharide, LO), Intermediaten des Ceramidstoffwechsels, nachgewiesen, deren Ablagerung auf Defekte im Abbau der LO's zurückzuführen ist (Cho *et al.*, 2005).

Zwei weitere gut beschriebene Tiermodelle für CLN6 sind das aus Neuseeland stammende South Hampshire Schaf und das australische Merino-Schaf, die auch als OCL6 bezeichnet werden (Cook *et al.*, 2002; Jolly *et al.*, 1989). Schon 12 Tage nach der Geburt werden in präsymptomatischen OCL6-Schafen im okzipitalen und somatosensorischen Cortex aktivierte Astrocyten und Anhäufungen aktivierter Microglia nachgewiesen (Oswald *et al.*, 2005). Neurodegeneration und die fortschreitende Astrocytose sind schließlich in den meisten Cortexschichten im Alter von 10 -14 Monaten nachweisbar (Cook *et al.*, 2002; Jolly *et al.*, 1989; Jolly *et al.*, 1999). Auf Verhaltensstörungen, die mit 4-12 Monaten auftreten, folgen Visusverlust, motorische Defizite und der vorzeitige Tod der Tiere im Alter von ca. 27 Monaten (Mayhew *et al.*, 1985, Cook *et al.*, 2002).

Als biochemisches Merkmal CLN6-defekter humaner und oviner Fibroblasten wurde oxidativer Stress beschrieben. Die Expression und Aktivität der Mn^{2+} -abhängigen Superoxid-Dismutase (MnSOD) ist signifikant und spezifisch in den Mitochondrien von Fibroblasten und Hirnmaterial von CLN6-Patienten und des OCL6-Schafs erhöht (Heine *et al.*, 2003).

1.2 Biogenese von Lysosomen

1.2.1 Biosyntheseweg der Lysosomen

Lysosomen sind membranumschlossene Organellen mit einem Durchmesser von 0,25-0,5 μm , in denen Makromoleküle wie Proteine, Lipide, Kohlenhydratverbindungen oder Nukleinsäuren, in ihre Bausteine zerlegt und wiederverwertet werden. Saure Hydrolasen katalysieren den Abbau von Makromolekülen, die aus dem Extrazellulärraum durch Endocytose, durch Fusion mit Phagosomen oder Autophagosomen,

bzw. über den Biosyntheseweg in die Lysosomen gelangen. V-Typ- H^+ -ATPasen halten einen intralysosomalen pH-Wert von < 5 aufrecht. Transporter sorgen für den Rücktransport der Abbauprodukte in das Cytoplasma. Die Lysosomen-assoziierten Membranproteine I und II (LAMP-I und II) und das lysosomale integrale Membranprotein II (LIMP-II) machen mehr als die Hälfte der Proteine der lysosomalen Membran aus. Die luminalen Domänen der Proteine tragen 16-20 N-gebundene und eine variable Zahl O-gebundener Oligosaccharidketten. Die lysosomale Membran dient folglich der Aufrechterhaltung des pH-Gradienten, dem selektiven Transport von Abbauprodukten in das Cytosol und wird durch die hochglycosylierten LAMPs und LIMPs auf der luminalen Seite vor Degradation geschützt (Saftig, 2005).

Mehr als 50 Hydrolasen sind in den geordneten lysosomalen Abbau von Makromolekülen involviert (Storch & Braulke, 2005). Sie werden an den Ribosomen des ER mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die das wachsende Polypeptid in das ER-Lumen dirigiert. Nach Abspaltung des Signalpeptids werden Dolicholphosphat-aktivierte Oligosaccharide co-translational auf Asparaginreste innerhalb einer Konsensussequenz Asn-X-Thr/Ser (X steht für eine beliebige Aminosäure) der neusynthetisierten löslichen lysosomalen Enzyme übertragen und prozessiert. Im Golgi werden einige Oligosaccharide durch Übertragung weiterer Zuckerreste (Galactose, N-Acetylglucosamin, Fucose, Sialinsäure) vom „high-mannose“-Typ zum komplexen Typ modifiziert (Kornfeld & Mellman, 1989). An ausgewählte „high-mannose“-Typ Oligosaccharidketten können in einer zwei-Schritt-Reaktion Phosphatreste von UDP-N-Acetylglucosamin auf die C6-Position bestimmter Mannosereste übertragen werden. Diese Mannose-6-Phosphat (M6P) Erkennungsmarker lysosomaler Enzyme werden im transGolgi-Netzwerk (tGN) von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) erkannt, die die Segregation der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme von der sekretorischen Route vermitteln. Die MPR-Ligand-Komplexe werden anschließend in Clathrin-beschichtete Vesikel verpackt. Nach Entfernung der Clathrinhülle können die Vesikel mit endosomalen Organellen fusionieren. Hier dissoziieren die Ligand-Rezeptor-Komplexe auf Grund des sauren pH-Wertes, der durch ein Zusammenspiel der endosomalen/lysosomalen V-ATPasen und Chloridkanäle wie ClC3 oder ClC7 aufrechterhalten wird (Weisz, 2003; Jentsch *et al.*, 2002). Während die MPR zum tGN rezyklisieren und für neue Transportrunden zur Verfügung zu stehen, gelangen die lysosomalen Enzyme auf einem wenig bekannten Weg in die Lysosomen (Ghosh *et al.*, 2003).

In Säuger-Zellen gibt es zwei Typen von MPR: 46 kDa Kationen-abhängige MPR (MPR46) und 300 kDa Kationen-unabhängige MPR (MPR300) (Ghosh *et al.*, 2003). Beide MPR sind Typ I-Transmembranproteine, die sich voneinander u.a. in ihrer subzellulären Lokalisation und Ligandbindungseigenschaften unterscheiden (Braul-

ke, 1996). So ist z.B. nur der MPR300 in der Lage, M6P-haltige Liganden an der Plasmamembran zu binden und zu internalisieren (Storch & Braulke, 2005). Der kontinuierliche Austausch der beiden Rezeptoren zwischen den subzellulären Kompartimenten wird durch Signalmotive in ihren cytosolischen Domänen gesteuert. Dabei wird die Sortierung der MPR im tGN durch saure Cluster von Aminosäuren und durch Di-Leucin-basierte Motive (Chen *et al.*, 1997; Johnson & Kornfeld, 1992a; 1992b; Chen *et al.*, 1993) vermittelt, während die schnelle Internalisierung der MPR300 von der Plasmamembran von Tyrosin-basierten Sortierungsmotiven abhängt (Jadot *et al.*, 1992). Die Sortierungssignale der cytoplasmatischen Domänen der MPR werden in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten durch cytosolische Adaptorproteine erkannt, die die Verpackung der Rezeptoren in Vesikel und deren Transport zu bestimmten Membranen dirigieren. So erfolgt der Transport der MPR vom tGN zu frühen Endosomen unter Beteiligung des Adaptorproteins-1 (AP-1) und von GGAs („Golgi-localized, γ -ear containing, Arf-binding proteins“), während der retrograde Transport von frühen und späten Endosomen zum tGN durch AP-1/PACS-1 („phosphofurin acidic cluster sorting protein) bzw. TIP47/Rab 9 vermittelt wird. Für die Clathrin-abhängige Internalisierung von MPR300 (oder auch anderer endocytotischer Rezeptoren) ist AP-2 essentiell (Ghosh *et al.*, 2003).

Lysosomale Membranproteine wie LAMPs, LIMPs oder die lysosomale saure Phosphatase (LAP) werden dagegen in M6P-unabhängiger Weise zum Lysosom transportiert. Sie besitzen Tyrosin- und Di-Leucin-basierte Sortierungssignale in ihren cytoplasmatischen Domänen, die den korrekten Transport vermitteln. Der Transport von LAMP I und den LIMPs zum Lysosom kann entweder „direkt“ und AP-3-abhängig über eine intrazelluläre Route erfolgen (Le Borgne *et al.*, 1998; Rous *et al.*, 2002) oder „indirekt“ über die Plasmamembran in AP-2- und Clathrin-abhängiger Weise (Janvier & Bonifacino, 2005).

1.2.2 Endocytose-Pathway der Lysosomen

Ein variabler Teil neusynthetisierter M6P-haltiger lysosomaler Enzyme bindet im tGN nicht an MPR und wird sezerniert. Diese lysosomalen Enzyme können jedoch durch MPR300 an der Zelloberfläche der gleichen oder benachbarter Zellen gebunden, internalisiert und den Lysosomen zugeführt werden (Abb. 1.2). Zwar ist auch der MPR46 an der Zelloberfläche lokalisiert, doch er ist nicht in der Lage, lysosomale Enzyme bei neutralem extrazellulären pH-Wert zu binden (Storch & Braulke, 2005). Die Rezeptor-abhängige Aufnahme der lysosomalen Enzyme und auch anderer Liganden (Transferrin, „epidermal growth factor“ (EGF)) erfolgt durch Clathrin-vermittelte Endocytose. An der Plasmamembran bilden sich entsprechende Rezep-

tor-Ligand-Komplexe, die sich durch laterale Diffusion in der Plasmamembran zu sogenannten „coated Pit“-Bereichen bewegen. „Clathrin coated Pits“ (CcP) entstehen durch Interaktion des Adaptorproteins AP-2 mit dem spezifisch in der Plasmamembran angereicherten Phospholipid, Phosphatidylinositol (4,5) *bis*Phosphat (PI(4,5)P₂), und Clathrin. AP-2 bindet Tyrosin- und Dileucin basierte Signalmotive in den Ligand-Rezeptor-Komplexen von z.B. MPR und Transferrin-Rezeptoren (TFR) und stabilisiert so die CcP. (Abb. 1.2, Schritt 1; Haucke, 2005). Durch Invagination in das Cytoplasma vergrößern sich die CcP und runden sich stetig ab. Das Abschnüren („budding“) der Invaginationsvesikel erfolgt schließlich durch die PI(4,5)P₂-bindende GTPase Dynamin, die in seiner aktiven GTP-gebundenen Form zu ringförmigen Strukturen um die entstehenden Vesikel polymerisiert. Die Hydrolyse des GTP verursacht eine Konformationsänderung, die zum Zusammenziehen der Ringstrukturen und dem Abschnüren („budding“) von Clathrin-beschichteten Vesikeln (CcV-„Clathrin coated vesicles“) führt (Abb. 1.2, Schritt 2; Takei *et al.*, 2005). Kurz nach dem „budding“ wird die Clathrin-Hülle durch die ATPase HSC 70 („heat-shock-cognate 70“) und das Clathrin-bindende Ko-Chaperon Auxilin entfernt (Abb. 1.2, Schritt 3; Gosh *et al.*, 2003; Schu, 2005). Die anschließende Fusion der Vesikel mit frühen endosomalen Kompartimenten wird durch EEA1 („early endosomal antigen“), SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion (NSF) attachment protein (SNAP) receptors) und dem kleinen G-Protein Rab 5 katalysiert (Abb. 1.2 Schritt 4a; Clague, 1999; Woodman, 2000). Rab 5 ist eine der am besten charakterisierten GTPasen, die in ihrer Aktivität neben EEA1 durch weitere Effektoren wie Rabaptin-5, Rabenosyn-5, Rabex-5, Rabphilin 3 aber auch SNARE-Komponenten reguliert wird (Zerial & Mc Bride, 2001). In den frühen endosomalen Kompartimenten werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe für bestimmte Transportrouten sortiert. Z.B. gelangen die TFR-Ligand-Komplexe in Rab 11-positive „recycling Endosomen“, in denen Transferrin sein gebundenes Fe³⁺ abgibt und anschließend als Apo-Transferrin-Rezeptor-Komplex zurück zur Plasmamembran gelangt (Abb. 1.2, Schritt 4b; Zerial & Mc Bride, 2001), während MPR300-Ligand-Komplexe oder monoubiquitinylierte EGF-Rezeptor-(EGFR)-Komplexe für den Transport zu späten endosomalen Kompartimenten innerhalb der früh-endosomalen Membran sortiert werden (Gruenberg & Stenmark, 2005). Die Sortierung der monoubiquitinylierten EGFR, an der das Lipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) beteiligt ist, das in früh-endosomalen Membranen angereichert ist und durch die PI3-Kinase aus Phosphatidylinositol hergestellt wird, ist detaillierter untersucht worden (Behnia & Munro, 2005; Raiborg *et al.*, 2003). Weitere regulatorische Proteine, wie Hrs („hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate“) interagieren wiederum mit PI3P über eine „FIVE“-Domäne (Fab1, YOTB, Vac1 und EEA1). Hrs bindet an der endosomalen Membran monoubiquitinylierte EGFR und initiiert die Rekrutie-

rung multimerer ESCORT- („endosomal sorting complexes required for transport“) Proteinkomplexe (Raiborg *et al.*, 2003; Gruenberg & Stenmark, 2005). Durch Hrs und die ESCORT-Komplexe wird die Bildung intraluminaler Vesikel in Gang gesetzt, in die die monoubiquitinylierten Wachstumshormon-Rezeptoren sortiert werden. An der Entstehung dieser Vesikel sind weiterhin das Phospholipid LBPA („lyso-bisphosphatidic acid“) beteiligt, das in der Membran der intraluminalen Vesikel angereichert ist, und Annexin II, das die Freisetzung der Vesikel in das endosomale Lumen erleichtert (Gerke *et al.*, 2005; Raiborg *et al.*, 2003). Diese multivesikulären endosomalen Kompartimente werden ECV/MVB („endosomal carrier vesicles/ multivesicular bodies“) genannt, bei denen es sich um Intermediate/Transportvesikel zwischen frühen und späten endosomalen Kompartimenten handelt (Abb. 1.2 Schritt 4c; Gruenberg & Stenmark, 2005).

Die ECV/MVB transportieren die MPR300-Ligand-Komplexe, die hauptsächlich in der äußeren Membran verbleiben, und monoubiquitiniertes EGFR in den intraluminalen Vesikeln zu späten endosomalen Kompartimenten (Abb. 1.2 Schritt 5; Gruenberg & Stenmark, 2005). In den späten endosomalen Kompartimenten dissoziieren die lysosomalen Enzyme auf Grund des sauren pH-Werts von den MPR300. Während die Liganden mit den zur Degradation bestimmten monoubiquitinylierten Rezeptoren auf noch unbekannte Weise in die Lysosomen gelangen (Abb. 1.2, Schritt 6), werden die MPR hingegen entweder in Rab9/TIP47-abhängiger Weise zum tGN oder zur Plasmamembran transportiert und stehen dort für neue Transportrunden zu Verfügung (Abb. 1.2 Schritt 7; Storch & Braulke, 2005).

Neben der Clathrin-abhängigen Endocytose gibt es Mechanismen der Clathrin-unabhängigen Aufnahme von Makromolekülen aus dem Extrazellulärraum. Diese Clathrin-unabhängige Endocytose erfolgt über sogenannte Lipid-Raft-Bereiche in der Plasmamembran, bei denen es sich um spezialisierte, dynamische Membranbereiche handelt, die reich an Cholesterol, Glycosphingolipiden und Glycosylphosphatidylinositol- (GPI)-verankerten Proteinen sind (Le Roy & Wrana, 2005). Mittels Clathrin-unabhängiger Aufnahme werden beispielsweise GPI-verankerte Proteine, bakterielle Toxine, die an Glycolipide binden oder Cytokin-Rezeptoren internalisiert (Kirkham & Parton, 2005). Die Lipid-Raft-abhängige Internalisierung lässt sich dabei in Caveolin- und Dynamin-abhängige bzw. -unabhängige Mechanismen einteilen.

Die Caveolin- und Dynamin-abhängige Endocytose ist bisher nur in spezifischen Zelltypen, wie Adipocyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten nachgewiesen worden. Hauptkomponente bei diesem Endocytoseprozess ist das Protein Caveolin, das direkt mit Cholesterol interagiert. Caveolin hat jedoch eher einen stabilisierenden Effekt auf die Caveolin-abhängige Endocytose, da Überexpression dieses Proteins zur Akkumulation von Caveoli an der Plasmamembran führt (Kirk-

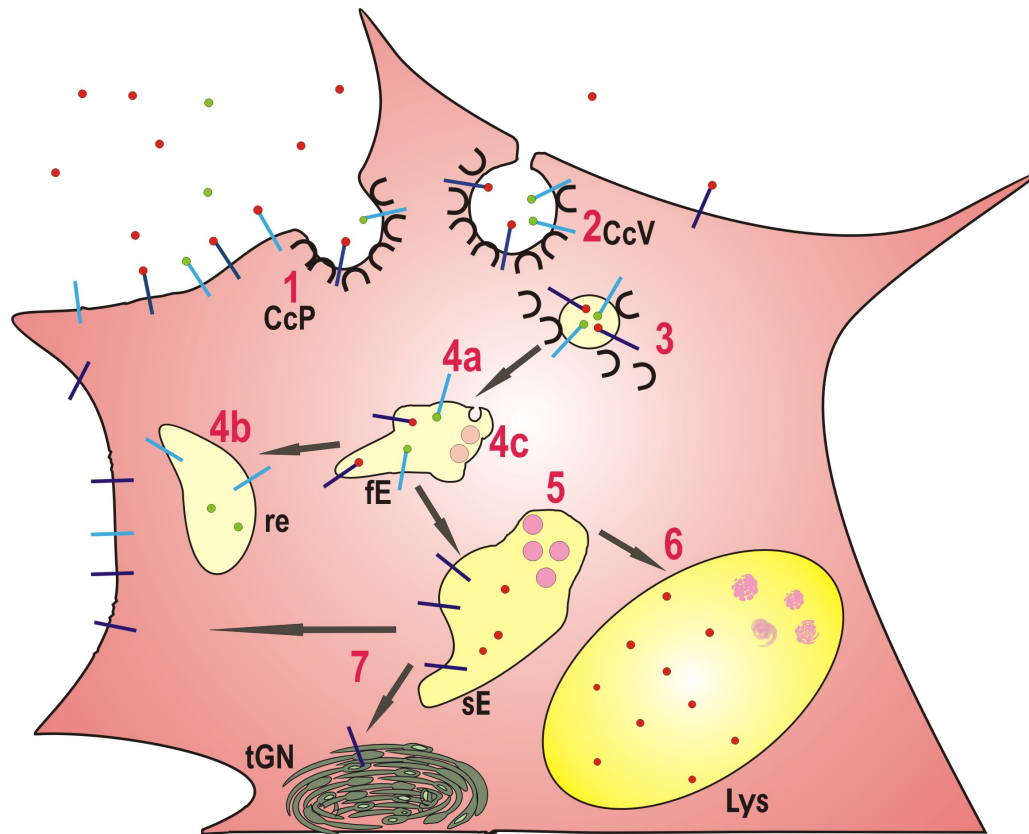


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Endocytose von Ligand-Rezeptor-Komplexen. Die einzelnen Transportschritte sind von 1-8 durchnummeriert. Ligand: \circ , \bullet , Rezeptor: $-$ Clathrin: \cap . Die Ligand-Rezeptor-Komplexe gelangen an der Plasmamembran in Clathrin-beschichtete Bereiche (CcP) (Schritt 1). Von der Plasmamembran lösen sich schließlich Clathrin beschichtete Vesikel ab (Schritt 2), die nach kurzer Zeit ihre Clathrin-Hülle abstreifen (Schritt 3). Nach dem Verschmelzen der Vesikel mit frühen endosomalen Kompartimenten (fE, Schritt 4a), können die Ligand-Rezeptor-Komplexe zu "recycling endosomen" (re; Schritt 4b) transportiert werden, in der äußeren endosomalen Membran verbleiben oder in intraluminale Vesikel sortiert werden (Schritt 4c) Es folgt der Transport zu späten endosomalen Kompartimenten (sE; Schritt 5). Von hier aus können Ligand-Rezeptor-Komplexe a) in Lysosomen (Lys) gelangen und abgebaut werden (Schritt 6). Oder b) Die Ligand-Rezeptor-Komplexe dissoziieren, die Liganden werden in das Lysosom transportiert (Schritt 6) und die Rezeptoren recirculieren zur Plasmamembran oder dem Golgi (Schritt 7).

ham & Parton 2005). Erst durch die Aktivität von Dynamin lösen sich Caveolin-haltige Vesikel. Das Dynamin-abhängige „Budding“ von Caveoli verläuft dabei in Endothelzellen konstitutiv, während es in anderen Zelltypen durch Signale reguliert wird (Oh *et al.*, 1998; Hua *et al.*, 2002). So verhindert die Inhibierung der src Kinase, die Caveolin und Dynamin phosphorylieren kann, die Caveoli-stimulierte Endocytose (Shajahan *et al.*, 2004; Minshall *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel, das für eine hoch regulierte Form der Endocytose spricht, ist die unterschiedliche Aufnahme von TGF β (transforming growth factor β)-Rezeptoren, die über Caveoli erfolgen kann und zur Degradation führt, während der andere Weg unter Beteiligung von Clathrin verläuft und zur Auslösung einer Signalkaskade führt (Di Guglielmo *et al.*, 2003).

Beispiele für die Caveolin- und Dynamin-unabhängige Endocytose sind die Aufnahme des pflanzlichen Toxins Ricin (Llorente *et al.*, 1998), das an Galactosereste von Glycolipiden und Glycoproteinen bindet, von GPI-verankerten Proteinen (Sabharanjak *et al.*, 2002) und des Choleratoxins (Kirkham *et al.*, 2005), das mit dem Gangliosid GM1 interagiert. Nach der Internalisierung sind die Toxine und GPI-verankerten Proteine kurzzeitig in tubulären ringförmigen Kompartimenten nachweisbar, die keine endosomalen Marker enthalten und als „GPI enriched endosomal compartments“ (GEEC) bezeichnet werden. Diese Kompartimente vereinigen sich jedoch wieder mit den endosomalen Kompartimenten des Clathrin-abhängigen Endocytoseweges. (Kirkham & Parton, 2005). Weiterhin gibt es auch Dynamin-abhängige Endocytosemechanismen über Lipid-Rafts, die dennoch Caveolin-unabhängig verlaufen (Sauvonnet *et al.*, 2005).

Kapitel 2

Zielsetzung

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) stellen mit einer Inzidenz von 1:12.500 die am weitesten verbreitete Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen im Kindesalter dar. Die NCL sind lysosomale Speichererkrankungen. Die variante Form der spät infantilen NCL wird durch Mutationen im *CLN6*-Gen hervorgerufen, das für ein polypeptid Membranprotein des ER unbekannter Funktion kodiert. Als Tiermodell für die Krankheit steht die *nclf*-Maus zur Verfügung. Die Ursache für die Akkumulation von Speichermaterial in den Lysosomen CLN6-defekter Zellen, sowie der Pathomechanismus bei der Genese der Krankheit sind unbekannt.

Da es sich bei CLN6 um eine lysosomale Speichererkrankung handelt, liegt der Schwerpunkt der Arbeit auf der Analyse des Biosynthese- und Endocytoseweges lysosomaler Enzyme in CLN6-defizienten Zellen von Patienten und *nclf*-Mäusen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Analyse von Glycolipiden, die bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen. Daher sollte in den Gehirnen von *nclf*- und Kontrollmäusen verschiedener Alterstufen die Konzentration von Glycosphingolipiden (Gangliosiden) untersucht werden. Um potentielle Interaktionspartner des CLN6-Proteins auf der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums zu identifizieren, die Hinweise zur Funktion des CLN6-Proteins oder des Pathomechanismus von CLN6 geben könnten, wurde die dritte luminaire Domäne des CLN6-Proteins im „Yeast Two-Hybrid“-System getestet.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Kits

Folgende Kits wurden verwendet: QIAamp DNA Mini Kit, QIAplasmid Midi Kit, QIAplasmid Mini Kit, QIAquick PCR Purification und QIAquick Spin Gelextraction (Qiagen, Hilden), Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Frankfurt a.M.).

3.1.2 Radioaktive Substanzen

Die verwendeten Substanzen waren [¹²⁵J]-Natriumjodid, trägerfrei in NaOH-Lösung pH 8-12, 100 mCi/ml, D-[2-³H]-Mannose, 10-20 Ci/mmol und [³⁵S]-Methionine, 1000 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). [¹²⁵J]-markierte Antikörper 2C2 und 21D3 wurden von Prof. T. Braulke zur Verfügung gestellt. [³H]-Sphingomyelin wurde in Zusammenarbeit mit Sabrina Jabs und Prof. Marie Vanier von der Universität in Lyon, Frankreich verwendet.

3.1.3 Plasmide und DNA-Standards

Die Vektoren pGBKT7 und pAct2 der Firma Clontech, Heidelberg, wurden von PD Dr. H.-J. Kreienkamp (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die DNA-Standards 1 kb-Ladder und 100 bp-Ladder wurden von Invitrogen, Niederlande, geliefert. Der Vektor pEGFP-C1, der die IP₃-Kinase-cDNA enthält, wurde von Prof. G. W. Mayr zur Verfügung gestellt und stammt von der Firma Clontech, Heidelberg.

3.1.4 Enzyme und Nucleotide

Collagenase III, 171 U/mg	Biochrom AG, Berlin
Dispase I	Roche, Mannheim
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP-Set (ultrapure)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lysozym	Merck, Darmstadt,
Lyticase	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Pfu-Turbo</i> TM -Polymerase	Stratagene, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonucleasen	New England BioLabs
RNase A	AppliChem, Darmstadt
T4-Ligase	New England BioLabs
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.5 Lipide, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards

Humane, rekombinante Arylsulfatase A (ASA)	Prof. T. Dierks, Universität Göttingen
Humane, rekombinante Tripeptidyl Peptidase I (TPP I)	Dr. A. Golabek, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, NY, USA
Humanes LDL	Prof. M. Vanier, Universität Lyon, Frankreich
Humanes Sphingomyelin	Prof. M. Vanier, Universität Lyon, Frankreich
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin A	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor-Cocktail (P-27149)	Sigma-Aldrich
Rainbow TM -coloured Protein-Standard, RPN756V	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Tansferrin	Sigma-Aldrich

3.1.6 Bakterien- und Hefestämme

<i>Escherichia coli</i> TOP10F	Genotyp: Rif ^r , F', <i>proAB</i> , <i>lacI-qzΔM15</i> , Tn10, Tet ^r
AH109; Clontech, Heidelberg (zur Verfügung gestellt von PD Dr. H.-J. Kreienkamp, UKE, Hamburg)	Genotyp: <i>MATa</i> , <i>trp-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> , Ref.: James <i>et al.</i> , 1996

3.1.7 Zell- und Mauslinien

Name	Beschreibung	Referenz
Ko-1	humane Kontroll-Hautfibroblasten M.T.	Prof. A. Kohlschütter, UKE, Hamburg*
Ko-2	humane Kontroll-Hautfibroblasten J.K.	*
CLN6-1	CLN6-Patienten-Hautfibroblasten J.M.	*
CLN6-2	CLN6-defekte Hautfibroblasten von Patient 98RD041	Prof. O. P. van Diggelen, Erasmus University Medical Center, Rotterdam
CLN2	CLN2-Patienten-Hautfibroblasten (A.B.)	*
CLN3	CLN3-Patienten-Hautfibroblasten (Milla)	Dr. J. Tyynela Biomedicum, Helsinki, Finnland
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5 DNA	Graham <i>et al.</i> , 1977
HEK293 IP ₃ K	mit der IP ₃ -Kinase stabil transfizierte HEK293-Zellen	Dr. A. Quitsch, UKE, Hamburg

HEK293 VE-GFP	HEK293-Zellen, die mit dem pEGFP-C1Vektor stabil transfiziert sind	Dr. A. Quitsch, UKE, Hamburg
mpr -/-	Immortalisierte MPR-defiziente embryonale Mausfibroblasten	Dr. T. Lübke, Universität Göttingen
<i>nclf</i> -Mäuse	B6.Cg- <i>Cln6^{nclf}</i> ; Mausstamm mit homozygoter Mutation im <i>CLN6</i> , gezüchtet in der Tierhaltung des UKE, Hamburg	Jackson Laboratories, Maine, USA
CTsD-k.o.-Mäuse (CTsD -/-)	Cathepsin D-defiziente Mäuse im C57Bl6/J10 Hintergrund, zur Verfügung gestellt von Prof. P. Saftig, gezüchtet in der Tierhaltung des UKE	Saftig <i>et al.</i> , 1995
WT	C57Bl6/J10 Kontroll-Mäuse für <i>nclf</i> -Mäuse, gezüchtet in der Tierhaltung des UKE	Jackson Laboratories, Maine, USA

3.1.8 Puffer, Medien und Lösungen

3.1.8.1 Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie die Medien für die Aufzucht von Bakterien wurden gemäß den Instruktionen der „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 1.1.1.1-4 (Ausubel *et al.*, 2000), angesetzt. Puffer, Lösungen und Medien, die für die Aufzucht von Hefen eingesetzt wurden, wurden nach den Protokollen des „MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual“ Appendix A (PT3247, Firma CLONTECH, Heidelberg, 1999) und des „Yeast Protocols Handbook“, Appendix C (PT3024-1, Firma CLONTECH, Heidelberg, 2001) angefertigt.

3.1.8.2 Zellkulturlösungen

„Dulbeccos Modified Eagle Medium“ (DMEM), Optimem-1, DMEM ohne Methionin, RPMI, RPMI ohne Glucose, PBS für die Zellkultur, Trypsin/EDTA-Lösung, Penicillin/Streptomycin und Geneticin wurden von der Firma GIBCO/BRL, Eggenstein, bezogen. Fötale Kälberserum (FKS) wurde von der Firma PAA, Österreich, geliefert.

3.1.9 Antikörper

3.1.9.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung		
			WB/O	IF	IPP
humane ASA	K	Dr. U. Matzner, Universität Bonn	n.g.	1:200	n.g.
humanes Aktin	Z	Santa Cruz, Heidel- berg	1:500	n.g.	n.g.
humanes CtsD	K	Prof. K. von Figu- ra, Universität Göttin- gen	1:500	1:500	1:1000
murines CtsD	K	Claussen <i>et al.</i> , 1997	1:500	n.g.	1:500
humane β -Hexosamini- dase	Z	Hasilik & Neufeld, 1980	n.g.	n.g.	1:500
GM 130	M/mab	Transduction Labo- ratories, USA	n.g.	1:200	n.g.
humanes LAMP-I (H4A3)	M/mab	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA	1:1000	1:100	n.g.
murines LAMP- I (1D4B)	R/mab	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA	1:1000	1:100	n.g.
humane MnSOD	K	Upstate Biotechno- logy, USA	1:500	n.g.	n.g.
humaner MPR300 (2C2)	M	Braulke <i>et al.</i> , 1987	600.000 cpm/ml	n.g.	n.g.
humaner MPR300 (hu Plac)	K	Körner <i>et al.</i> , 1995	1:500	1:200	1:500.
humaner MPR46 (21D3)	M	Breuer <i>et al.</i> , 1997	600.000 cpm/ml	n.g.	n.g.

Ratte MPR300	K	Prof. K. von Figura, Universität Göttingen	1:500	1:100	n.g.
humaner MPR46 (11B5; 21.9.89)	M	Prof. T. Braulke	ng	1:200	n.g.
normales Ziegen- serum		Dako, Carpinteria, CA, USA	n.g.	1:500	n.g.
Präimmenserum	K	Prof. T. Braulke	n.g.	n.g.	1:1000

K: Kaninchen, M: Maus, R: Ratte Z: Ziege, mab: monoklonaler Antikörper, IF: Immunfluoreszenz, IPP: Immunpräzipitation, WB: Westernblot, O: Overlay und n.g.: nicht getestet.

3.1.9.2 Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Substanzen

Antikörper/Verdünnung	Referenz/Firma
Ziege anti Maus IgG, HRP-gekoppelt, 1:2000 im WB	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt, 1:2000 im WB	Dianova
Kaninchen anti Ziege IgG, 1:2000 im WB	Dianova
Ziege anti Ratte IgG, Cy3-gekoppelt, 2:000 in IF	Dianova
Schaf anti Maus IgG, Cy3-gekoppelt, 2:000 in IF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schaf anti Maus IgG, FITC-gekoppelt, 1:100 in IF	Sigma-Aldrich
Ziege anti Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt, 1:100 in IF	Sigma-Aldrich
Schaf anti Maus IgG, Cy3-gekoppelt, 1:2000 in IF	Sigma-Aldrich
Alexa Transferrin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Endocytose	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

(WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt, die NaAc-Konzentration auf 0,3 M eingestellt und mit 2 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte 20 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, 5 min zentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen TE-Puffer bzw. Aqua bidest.. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 31 µg/ml Oligonucleotiden.

3.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

3.2.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische kurze Nucleotidsequenzen und spalten die DNA in diesem Bereich. Um die optimalen Bedingungen für das jeweils benutzte Enzym zu schaffen, wurde einem Restriktionsansatz neben dem Restriktionsenzym und der zu spaltenden DNA der vom Hersteller mitgelieferte 10 x Reaktionspuffer zugegeben. Ein 20 µl Restriktionsansatz wurde beispielsweise wie folgt zusammenpipettiert:

x µl	DNA (ca. 0,1-1 µg)
2 µl	10 x Reaktionspuffer
1-2 µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
x µl	Aqua bidest. (ad 20 µl)

Der Restriktionsansatz wurde für 2–3 h bei 37 °C bzw. bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Um eine Hemmung des Enzyms durch eine zu hohe Glycerinkonzentration zu vermeiden, wurde der Anteil des Restriktionsenzym am Gesamtvolumen des Ansatzes unter 10 % gehalten.

Wenn eine DNA mit zwei Restriktionsenzymen gespalten werden sollte, die verschiedene Reaktionsbedingungen benötigten, so wurde entweder ein Restriktionspuffer ausgewählt, in dem beide Enzyme laut Herstellerangaben noch eine gute Spaltakti-

vität zeigen, oder die DNA wurde zunächst mit dem einen Enzym gespalten, mit 3 Volumen 100 % Ethanol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen und Aufnehmen in Aqua bidest. mit dem zweiten Enzym restringiert.

3.2.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Moleküle miteinander verbunden, beispielsweise bei der Integration eines DNA-Fragmentes in einen Vektor. Ligationen wurden gemäß den Herstelleranweisungen mit dem Quick Ligation™ Kit, New England Biolabs, Frankfurt a.M., durchgeführt.

3.2.4 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemokompetente TOP10- und BL21-*E. coli*-Zellen ($100\text{ }\mu\text{l}$) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Vektor oder einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1,5 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurden $0,7\text{ ml}$ LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 220 rpm geschüttelt. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf einer LB-Agarplatte, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielt, ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Mit je einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikum) angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Präparation der Plasmide und zum Anlegen von Glyzerolkulturen verwendet.

3.2.4.1 Präparation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Die verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

<u>Lösungen:</u>	<u>TfbI:</u>	100 mM	RbCl
		50 mM	MnCl ₂
		30 mM	KAc
		10 mM	CaCl ₂
		15 % (v/v)	Glyzerol
		pH 5,8	mit Essigsäure (0,2 M) eingestellt
<u>TfbII:</u>	10 mM	10 mM	MOPS
		10 mM	RbCl
		75 mM	CaCl ₂
		15 % (v/v)	Glyzerol
		pH 7,0	mit NaOH eingestellt

TfbI und TfbII wurden frisch angesetzt und sterilfiltriert. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie *E. coli* TOP10 F von einer Stammplatte (LB-Agarplatte, ohne Antibiotikum) angeimpft und auf dem Drehrad bei 37 °C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium in einem 1 l Schüttelkolben angeimpft und 2 bis 2,5 h unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur unter Schwenken 10 min in Eiswasser abgekühlt und 5 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 ml TfbI (4 °C) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 4 ml TfbII resuspendiert und in Aliquots zu je 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.4.2 Anlegen einer Glyzerolkultur

Bakterienkulturen mit einer OD₆₀₀ <1 wurden mit 0,25 Volumen Glyzerol (80 %) versetzt und bei -80 °C gelagert. Aus diesen Glyzerolkulturen wurden Vorkulturen direkt angeimpft.

3.2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid Midi- und Minipräparationen wurden mittels des Plasmid Midi Kits (für 20-100 µg DNA) und Plasmid Mini Kits (bis 20 µg DNA) nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

3.2.5 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,5, 20 mM Essigsäure und 2 mM EDTA) im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Zu analysierende Proben wurden mit Ficoll-Marker (0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol; 15 % Ficoll) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera (Olympus, Hamburg) aufgenommen.

3.2.5.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick Spin Gel Extraction Kits nach Anweisung des Herstellers (Qiagen) aus der Agarose extrahiert.

3.2.6 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen von Mäusen zur Genotypisierung

Zur Genotypisierung von CtsD-Knock-out-Mäusen wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse isoliert. Dazu wurden die Schwanzspitzen über Nacht in je 500 μl Lysispuffer (100 mM Tris/ HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA), 10 μl SDS-Lösung (10 % SDS in Aqua bidest.) und 40 μl Proteinase K-Lösung (Merck, Darmstadt, 20 mg/ml in Lysispuffer) unter Schütteln bei 56 °C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 385 μl Isopropanol (100 %) zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 20.800 x g und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 1000 μl Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde das Sediment für 5 min bei 60 °C getrocknet. Die DNA wurde in 100 μl Aqua bidest. aufgenommen und für 30 min bei 37 °C gelöst. Die DNA-Lösung wurde anschließend zur Genotypisierung eingesetzt.

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren (Saiki *et al.*, 1988).

Als Template wurde DNA verwendet, die aus Schwanzspitzen oder Bakterien isoliert worden war. Das dNTP-Set (bestehend aus dATP, dCTP, dTTP, dGTP; je 100 mM; Amersham Pharmacia Biotech) wurde auf 10 mM je Nucleotid verdünnt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler.

DNA-Tem-plate	Primer 3' und 5' (10 pmol/ μl)	dNTP (10 mM je Nucleotid)	10 x PCR-Puffer	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μl)	H ₂ O ad
50 ng	je 1 μl	1 μl	5 μl	1 μl	50 μl

Bei jeder PCR wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Template und eine ohne Oligonucleotid-Primer als Kontrolle mitgeführt.

3.2.7.1 Sequenzierung von DNA

Die automatische Sequenzierung von DNA-Proben erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger *et al.*, 1977. Für eine Sequenzreaktion wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

- x μl Plasmid-DNA (ca. 1 μg)
- 1 μl sequenzspezifischer Primer (10 pmol/ μl)
- 8 μl Big Dye-Terminator-Mix

Der Ansatz wurde mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 20 μl gebracht. Der Big Dye-Terminator-Mix enthielt dNTPs, fluoreszenz-markierte ddNTPs, *Taq*-DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurden nach 5 min Denaturierung bei 96 °C folgende Bedingungen für 25 Zyklen gewählt:

- Denaturierung: 95 °C 10 sec
- Anlagerung („annealing“): 50 °C 5 sec
- Elongation: 60 °C 4 min

Nach der Amplifikation wurde die DNA durch Zugabe von 2 μl 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 50 μl Ethanol (95 %) 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 17.000 x g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde mit 200 μl Ethanol (70 %) gewaschen, nochmals 10 min zentrifugiert und bei 60 °C für 5 min getrocknet, bevor es der Sequenz-Analyse zugeführt wurde.

3.2.8 Das „Yeast Two-Hybrid“-System

Zur Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des CLN6-Proteins wurde das MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 der Firma Clontech, Heidelberg, verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Protokolle des MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual (PT3247, Firma CLONTECH, Heidelberg, 1999) verwendet.

3.2.8.1 Transformation von Hefen

Hefezellen wurden im Rahmen des „Yeast Two-Hybrid“-Systems nach der PEG/LiAc-Methode (Schiestl and Gietz, 1989; Gietz *et al.*, 1991) transformiert.

Für 10 Transformationsansätze (Ko- oder Einzeltransformationen) wurde eine 50 ml ü. N.-Kultur des Hefestamms AH109 in YPD-Medium angelegt. Aus dieser Kultur

wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 50 ml YPD-Medium angeimpft und für 3-4 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 3.000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment in 25 ml sterilem Aqua bidest. resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 3 ml 100 mM Lithium-Acetat für 15 min unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal zentrifugiert und mit 2,4 ml PEG (50 %, in Aqua bidest.), 360 μ l 1 M Lithium-Acetat, 500 μ l Heringssperma-DNA (2 μ g/ μ l) und 340 μ l sterilem Aqua bidest versetzt. Nach Vortexen für 1 min wurden je 360 μ l der Hefe-PEG-Suspension zu 2 μ g Plasmid-DNA gegeben und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 min bei 42 °C. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Sediment in 250 μ l Aqua bidest. resuspendiert. Bei Kotransformationen wurden 250 μ l, bei Einzeltransformationen 50 μ l auf Hefekulturschalen mit SD-Mangelmedium ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 3 bis 5 Tagen bei 30 °C waren Hefekolonien gewachsen, die zu weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden.

3.2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Um Plasmid-DNA aus transformierten Hefen zu gewinnen, wurden zunächst Spheroblasten isoliert. Dazu wurde eine 5 ml ü.N.-Kultur angelegt, die am folgenden Tag 5 min bei 1.500 x g zentrifugiert wurde. Um die Zellwände der Hefezellen zu verdauen, wurde das Hefesediment in 1 ml Sorbitol-Lösung (0,9 M Sorbitol, 0,1 M Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,4 mg/ml Lyticase (Sigma-Aldrich) und 33 μ l/ml β -Mercaptoethanol resuspendiert und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die so entstandenen Spheroblasten wurden bei 1.500 x g für 5 min sedimentiert und in 300 μ l TE (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA) mit 2,5 % SDS resuspendiert. Während der Inkubation bei 65 °C für 20 min wurden die Spheroblasten lysiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und SDS durch Zugabe von 100 μ l 5 M Kalium-Acetat und Inkubation auf Eis (1 h) gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 20.000 x g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 μ l 100 % EtOH versetzt. In der Probe enthaltene DNA wurde für 20 min bei -20 °C gefällt und für 10 min bei 20.000 x g sedimentiert. Die DNA wurde 2 x mit 70 % EtOH gewaschen, für 5 min bei 60 °C getrocknet und in 50 μ l Aqua bidest. aufgenommen. Danach wurde die DNA für 30 min bei 37 °C gelöst und für die Transformation in Bakterien eingesetzt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Erwartete Proteinkonzentrationen von 20–100 μg pro Ansatz wurden nach der Methode von Bradford mittels der Protokoll-Vorlage aus den „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.1.4 (Ausubel *et al.*, 2000), und Proteinmengen unter 20 μg pro Ansatz wurden nach der Methode von Lowry und der Protokoll-Vorlage aus „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.1.5 (Ausubel *et al.*, 2000), bestimmt.

3.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS- PAGE)

Proteine wurden solubilisiert und entsprechend ihrer molekularen Masse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Protokoll aus den „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.2A.4-8 (Ausubel *et al.*, 2000), aufgetrennt.

3.3.3 Proteinfärbemethoden

3.3.3.1 Coomassie-Färbung

Die Anfärbung von Proteinen nach Auftrennung in Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blue wurde für erwartete Proteinmengen von über 1 μg /Bande gemäß den Anleitungen der „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.6.1 (Ausubel *et al.*, 2000), durchgeführt.

3.3.3.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen nach Auftrennung in Polyacrylamid-Gelen erfolgte bei einer erwarteten Proteinmenge von weniger als 1 μg /Bande nach dem Protokoll von Blum *et al.*, 1987.

3.3.4 Westernblot-Analyse

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran geht auf Towbin *et al.*, 1979, zurück und wurde in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) für 90 min bis 5 h bei 900 mA in einer Elektroblo-Apparatur durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer 1 (PBS, 0,1 % Tween-20, 5 % Milchpulver) inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer 1. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 3 x 5 min mit PBS-T (PBS, 0,1 % Tween-20) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockpuffer 1 inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T und PBS je 3 x für 5 min erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch „enhanced chemoluminescence“ (ECL; SuperSignal, Pierce Rockford, IL, USA).

3.3.5 [¹²⁵J]-anti Mannose-6-Phosphat-Rezeptor Overlays

Die Bestimmung der Gesamtzahl des 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors MPR300 erfolgte durch Overlay-Experimente mit [¹²⁵J]-markierten monoklonalen Antikörpern, die gegen den MPR300 (monoklonaler Antikörper: 2C2) gerichtet sind. Hierzu wurden humane Fibroblasten in TBS mit 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % SDS lysiert und 200 µg Zellhomogenat durch SDS-PAGE getrennt. Der Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran erfolgte für 5 h bei 900 mA. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran 2 h bei RT in Blockpuffer 2 (TBS mit 3 % BSA und 0,1 % Tween-20) inkubiert. Die Inkubation mit dem [¹²⁵J]-markierten Antikörper (800.000 cpm/ml) in Blockpuffer 2 erfolgte für 5 h bei RT. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 6 x 10 min mit Waschpuffer (TBS mit 0,1 % Tween-20) gewaschen und getrocknet. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Autoradiographie.

3.3.6 Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten

Zur intrazellulären Lokalisation internalisierter [¹²⁵J]-Arylsulfatase A (ASA) wurden Fibroblasten, die bis zur Konfluenz auf 10 cm Gewebekulturschalen kultiviert wurden, mit [¹²⁵J]-ASA für 30 bis 180 min inkubiert (s. Kap 3.4.11). Nach Entfernen der zelloberflächengebundenen [¹²⁵J]-ASA wurden die Zellen geerntet und in

1.000 μl / 10 cm-Kulturschale eiskaltem Homogenisierungspuffer (4 mM HEPES, 320 mM Saccharose) mit 80 Stempelhüben im Dounce-Homogenisator (Stempel „tight“) aufgebrochen. Das Homogenat wurde 10 min bei 1.020 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Der Gradient bestand aus drei Schichten mit jeweils 1,3 ml 0,8 M, 1 M und 1,2 M Saccharose. Die Auftrennung der subzellulären Organellen erfolgte durch 2-stündige Ultrazentrifugation bei 83.000 x g und 4 °C im SW55-Rotor. Anschließend wurden von dem Gradienten mit einem Fraktionssammler (AUTO DENSI-FLOW, Labconco, OR, USA) Fraktionen á 500 μl von oben abgenommen. Das Pellet des Gradienten wurde in 500 μl Homogenisierungspuffer resuspendiert. Je 50 μl jeder Fraktion wurden auf β -Hexosaminidase-Aktivität untersucht. Die verbleibenden 450 μl jeder Fraktion wurden mit 500 μl 20 % eiskalter TCA versetzt und 2 h auf Eis inkubiert, um in den Proben enthaltenes Protein zu fällen. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 x g für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und im Sediment verbleibende Radioaktivität ($[^{125}\text{J}]\text{-ASA}$) im γ -Counter gemessen. Zur graphischen Darstellung wurde die Radioaktivität jeder einzelnen Fraktion in % von wiedergefundener Gesamtradioaktivität aller Fraktionen angegeben.

3.3.7 β -Hexosaminidase-Aktivitätsmessung

Substratpuffer	10 mM	Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
	100 mM	Na-Citrat pH 4,6
	0,04 %	NaN_3
	0,2 %	BSA
Stopp-Puffer	0,4 M	Glycin/NaOH pH 4,6

Pro Ansatz wurden 50 μl der zu messenden Probe eingesetzt und 50 μl Substratpuffer zugefügt. Es folgte eine Inkubation von 4 h bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stopp-Puffer beendet und die Absorption bei 405 nm gemessen. Zur Quantifizierung der β -Hexosaminidase-Aktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient ϵ von 18.500 berücksichtigt. Zur graphischen Darstellung wurde die Aktivität jeder einzelnen Fraktion in % bezogen auf die im Gradienten vorhandene Gesamtaktivität angegeben.

$$\text{Aktivität [mU/ml]} = \frac{\Delta E_{405} \times \text{Messvolumen[ml]} \times 1000}{\epsilon \times \text{Enzymvolumen} \times \text{Inkubationszeit}}$$

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Humane Hautfibroblasten und murine Lungenfibroblasten wurden in RPMI mit 20 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Alle anderen Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep unter gleichen Bedingungen kultiviert. Mit der IP₃-Kinase stabil-transfizierte HEK293 Zellen wurden in DMEM mit 5 % FKS, 1 % Pen/Strep und 400 µg/ml Geneticin kultiviert.

3.4.2 Gewinnung primärer Fibroblasten aus Mauslunge

Zur Gewinnung primärer Fibroblasten aus Kontroll-, *nclf*- und CtsD-k.o.-Mäusen wurden die Lungen steril entnommen und in sterilem PBS auf Eis gewaschen. Das Lungengewebe einer Maus wurde mit dem Skalpell zerkleinert und für 3 h in 5 ml PBS, 12 U Dispase I und 850 Units Collagenase III unter Schütteln (180 rpm) bei 37 °C dissoziiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 2.000 x g sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 10 ml RPMI mit 20 % FKS und 1 % Pen/Strep resuspendiert und in eine 10-cm-Gewebekulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 x mit PBS gespült und in RPMI mit 20 % FKS und 1 % Pen/Strep für weitere Experimente kultiviert.

3.4.3 Trypsinieren von Zellen

Kultivierte Zellen wurden mit PBS gespült und mit Trypsin, z.B. 0,5 ml Trypsin pro 25-cm²-Flasche, für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Experimente wurden humane Zellen, falls nicht anders angegeben in einer Dichte von 2,5 x 10⁵ Zellen/ 35-mm-Schale und Mauszellen in einer Dichte von 3 x 10⁵ Zellen/ 35-mm-Schale ausgesät. Die Zellen wurden für 2-3 Tage kultiviert bis sie für Experimente eingesetzt wurden.

3.4.4 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Konservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsiniert, in FKS-haltigem Medium aufgenommen und für 5 min bei 1.000 x g sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Einfriermedium (10 % DMSO, 20 % FKS und 1 % Pen/Strep in DMEM) aufgenommen (z.B. 1 ml/ 25-cm²-Flasche) über Nacht bei -80 °C in Einfrier Röhrchen in einem „Nalgene[®] Cryo 1 °C Freezing Container“ (Nalgene, Rochester, NY, USA) eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde ein Einfrier Röhrchen für ca. 1 min bei Raumtemperatur angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 5 ml kaltem DMEM (mit 10 % FKS und 1 % P/S) aufgenommen und die Zellen 5 min bei 1.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

3.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Sterile Deckgläschen wurden in einer 24-Loch-Zellkulturschale ausgelegt. Etwa 500 bis 1.000 Mausfibroblasten wurden über Nacht auf den Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen, mit 1 ml 3 % PFA für 40 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und wieder 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,05 % Triton-X 100 in PBS 3 x für 5 min. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte für 30 min bei RT die Blockierung mit Blockpuffer 3 (PBS mit 2 % BSA oder 2 % Serum der Spezies, in der der sekundäre Antikörper generiert wurde). Die Deckgläschen wurden auf einen Streifen Parafilm gelegt und 50 µl Antikörperlösung in der entsprechenden Verdünnung (siehe Kap 3.1.9) in Blockpuffer 3 für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer zugegeben. Im Anschluß wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Die Bindung der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundäntikörper erfolgte in Blockpuffer 3 für 1 h bei RT unter Lichtausschluß in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Zellen wieder 3 x mit PBS und 1 x mit Aqua bidest. gewaschen, in „DAKO[®]-Fluorescent Mounting Medium“ (Dako, Carpinteria, CA, USA) eingebettet und bei 4 °C für mindestens 16 h gelagert.

Für Kolokalisationsstudien wurden die Zellen simultan mit den jeweiligen Primärantikörpern, die in unterschiedlichen Spezies generiert worden waren, inkubiert. Durch geeignete Wahl der Sekundäntikörper konnten diese spezifisch nachgewiesen wer-

den. Die digitale Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 der Firma Zeiss, Jena, und am konfokalen Laserscanning Mikroskop TCS SL der Firma Leica, Bensheim.

3.4.6 Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵S]-Methionin

Fibroblasten wurden in einer Dichte von $2,5\text{-}3 \times 10^5$ je 35-mm-Zellkulturschale ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Die Zellen wurden 3 x mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit Methionin-freiem DMEM/BSA inkubiert. Anschließend wurden die Fibroblasten für 1 h mit [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium (60 μCi /700 ml Methionin-freiem DMEM/BSA) markiert („Pulse“) und danach direkt geerntet oder nach Austausch gegen 0,7 ml nicht radioaktives Medium (DMEM/BSA mit 0,25 mg/ml Methionin) für 6 h bei 37 °C inkubiert („Chase“). Nach Ende der Chase-Periode wurde das Medium in Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 1.500 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und 560 μl IMM-CD-Puffer (1 % Triton X-100, 0,5 % Na-Desoxycholat, 0,5 %, SDS und 2 % BSA in PBS) und 25 μl 50-fach konzentrierter Proteinase-Inhibitor-Cocktail (IC) zugegeben. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und in 1 ml Lysispuffer (IMM-CD 1:2,25 verd. in PBS) und 20 μl IC abgeschabt. Die Zellextrakte und Chase-Medien wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt.

3.4.7 Immunpräzipitation von Cathepsin D und β -Hexosaminidase

Immunpräzipitationen von lysosomalen Hydrolasen wurden nach Braulke *et al.*, 1990, und Muschol *et al.*, 2002, durchgeführt.

3.4.8 Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie

Um [³H]-, [¹⁴C]- oder [³⁵S]-markierte Proteine in SDS-PAGE-Gelen sichtbar zu machen, wurden die Polyacrylamid-Gele nach dem Protokoll von Bonner und Laskey, 1974, mit PPO (Diphenyloxazol in DMSO) imprägniert. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Cellufan-Folien getrocknet, und die radioaktiv markierten Proteine durch Fluorographie detektiert.

3.4.9 Metabolische Markierung von Zellen zur Untersuchung des Proteinabbaus

Drei Tage vor dem Experiment wurden Fibroblasten in einer 24-Loch-Zellkulturschale in einer Dichte von 1×10^5 Zellen je Loch ausgesät. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Hungermedium I bzw. Hungermedium II inkubiert, bevor das Hungermedium gegen 0,5 ml Markierungsmedium I bzw. II ausgetauscht wurde. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2 für 8 h bei Markierung mit D-[$2\text{-}^3\text{H}$]-Mannose und 16 h bei Markierung mit [^{35}S]-Methionin inkubiert. Zur Bestimmung des Protein- bzw. Glycoproteinabbaus wurde das jeweilige Markierungsmedium abgenommen und gegen Chase-Medium I bzw. II ausgetauscht. Ein Teil der Zellen wurde direkt nach der Markierung, wie bei Saftig *et al.*, 1995 beschrieben, geerntet und Protein-gebundene Radioaktivität nach Trichloressigsäure (TCA)-Präzipitation bestimmt. Der andere Teil der Zellen wurde 3 x mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 0,5 ml Chase-Medium I bzw. II für 2 bis 6 Tage kultiviert, wobei alle zwei Tage das Chase-Medium erneuert wurde. Wenn angegeben, wurde dem Markierungs- und Chasemedium I zusätzlich $50 \mu\text{M}$ Pepstatin A und $100 \mu\text{M}$ Leupetin zugesetzt. Die Abbaurrate wurde als TCA-präzipitierbare Radioaktivität in Prozent vom Ausgangswert („Pulse“) berechnet.

Hungermedium I, [^{35}S]-Methionin:	Methionin-freies DMEM mit 4 % (v/v) dialysiertem FKS (hitze-inaktiviert)
Hungermedium II, D-[$2\text{-}^3\text{H}$]-Mannose:	Glucose-freies RPMI; supplementiert mit 0,5 mM Glucose
Markierungsmedium I, [^{35}S]-Methionin:	Methionin-freies DMEM mit 4 % (v/v) dialysiertem FKS (Hitze-inaktiviert) und $10 \mu\text{Ci}$ [^{35}S]-Methionin/ml
Markierungsmedium II, D-[$2\text{-}^3\text{H}$]-Mannose:	Glucose-freies RPMI; supplementiert mit 0,5 mM Glucose und $30 \mu\text{Ci}$ D-[$2\text{-}^3\text{H}$]-Mannose/ml
Chase-Medium I und II, [^{35}S]-Methionin bzw. D-[$2\text{-}^3\text{H}$]-Mannose:	RPMI/ 5 % FKS/ 1 % Pen/Strep

3.4.10 Endocytose von Arylsulfatase A für die Immunfluoreszenz-Analyse

In 24-Loch-Zellkulturschalen wurden sterile Deckgläschen ausgelegt. Auf diesen Deckgläschen wurden über Nacht etwa 500 bis 1.000 Zellen angezchtet. Anschließend

wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und für 1 h in DMEM/BSA inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Arylsulfatase A (250 mU/ml in DMEM/BSA) für 8 oder 24 h. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse präpariert (s. Kap. 3.4.5).

3.4.11 Endocytose von [¹²⁵J]-Arylsulfatase A und [¹²⁵J]-pro-Tripeptidyl Peptidase I

Rekombinante humane Arylsulfatase A (ASA) bzw. pro-Tripeptidyl Peptidase I (pro-TPP) standen als [¹²⁵J]-markierte Proteine in der Abteilung zur Verfügung. Fibroblasten wurden in einer Dichte von 2,5 bis 3 x 10⁵ Zellen pro 35-mm-Zellkulturschale ausgesät und für 2-3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und für 1 h in DMEM/BSA vorinkubiert. Anschließend wurde den Zellen [¹²⁵J]-ASA oder [¹²⁵J]-pro-TPP I (300.000 cpm in 700 µl DMEM/BSA) für weitere 3 h in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P) (10 mM) zur Aufnahme angeboten. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen auf Eis 5 x mit kaltem PBS gewaschen und oberflächengebundene ASA bzw. pro-TPP durch 2 Waschschriffe mit M6P (2 mM) für 5 min entfernt. Nach 3 weiteren Waschschriffen mit PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt, sedimentiert und solubilisiert. Zellassoziierte Radioaktivität wurde bestimmt und die Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.4.12 Gewinnung [³⁵S]-markierter Sekrete aus MPR-defizienten Mausfibroblasten

MPR-defiziente Mausfibroblasten sezernieren neben den üblicherweise sekretierten Proteinen alle M6P-abhängig transportierten lysosomalen Enzyme in das Kulturmedium. Daher können Sekrete dieser Zellen zu Untersuchungen der M6P-abhängigen Aufnahme lysosomaler Enzyme eingesetzt werden. Zur Gewinnung der [³⁵S]-markierten Sekrete wurden MPR-defiziente Mausfibroblasten in einer 25-cm²-Zellkulturflasche ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und für 1 h mit Methionin-freiem DMEM/BSA inkubiert. Über Nacht wurden die MPR-defizienten Zellen mit 4 ml [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium (100 µCi/ml Methionin-freiem DMEM/BSA) markiert. Diese radioaktiven Sekrete wurden für die darauffolgenden Endocytose-Experimente mit

0,5 mg/ml Methionin supplementiert. *Nclf*- und Kontrollfibroblasten (3×10^5 Zellen/35-mm-Kulturschale) wurden mit 1 ml der [^{35}S]-markierten Sekrete in An- und Abwesenheit von M6P (20 mM) über Nacht inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie in Kap 3.4.11 beschrieben. Die Zellysate wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Zusätzlich wurden einzelne Banden entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Film aus dem Gel ausgeschnitten, solubilisiert und die Radioaktivität durch Flüssigkeits-Szintillationszählung bestimmt.

3.4.13 Endocytose von [^{125}J]-Transferrin

Fibroblasten wurden ausgesät und vorbehandelt wie unter 3.4.11 beschrieben. Für 3 h wurde den Zellen [^{125}J]-holo-Transferrin (300.000 cpm/700 μl DMEM/BSA) in An- und Abwesenheit von einem 100-fachen Überschuss an nicht radioaktiv-markiertem holo-Transferrin (28 μg /700 μl) zur Aufnahme angeboten. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und oberflächengebundenes Transferrin durch 2 Waschschrte für 5 min mit einem sauren Waschpuffer (0,5 M NaCl, 0,2 M HAc, pH 2,5) entfernt und erneut mit PBS gespült. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte wie unter 3.4.11 beschrieben.

3.4.14 [^{125}J]-2C2- und [^{125}J]-ASA-Bindungsassay

Die Zahl der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, die sich an der Zelloberfläche befindet, wurde mit Hilfe [^{125}J]-markierter Liganden dieser Rezeptoren bestimmt. Humane Fibroblasten wurden wie in Kapitel 3.4.11 beschrieben ausgesät und 1 h in DMEM/BSA vorinkubiert. Danach wurden die Zellen auf 4 °C abgekühlt (3 x waschen mit eiskaltem PBS) und für 5 h mit [^{125}J]-2C2 (monoklonaler Antikörper gegen den hMPR300) oder [^{125}J]-ASA bei 4°C mit 600.000 cpm/800 μl in DMEM/BSA/Hepes (DMEM/BSA mit 20 mM Hepes, pH 7,4) bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen 5 x mit kaltem PBS gewaschen und MPR-gebundener [^{125}J]-2C2 bzw. [^{125}J]-ASA durch Waschen mit saurem Puffer bzw. M6P (2 mM) von je 3 x 5 min entfernt. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS wurden die Zellen in 1 ml 1 M NaOH abgeschabt und die zellassoziierte sowie die oberflächengebundene Radioaktivität (saurer „Wash“/M6P-„Wash“) gemessen.

Zur Bestimmung der Gesamtzahl der MPR300 wurden die Zellen zunächst mit DMEM/BSA/Hepes mit 0,1 % Saponin (w/v) bei 4 °C für 45 min permeabilisiert. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit [^{125}J]-2C2-Antikörpern (600.000 cpm/800 μl) in DMEM/BSA/Hepes mit 0,1 % Saponin (w/v). Die Zellen wurden 5 x mit

PBS 0,1 % Saponin gewaschen und in 1 ml 1 N NaOH lysiert. Anschließend wurde die in den Proben enthaltene Radioaktivität bestimmt und auf cpm/mg Protein berechnet.

3.4.15 [¹²⁵J]-2C2-Internalisierungsassay

Der [¹²⁵J]-2C2-Internalisierungsassay zur Bestimmung der Internalisierungskinetik des 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors wurde nach Bräulke *et al.*, 1990, durchgeführt.

3.4.16 Zelloberflächenbiotinylierung und Präzipitation von biotinyliertem MPR300

Eine weitere Methode, um die Anzahl von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren zu bestimmen, die sich an der Zelloberfläche befindet, ist die Biotinylierung von plasmamembranständigen Proteinen. Hierzu wurden Mausfibroblasten in einer Dichte von $3-4 \times 10^5$ Zellen pro 35-mm-Zellkulturschale ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Die Zellen wurden dann 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis 1 h mit EZ-link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin (0,5 mg/ml, Pierce, Rockford, IL, USA) in Phosphatpuffer (10 mM NaP_i, 135 mM NaCl, 10 mM KCl, pH 8) inkubiert. Die Biotinylierungsreaktion wurde durch zwei fünf-minütige Inkubationen mit Stopp-Puffer (20 mM Glycin in Phosphatpuffer) beendet. Ungebundenes Biotinylierungsreagenz wurde durch 4 x Waschen mit Phosphatpuffer entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 800 μl TBS, das 0,1 % Triton X-100 und Protease-Inhibitor-Cocktail enthielt, solubilisiert. Zur Präzipitation der biotinylierten Proteine wurden 60 μl UltraLink® Immobilized Streptavidin Plus (Pierce) zugegeben und die Zellhomogenate über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Das Präzipitat wurde 5 x mit 1 ml TBS, 0,1 % Triton X-100 gewaschen und unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Westernblot für MPR300 analysiert.

3.4.17 Zellpräparation zur Analyse von Inositolphosphaten

Nicht transfizierte und stabil IP₃-Kinase-exprimierende HEK293-Zellen wurden auf 10-cm-Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Die Zellen einer 10-cm-Kulturschale wurden trypsiniert, in vorgewogene Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 1.000 x g sedimentiert und 1 x mit PBS gewaschen. Nachdem das Frischgewicht des Zellpellets bestimmt war, wurden die Zellen durch

Auftauen und Einfrieren in flüssigem Stickstoff in 1 ml TCA-Lösung (8 % TCA, 2 mM EDTA, 1 mM NaF) aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1.500 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Polypropylen-Röhrchen überführt und das Pellet gewogen. Der Überstand, in dem die Inositolphosphate gelöst sind, wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert, um in der Probe enthaltenes Creatin-Phosphat zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben 3 x mit 6 ml wassergesättigtem Diethylether (4 °C) ausgeschüttelt. Hierbei verbleiben die Inositolphosphate (IP) in der wässrigen unteren Phase. Der pH-Wert der Proben wurde kontrolliert und durch Zugabe von 10-15 μ l 1 M Triethanolamin auf pH 6-7 eingestellt. Der restliche Diethylether wurde in einer Speed-Vac verdampft und die Proben eingefroren. Die weitere Analyse zur Identifizierung der IP-Formen wurde von Dr. H. Lin (AG Prof. Dr. G. W. Mayr, UKE, Hamburg) durchgeführt.

Kapitel 4

Ergebnisse

Um zu untersuchen, wie ein ER-residentes Protein lysosomale Funktionen beeinflussen kann, wurde der Transport lysosomaler Enzyme zum Lysosom über den Biosynthese- und Endocytoseweg in humanen und murinen CLN6-defekten Zellen analysiert.

4.1 Transport und Prozessierung neu synthetisierter lysosomaler Enzyme

Der Transport und die proteolytische Prozessierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme im Biosyntheseweg wurde in CLN6-defekten Zellen anhand der Sekretion und proteolytischer Modifikationen der lysosomalen Aspartyl-Protease Cathepsin D (CtsD) untersucht. CtsD wird in humanen Fibroblasten als 53-kDa Vorläuferpolypeptid im rauen ER synthetisiert. Vom neusynthetisierten CtsD-Vorläufer werden 5-15 % sezerniert. Ca. 60–90 min nach der Synthese sind intermediäre 47-kDa-Formen intrazellulär nachweisbar. Die letzte proteolytische Modifikation findet im Lysosom statt und resultiert in einer reifen (maturen) Form, die aus einer leichten Kette (14 kDa) und einer schweren Kette (31 kDa) besteht und durch Disulfidbrücken zusammen gehalten wird (Gieselmann *et al.*, 1983; Gieselmann *et al.*, 1985). Fibroblasten von Patient CLN6-1 und von *nclf*- Mäusen sowie korrespondierende Kontrollzellen wurden für eine Stunde metabolisch mit [³⁵S]-Methionin markiert und entweder sofort oder nach einer 6-stündigen Chase-Phase geerntet. Sowohl aus den Medien als auch aus den Zellextrakten wurde Cathepsin D immunpräzipitiert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Fluorographie nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.1A zu sehen ist, war CtsD in den humanen Fibroblasten nach

einer Stunde Markierung als 53-kDa Vorläufer und als prozessierte 47-kDa intermediäre Form detektierbar. Nach der sechsständigen Chase-Periode ließen sich ca. 3 % des Vorläufer-CtsD aus dem Medium von Kontroll- und Patientenzellen präzipitieren. Der Hauptanteil des zellulären CtsD liegt in beiden Zelllinien als reife 31-kDa-Form vor. Ca. 43 % des neusynthetisierten CtsD sind als intermediäre Form (47 kDa) nachweisbar. Nach metabolischer Markierung (1h) und 6-stündigem Chase wurde Cathepsin D (Ctsd) aus primär kultivierten murinen Kontroll- (WT) und *nclf*-Fibroblasten immunpräzipitiert. Ctsd ist als 46-kDa-Polypeptid nachweisbar (Abb. 4.1B). Ca. 9% des neusynthetisierten Ctsd wurden von Kontroll- (WT) und *nclf*-Zellen in das Medium als 48 bis 51-kDa-Vorläufer sezerniert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Sortierung und Prozessierung von neu synthetisiertem Cathepsin D in CLN6-1-Patienten- und *nclf*-Fibroblasten nicht verändert sind. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei [³⁵S]-Pulse-Chase-Experimenten mit anschließender Immunpräzipitation von β -Hexosaminidase in humanen Fibroblasten erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

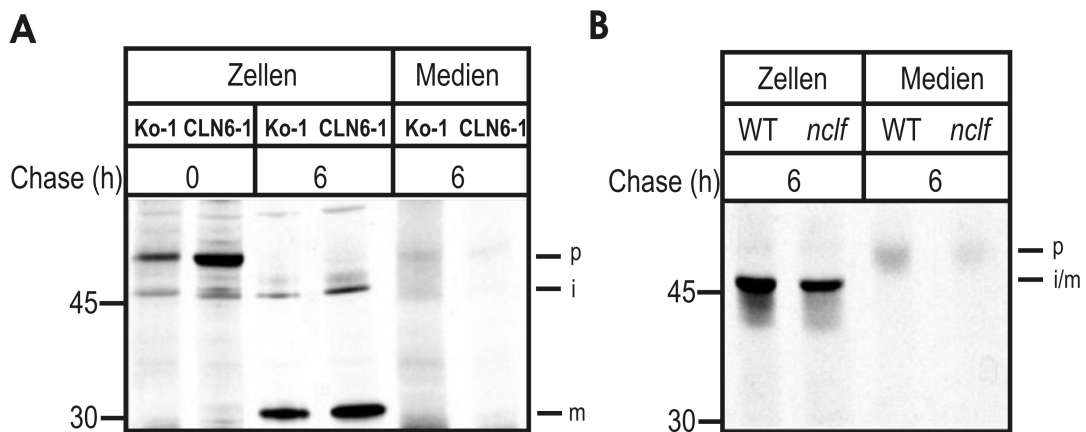


Abb. 4.1: Synthese und Prozessierung von Cathepsin D in CLN6-defekten humanen und murinen Fibroblasten. Konfluente CLN6-defekte humane (A, CLN6-1) und murine (B, *nclf*) Fibroblasten sowie zugehörige Kontrollen (Ko-1 bzw. WT) wurden für eine Stunde mit [³⁵S]-Methionin markiert (85 μ Ci/ml) und entweder sofort geerntet (0) oder einem Chase von 6 Stunden unterzogen. Cathepsin D wurde aus den Medien und den Zellen immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sowie des Vorläufers (p), der intermediären (i) und reifen Form (m) des Cathepsin D sind gekennzeichnet.

4.2 Transport lysosomaler Enzyme im Endocytoseweg

4.2.1 Mannose-6-Phosphat-abhängige Endocytose von Arylsulfatase A

Als Marker lysosomaler Enzyme im Endocytoseweg diente rekombinante, [^{125}J]-markierte Arylsulfatase A ([^{125}J]-ASA). Fibroblasten von Patient CLN6-1 und *nclf*-Mäusen sowie von Kontrollen wurden mit [^{125}J]-ASA in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P) für 3 h bei 37 °C inkubiert. An der Zelloberfläche gebundene [^{125}J]-ASA wurde anschließend bei 4°C verdrängt und internalisierte [^{125}J]-ASA durch SDS-PAGE der Zellextrakte und Autoradiographie detektiert. Abbildung 4.2A zeigt, dass die [^{125}J]-ASA-Aufnahme spezifisch ist und vollständig durch einen Überschuss an nichtradioaktivem M6P gehemmt wird. Die densitometrische Auswertung ergab, dass die CLN6-defekten Fibroblasten von Patient CLN6-1 und Mäusen ca. 250 % der [^{125}J]-ASA akkumulieren verglichen mit Kontrollfibroblasten (Abb. 4.2A). Die aufgenommene Menge an [^{125}J]-ASA war in murinen Fibroblasten höher als in humanen Zellen.

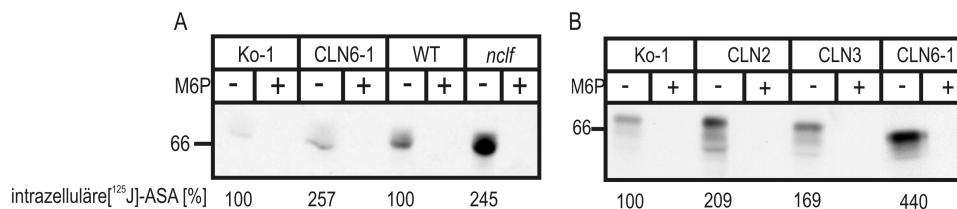


Abb. 4.2: Endocytose von [^{125}J]-Arylsulfatase A (ASA) in CLN6-Patientenzellen und *nclf*-Fibroblasten. Humane CLN6-1- und *nclf*-Fibroblasten (A) und Fibroblasten verschiedener NCL-Formen (CLN2, CLN3, CLN6 = Pat.1) (B) sowie Kontrollfibroblasten (Ko-1/ WT) wurde in An- (+) und Abwesenheit (-) von M6P (10 mM) mit [^{125}J]-ASA (450.000 cpm/ml) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der an die Plasmamembran gebundenen [^{125}J]-ASA wurden die Zellextrakte unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sind gekennzeichnet. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet und als Prozent der [^{125}J]-ASA in Kontrollzellen angegeben.

Um zu bestimmen, ob die Akkumulation von [^{125}J]-ASA CLN6-spezifisch ist, wurden Fibroblasten von CLN2- und CLN3-Patienten parallel untersucht. Die densitometrische Auswertung ergab, dass CLN2-, CLN3- und CLN6-defekte Fibroblasten 210, 170 bzw. 440 % der [^{125}J]-ASA enthielten im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 4.2B).

4.2.2 Mannose-6-Phosphat abhängige Endocytose von pro-Tripeptidyl-Peptidase I

Die Spezifität der Akkumulation internalisierter [^{125}J]-ASA wurde mit einem zweiten lysosomalen Enzym, Tripeptidyl Peptidase I (TPP I), untersucht. TPP I wird als 66-kDa Vorläufer (proTPP I) im rauen ER synthetisiert. Ca. 1 h nach der Synthese sind intermediäre 50-kDa Formen nachweisbar. Im Lysosom erfolgt die finale proteolytische Prozessierung zur reifen Form, die eine molare Masse von ca. 46-kDa besitzt (Ezaki *et al.*, 1999, Golabek *et al.*, 2003). Patientenfibroblasten von CLN6-1 und Kontrollfibroblasten wurden mit rekombinanter [^{125}J]-markierter proTPP I in An- und Abwesenheit von M6P für 2 h und 5 h bei 37 °C inkubiert. An der Zelloberfläche gebundene [^{125}J]-proTPP I wurde anschließend bei 4°C verdrängt und internalisierte [^{125}J]-TPP I durch SDS-PAGE der Zellextrakte und Autoradiographie sichtbar gemacht. [^{125}J]-TPP I wurde entsprechend der Lokalisation auf dem Film aus den Gelen ausgeschnitten und die Radioaktivität bestimmt. Abbildung 4.3A zeigt die Akkumulation des [^{125}J]-TPP I-Vorläufers (p), und der reifen 46-kDa [^{125}J]-TPP I (m) in den Fibroblasten von CLN6-1 und den Kontrollfibroblasten nach 2- und 5-stündiger Endocytose. Die Quantifizierung ergab, dass Kontroll- und Patientenzellen nach 2- und 5-stündiger Endocytose ungefähr gleiche Mengen [^{125}J]-TPP I (p + m) akkumulieren (Abb. 4.3B, Σ Bahn 1/2 bzw. Σ Bahn 3/5). Allerdings sind nach beiden Inkubationszeiten in CLN6-1-Patientenzellen rund 24 % mehr reife [^{125}J]-TPP I nachweisbar als in den Kontrollzellen. Dabei ist die Aufnahme der [^{125}J]-TPP (p + m) zu nur 36 % in den Kontrollfibroblasten (Abb. 4.2B, Σ Bahn 3/4) und zu 43 % in den Patientenfibroblasten (Abb. 4.3B; Σ Bahn 5/6) M6P-hemmbar. Wird nur die Menge reifer [^{125}J]-TPP I (m) nach 5 h Endocytose betrachtet, liegt die Inhibition durch M6P zwischen 60 und 66 % gemessen an der Radioaktivität in der entsprechenden Gelposition (Abb. 4.3B). Weiterhin wird aus Abb. 4.3A und B deutlich, dass in beiden Zelllinien nach 5 h (Abb. 4.3B, Σ Bahn 3/5) ca. 35 % weniger [^{125}J]-TPP I als nach 2 h Endocytose (Abb. 4.3B Σ Bahn 1/2) nachweisbar ist. Der Anteil reifer [^{125}J]-TPP (m) ist nach 2 h so hoch wie nach 5 h Inkubationszeit. Nach 2-stündiger Endocytose beträgt das Verhältnis des [^{125}J]-TPP I-Vorläufers zur reifen Form 70:30 in den Kontrollfibroblasten (Abb. 4.3B, Bahn 1) und 64:36 in den CLN6-1-Fibroblasten (Abb. 4.3B, Bahn 2). Nach 5 h Endocytose hat sich das Verhältnis in

den Kontrollfibroblasten (Abb. 4.3B, Bahn 3) auf 55:45 und in den Patientenfibroblasten (Abb. 4.3B, Bahn 5) auf 45:55 zu gunsten der reifen Form verändert. Das entspricht einer Zunahme der reifen $[^{125}\text{J}]$ -TPP I von 15 % in Kontrollzellen und 19 % in Patientenfibroblasten. Die Daten zeigen 1), dass die Aufnahme/ der intrazelluläre Abbau von $[^{125}\text{J}]$ -TPP I in CLN6-1-Zellen unterschiedlich zu der von $[^{125}\text{J}]$ -ASA ist, und 2), dass nur ca. 40 % der zellassozierten $[^{125}\text{J}]$ -TPP I M6P-inhibierbar sind gegenüber 95 %-iger Inhibition der Aufnahme von $[^{125}\text{J}]$ -ASA (Heine *et al.*, 2004).

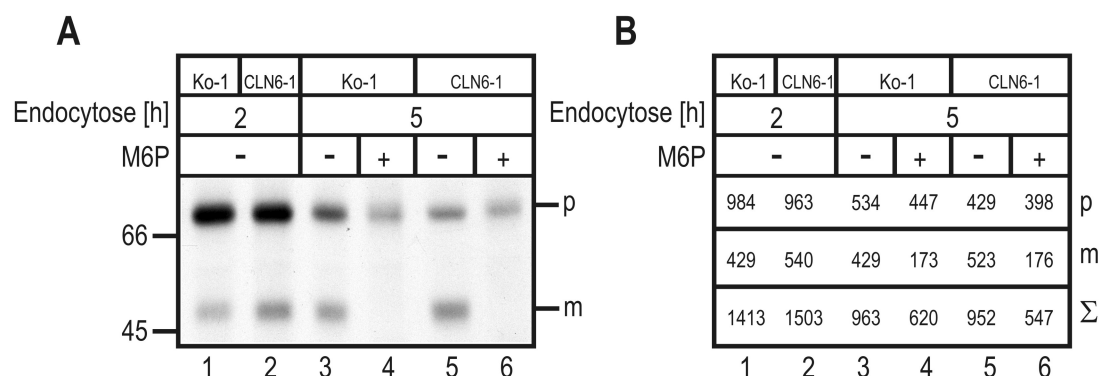


Abb. 4.3: Endocytose von $[^{125}\text{J}]$ -proTPP in CLN6-defekten humanen Fibroblasten. CLN6-1 Fibroblasten und Kontrollfibroblasten wurden in An- (+) und Abwesenheit (-) von M6P (10 mM) mit $[^{125}\text{J}]$ -proTPP I (450.000 cpm/ml) für 2 und 5 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der an die Plasmamembran gebundenen $[^{125}\text{J}]$ -proTPP I wurden die Zellen unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards, des TPP-Vorläufers (p) und der reifen Form (m) sind gekennzeichnet (A). $[^{125}\text{J}]$ -TPP wurden entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Film aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die Radioaktivität quantifiziert. Es wurden die Werte für den $[^{125}\text{J}]$ -TPP-Vorläufer (p), die reife Form (m) und deren Summe angegeben (B). In beiden Abbildungen sind die Laufbahnen von 1-6 durchnummeriert.

4.2.3 Endocytose von Sekreten Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-defizienter Zellen

Um zu bestimmen, ob die Aufnahme/der Abbau einzelner oder aller M6P-haltiger Liganden in CLN6-defizienten Zellen verändert ist, wurden $[^{35}\text{S}]$ -markierte Sekrete aus MPR-defizienten Mauszelllinien gewonnen und danach Kontroll- und *nclf*-Zellen in An- und Abwesenheit von M6P zur Endocytose angeboten. Internalisierte

[³⁵S]-markierte Proteine wurden durch SDS-PAGE der Zellextrakte getrennt und durch Fluorographie detektiert. Zusätzlich wurden einzelne Banden entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Film aus dem Gel ausgeschnitten, solubilisiert und die Radioaktivität durch Flüssigkeits-Szintillationszählung bestimmt. Die Auswertung ergab, dass *nclf*-Fibroblasten in Anwesenheit von M6P (Abb. 4.4A; Bahn 3) 70% mehr Protein akkumulieren als die Kontrollfibroblasten (Abb. 4.4A; Bahn 1). Ohne Zugabe von M6P nehmen *nclf*-Zellen 20 % mehr [³⁵S]-markiertes Protein auf als Kontrollzellen (Abb. 4.4A, Bahn 2/4). Der Vergleich der M6P-unabhängigen Aufnahme mit der M6P-abhängigen ergibt, dass Kontrollzellen 160 % (Abb. 4.3A, Bahn 2/1) und *nclf*-Zellen 80 % (Abb. 4.4A, Bahn 4/3) mehr [³⁵S]-markiertes Protein M6P-abhängig internalisieren. Von den zur Endocytose angebotenen Sekreten (Abb. 4.4A, Bahn 5) haben die Kontrollzellen 0,4 % M6P-unabhängig (Abb. 4.4A; Bahn1) bzw. 1 % M6P-abhängig (Abb. 4.4A; Bahn 2) und die *nclf*-Zellen 0,7 % (Abb. 4.4A; Bahn 3) bzw. 1,3 % (Abb. 4.4A Bahn 4) akkumuliert. In Anwesenheit von M6P (Abb. 4.4A) wurde in beiden Zelllinien ein Polypeptid (1), das zwischen Sammel- und Trenngel detektiert wurde, sowie weitere Polypeptide mit einer molaren Masse von ca. 86 kDa (2), 57 kDa (3), 54 kDa (4) und 43 kDa (5) angereichert. Davon sind die Polypeptide 1, 2 und 5 in Abwesenheit von M6P (Abb. 4.4A, Bahn 2/4) in beiden Zelllinien nachweisbar. Die Polypeptide 1, 3 und 5 sind auch im Sekret (Abb. 4.4A, Bahn 5, Polypeptidbanden 8 und 11) vorhanden. Im Sekret wurden Hauptbanden bei ca. 88 kDa (6), 70 kDa (7), 57 kDa (8), 53 kDa (9), 46 kDa (10), 43 kDa (11) und 38 kDa (12) detektiert. Dabei kommen die Polypeptide 6, 7 und 10 ausschließlich im Sekret vor. Gründe dafür könnten sein, dass diese Polypeptide a) nicht endocytiert werden, b) sehr schnell im Lysosom abgebaut werden, oder c) Vorläuferpeptide lysosomaler Enzyme sind, die zu Formen mit geringerer molarer Masse prozessiert werden. Die Polypeptide 13-21 werden in beiden Zelllinien M6P-abhängig internalisiert. Nach Ausschneiden der Banden 3-21 und Quantifizierung der übriggebliebenen Gelstücke jeder Bahn konnte der prozentuale Anteil der Einzelbanden bestimmt werden (Abb. 4.4B), der zwischen 1,3 % (Polypeptid 16) und 6,8 % (Polypeptid 4) liegt. Die Auftrennung im hochmolekularen Bereich ließ eine genauere Quantifizierung einzelner Banden nicht zu. Die [³⁵S]-markierten Sekrete MPR-defizienter Zellen enthalten M6P-haltige und nicht M6P-haltige Liganden. Letztere werden M6P-Rest-unabhängig durch Pinocytose aufgenommen während M6P-haltige Liganden bevorzugt über MPR internalisiert werden. Deshalb liegt eine höhere Gesamtaufnahme in Abwesenheit von M6P vor (vergleiche Bahnen 1 mit 2 und 3 mit 4, Abb. 4.4A). Es sind keine Unterschiede im Muster der [³⁵S]-Polypeptide in Kontrollzellen im Vergleich mit *nclf*-Zellen detektierbar, aber es bestehen Unterschiede im Vergleich zum Ausgangssekret auf Grund intrazellulärer proteolytischer Prozessierung.

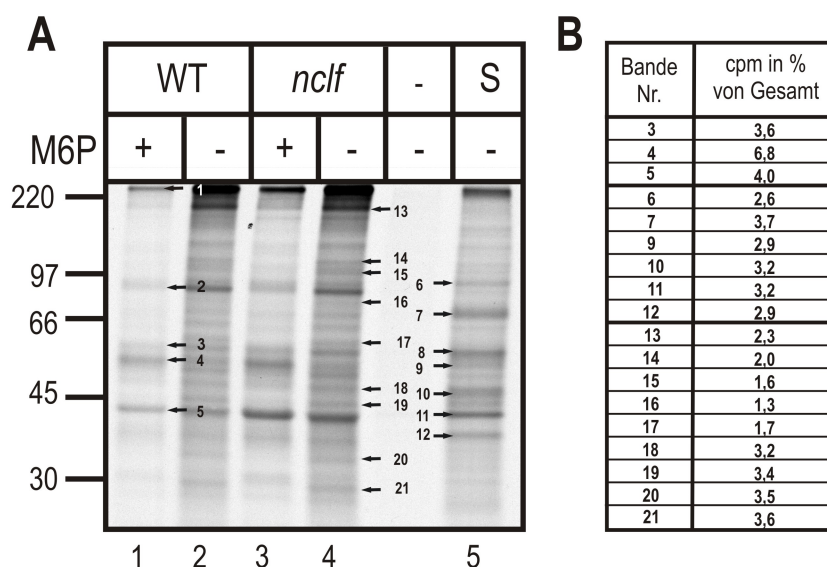


Abb. 4.4: Endocytose von Sekreten Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR)-defizienter Mausfibroblasten in *nclf*-Fibroblasten. A, *nclf*- und Kontrollfibroblasten (WT) wurden in An- und Abwesenheit von M6P (20 mM) mit [³⁵S]-Methionin-markierten Sekreten (S) MPR-defizienter Mauszellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der an die Plasmamembran gebundenen Proteine mit M6P wurden die Zellextrakte (Bahn 1-4) und 1/90 der Sekrete, die pro Ansatz zur Endocytose angeboten wurden (Bahn 5), unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sind gekennzeichnet. B, Die gekennzeichneten Banden 1-21 wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, die Radioaktivität bestimmt und in % der Gesamtradioaktivität pro Bahn dargestellt. Die Banden 1-21 sind a) unter Zugabe von M6P angereichert worden (1-3), b) nur im Sekret vorgekommen (6,7, 9-12), oder c) nur in Abwesenheit von M6P angereichert worden (13-21).

4.2.3.1 Endocytose von holo-Transferrin

Um die Spezifität der rezeptorvermittelten Ligandenendocytose in CLN6-1-Zellen zu bestimmen, wurde die [¹²⁵J]-Transferrin-Endocytose untersucht. Internalisiertes [¹²⁵J]-Transferrin gibt im Recyclingendosom Fe³⁺ ab und wird anschließend als Apo-Transferrin rezeptorabhängig zur Plasmamembran zurücktransportiert und in das Medium entlassen (Ciechanover *et al.*, 1983). Fibroblasten von Patient CLN6-1 und *nclf*-Mäusen sowie Kontrollfibroblasten wurden mit [¹²⁵J]-Transferrin in An- und

Abwesenheit eines Überschusses von nicht radioaktiv markiertem Transferrin für 3 h bei 37 °C inkubiert und das internalisierte [¹²⁵J]-Transferrin durch SDS-PAGE der Zellextrakte und Autoradiographie nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, akkumulieren CLN6-defekte Zellen und Kontrollzellen gleiche Mengen [¹²⁵J]-Transferrin. Die Aufnahme ist spezifisch und lässt sich vollständig durch einen Überschuss an nicht radioaktivem Transferrin inhibieren.

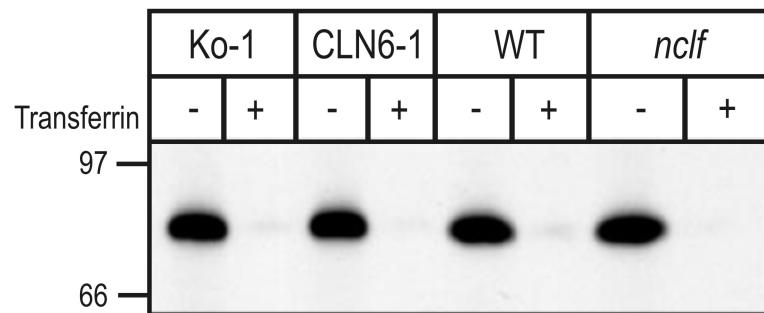


Abb. 4.5: Endocytose von [¹²⁵J]-Transferrin in CLN6-Patientenzellen und *nclf*-Fibroblasten. CLN6-1-Fibroblasten und primär kultivierte *nclf*-Zellen sowie entsprechende Kontrollen (Ko-1, WT) wurden für 3 h bei 37 °C mit [¹²⁵J]-Transferrin in An- (+) und Abwesenheit (-) von nicht radioaktiv markiertem Transferrin inkubiert. Nach Entfernen von Zelloberflächen-gebundenem Transferrin wurden die Zellextrakte unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sind gekennzeichnet.

4.2.4 Mechanismen der Akkumulation endocytierter [¹²⁵J]-ASA in CLN6-defekten Zellen

Die erhöhte Akkumulation von [¹²⁵J]-ASA in CLN6-defekten Zellen kann a) durch eine erhöhte Anzahl von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) an der Zelloberfläche, b) durch eine erhöhte Internalisierungskinetik der MPR, c) durch eine Akkumulation des Enzyms in nicht-lysosomalen Kompartimenten des Endocytoseweges und d) durch einen verminderten Abbau im Lysosom bedingt sein. Im Folgenden werden die verschiedenen Möglichkeiten experimentell untersucht.

4.2.4.1 Zelloberflächenkonzentration und Expression des 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR300)

Die Konzentration des MPR300 in CLN6-defekten Zellen an der Zelloberfläche wurde a) mittels Oberflächenbiotinylierung und b) durch Bindung mit einem [^{125}J]-markierten MPR-Liganden und c) durch Bindung eines spezifischen Antikörpers gegen den humanen MPR300 ([^{125}J]-2C2) bestimmt. Zunächst wurden alle Zelloberflächenproteine von *nclf*- und Kontrollfibroblasten bei 4 °C biotinyliert. Die biotinylierten Proteine wurden anschließend mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und die Präzipitate durch SDS-PAGE und MPR300-Westernblot analysiert. Die densitometrische Auswertung des Blots in Abbildung 4.6A ergibt, dass in *nclf*-Fibroblasten die Konzentration des MPR300 an der Zelloberfläche um 44 % höher ist als in Kontrollfibroblasten. Im zweiten experimentellen Ansatz wurden CLN6-1-Patienten und Kontrollzellen entweder mit [^{125}J]-ASA oder mit [^{125}J]-2C2 bei 4 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur findet kein Austausch von oberflächenlokalisierten MPR mit intrazellulären Rezeptoren statt (Bräulke *et al.*, 1987). Abbildung 4.6B zeigt, dass die Patientenfibroblasten ca. 80 % mehr [^{125}J]-ASA an der Zelloberfläche binden als die Kontrollfibroblasten. Die Bindung von [^{125}J]-2C2 war in CLN6-defekten Fibroblasten um 32 % erhöht im Vergleich zu Kontrollfibroblasten (Abb. 4.6C). Um zu bestimmen, ob die erhöhte Zahl von MPR300 an der Zelloberfläche von CLN6-defizienten Zellen auf eine Umverteilung von MPR300 aus intrazellulären Membranen an die Zelloberfläche bei gleicher Gesamtzahl an Rezeptoren oder durch eine prozentual gleiche Verteilung von MPR300 bei erhöhter Gesamtzahl an Rezeptoren zurückzuführen ist, wurde die Gesamtzahl an MPR300 in CLN6-2 und Kontrollzellen bestimmt.

Dazu wurden entsprechende Zellextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Nitrocellulose wurde kurz unter der Bande des 220 kDa Standards halbiert und die obere Hälfte mit [^{125}J]-markierten 2C2-Antikörpern inkubiert. Parallel wurde die untere Nitrocellulosehälfte zum Nachweis von LAMP-1 (90-110 kDa) im Westernblot als Beladungskontrolle analysiert. Abbildung 4.7 zeigt eine verminderte Expression des MPR300 in den Fibroblasten von Patient CLN6-2 im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten. Der Westernblot gegen das humane LAMP-1 zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

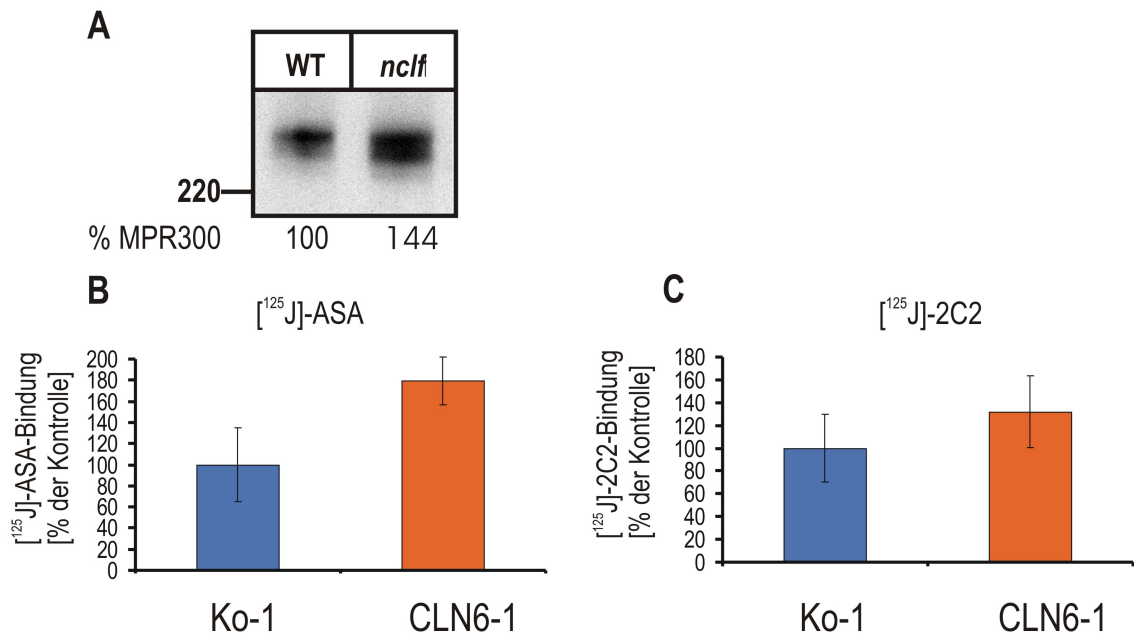


Abb. 4.6: Zelloberflächenkonzentration des MPR300 in CLN6-defekten Zellen. A, *Nclf*- und Kontrollfibroblasten (WT) wurden bei 4 °C mit Biotin markiert und anschließend lysiert. Aus den Lysaten wurden die biotinylierten Proteine mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und die Präzipitate durch SDS-PAGE und MPR300-Westernblot analysiert. Der Westernblot wurde densitometrisch ausgewertet und das Signal in % der Kontrolle angegeben. Die Position des Protein-Standards ist gekennzeichnet. B, C; CLN6-1 und Kontrollfibroblasten (Ko-1) wurden bei 4 °C mit [¹²⁵J]-ASA bzw. [¹²⁵J]-2C2 (750.000 cpm/ml) inkubiert. Durch Inkubation mit M6P bzw. Puffer (pH 2,5) wurden die radioaktiv-markierten Liganden und Antikörper von den Zellen abgelöst und die Radioaktivität bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte der quantitativen Auswertung aus 3 unabhängigen Experimenten.

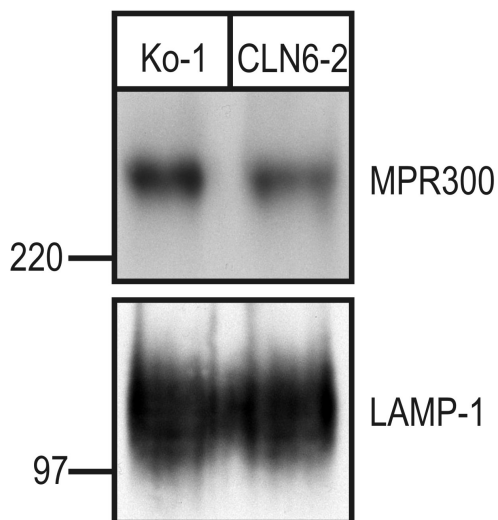


Abb. 4.7: Expression des MPR300 und MPR46 in CLN6- Patientenfibroblasten. Zellextrakte von CLN6-Patient 2 sowie von Kontrolle 1 (Ko-1) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die obere Hälfte (>220 kDa) mit $[^{125}\text{J}]$ -markierten Antikörpern gegen den MPR300 (600.000 cpm/ml) inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde getrocknet und durch Autoradiographie analysiert. Der Einsatz gleicher Proteinmengen ist durch LAMP-1 Westernblot der unteren Hälfte (<220 kDa) der Nitrocellulose-Membranen dargestellt. Die Positionen des Protein-Standards sind gekennzeichnet.

In einem zweiten Ansatz wurde die Gesamtzahl der MPR300 in Fibroblasten der Patienten CLN6-1 und CLN6-2 sowie von zwei Kontrollen (Ko-1 und Ko-2) durch Bindung des jodierten 2C2-Antikörpers in Gegenwart von Saponin bestimmt (Tab. 4.2.4.1). Die Auswertung ergibt, dass keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl der MPR300 in CLN6-defekten Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen vorliegen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die erhöhte Zahl an MPR300 in CLN6-Patientenzellen auf eine Umverteilung von MPR300 an die Zelloberfläche zurückzuführen ist.

Tabelle 4.1: $[^{125}\text{J}]$ -2C2-Bindung in CLN6-defekten Fibroblasten und Kontrollzellen.

	[cpm/mg Protein]
Ko-1	2407 +/-315
Ko-2	1629 +/-312
CLN6-1	1430 +/-412
CLN6-2	1657 +/-100

Ko-1/-2: Kontrolle-1 bzw. -2; CLN6-1/-2: CLN6-1- bzw. -2- Patientenzellen ($n = 2 - 3$)

4.2.4.2 Internalisierungskinetik des MPR300

Zur Bestimmung der Internalisierungskinetik wurden Patienten- und Kontrollfibroblasten bei 4 °C mit [¹²⁵J]-markierten MPR300 Antikörpern (2C2) inkubiert. Eine Probe wurde gleich nach der Inkubation abgeerntet und entspricht dem $t = 0$ -Wert. Ca. 60 % der zellassozierten Radioaktivität waren zu diesem Zeitpunkt durch einen sauren Waschschritt (pH 2,5) entfernbar. Die restlichen 40 % müssen als unspezifische, säure-resistente Bindung/freies [¹²⁵J] angesehen werden. Um diesen Wert sind alle anderen Messdaten korrigiert. Die übrigen Proben wurden für verschiedene Zeiten auf 20 °C erwärmt und anschließend die Radioaktivität im Medium, an der Zelloberfläche und die pH 2,5-resistente internalisierte Radioaktivität bestimmt. Die Zelloberflächen-gebundene und intrazelluläre Radioaktivität wurden als Prozent der Gesamt-Radioaktivität pro Zeiteinheit dargestellt. Abbildung 4.8A zeigt das Verschwinden von MPR300-Antikörpern von der Zelloberfläche. Innerhalb der ersten 5 min ist die Internalisierung fast vollständig abgeschlossen und nähert sich asymptotisch einem Wert um 20 % der Gesamtradioaktivität an. Es sind keine Unterschiede in der Internalisierungskinetik des MPR300 Antikörpers zwischen Kontrollen und CLN6-defekten Fibroblasten messbar. Abbildung 4.8B zeigt die Menge der internalisierten MPR300-Antikörper. Nach 20 min sind etwa 35 % der Antikörper internalisiert. Nach 30 min sinkt der intrazellulär detektierbare Anteil an MPR300-Antikörpern in den Kontrollzellen auf 25 %, während in CLN6-1-Zellen noch Antikörper akkumulieren und 45 % der Gesamtradioaktivität ausmachen.

4.2.4.3 Intrazelluläre Lokalisation endocytierter lysosomaler Enzyme

Um zu untersuchen, ob die internalisierte [¹²⁵J]-ASA in CLN6-defizienten Zellen in den Lysosomen oder endosomalen intermediären Kompartimenten akkumuliert, wurde Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Kontroll- und *nclf*-Fibroblasten wurden 30, 60 und 180 min bei 37 °C mit [¹²⁵J]-ASA inkubiert. Oberflächengebundene [¹²⁵J]-ASA wurde verdrängt und die Fibroblasten homogenisiert. Der postnucleäre Überstand wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (1,2-0,8 M) aufgetragen und in einem „Swing-out“-Rotor zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Dichtegradienten von oben nach unten fraktioniert (10 Fraktionen). Die β -Hexosaminidase-Aktivität als lysosomaler Marker, der Brechungsindex und die Verteilung der [¹²⁵J]-ASA in den einzelnen Fraktionen wurden gemessen. Die β -Hexosaminidase-Aktivität war in Kontroll- und *nclf*-Fibroblasten zu je ca. 20 % in den Fraktionen 2 und 3 (Endosomen, Golgi, Plasmamembran) und zu ca. 40 % in Fraktion 10 lokalisiert (Lysosomen). Der Brechungsindex beginnt in Fraktion 1 und 2 mit einem Wert um 1,3530 nD und steigt dann kontinuierlich auf 1,390 nD

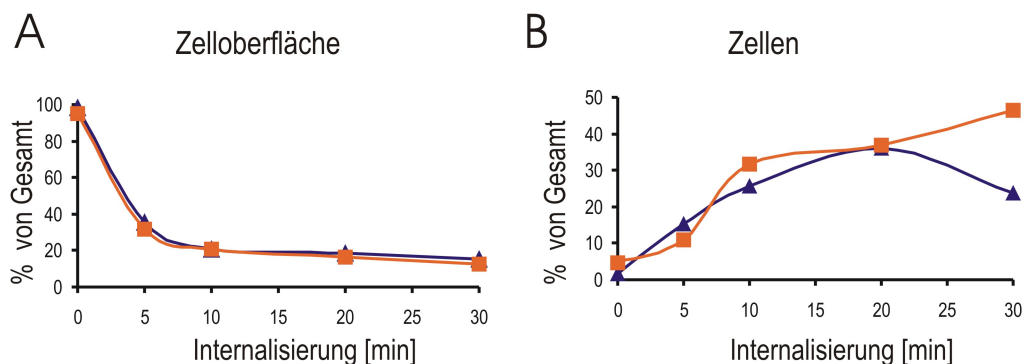


Abb. 4.8: Internalisierungskinetik des MPR300-Antikörpers in Patientenfibroblasten. CLN6-1- (■) und Kontrollfibroblasten (▲) wurden bei 4 °C mit [¹²⁵J]-2C2-Antikörper (750.000 cpm/ml) inkubiert. Oberflächen-gebundene Antikörper wurden entweder gleich entfernt ($t = 0$) oder die Zellen 5-30 min anschließend auf 20 °C erwärmt. Die in das Medium dissoziierten [¹²⁵J]-2C2-Antikörper, die an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper, die durch einen sauren Waschschrift (pH 2,5) entfernt werden konnten, und die säure-resistente, internalisierte Radioaktivität wurden bestimmt und die Summe = 100 % gesetzt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ waren bereits 40 % der detektierten Radioaktivität nicht durch einen sauren Waschschrift entfernbare. Diese Bindung wird als unspezifisch angesehen und alle übrigen Messwerte sind um diesen Wert korrigiert. Die Grafiken zeigen die Zelloberflächen-gebundene (A) bzw. intrazelluläre Radioaktivität (B) als Prozent der insgesamt detektierten Radioaktivität pro Zeiteinheit.

an (Abb. 4.9A). Abbildung 4.9B bis 11D zeigt die Aufnahme und Verteilung von [¹²⁵J]-ASA im Gradienten nach 30, 60 und 180 min. Nach 30 min Internalisierung sind in Kontrollzellen 20 % und *nclf*-Zellen 23 % der Radioaktivität in Fraktion 2 nachweisbar, während in der 3. Fraktion 6,5 bzw. 10% [¹²⁵J]-ASA in Kontrollzellen bzw. *nclf*-Zellen enthalten sind. In den Kontrollzellen sind 10 % [¹²⁵J]-ASA in Fraktion 7 lokalisiert, während in den *nclf*-Zellen nur 2,5 % detektiert werden. Weiterhin akkumulieren in beiden Zelllinien 30 % der [¹²⁵J]-ASA in Fraktion 10. In den übrigen Fraktionen (4-6, 8 u. 9) sind je nur ca. 2-4 % Radioaktivität detektierbar (Abb. 4.9B). Abbildung 4.9C zeigt, dass nach 60 min Internalisierung in der 2. Fraktion 17 % Radioaktivität in beiden Zelllinien nachweisbar sind. In Fraktion 7 sind in den *nclf*-Zellen 7 % Radioaktivität nachweisbar, während die Menge an [¹²⁵J]-ASA in Kontrollzellen auf 4 % sinkt. Der Gehalt an [¹²⁵J]-ASA in Fraktion 10 steigt auf ca. 36 % in beiden Zelllinien an. Nach 180 min [¹²⁵J]-ASA-Endocytose (Abb. 4.9D) sinkt der [¹²⁵J]-ASA Gehalt in Fraktion 2 auf ca. 15 % in *nclf*- und Kontrollzellen.

Fraktion 3 enthält 10 bzw. 6 % $[^{125}\text{J}]$ -ASA in Kontroll- bzw. *nclf*-Fibroblasten. In Fraktion 4-6 sowie 8 und 9 sind zwischen 2 und 3 % Radioaktivität in beiden Zelllinien detektierbar, während in Fraktion 7 4 % bzw. 7 % in Kontroll- bzw. *nclf*-Zellen nachgewiesen wurden. Ca. 59 % Radioaktivität akkumulieren bei beiden Zelllinien in Fraktion 10 nach 180 min.

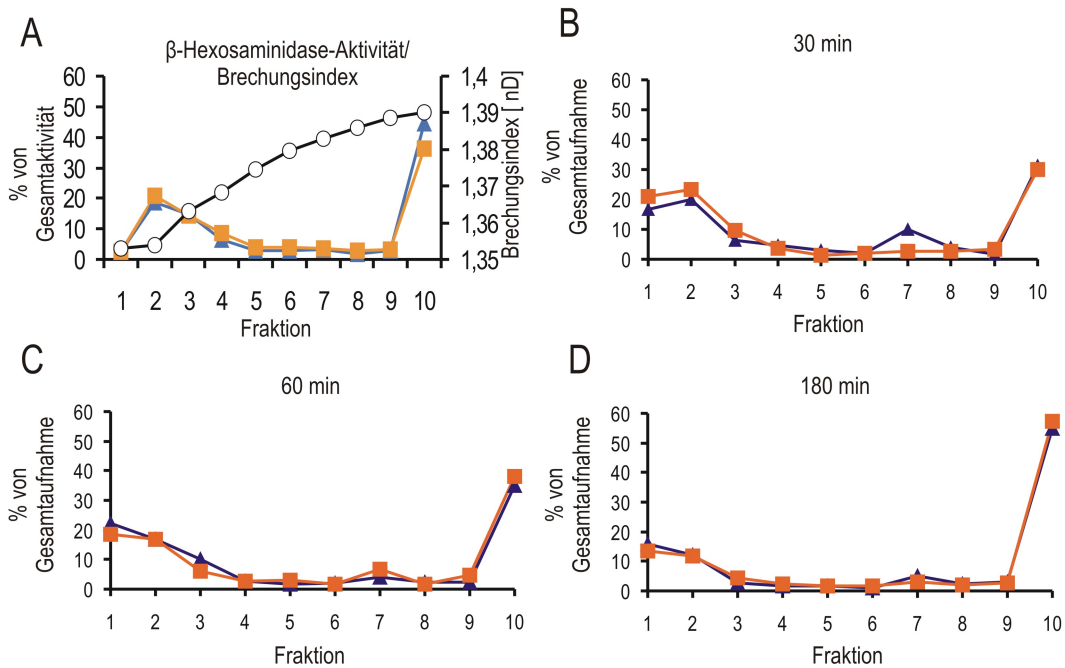


Abb. 4.9: Subzelluläre Verteilung von $[^{125}\text{J}]$ -ASA nach Dichtegradientenzentrifugation. *Nclf*- (■) und Kontroll-Fibroblasten (WT; ▲) wurden bei 37 °C für 30 (B), 60 (C) und 180 min (D) mit $[^{125}\text{J}]$ -ASA (850.000 cpm/ml) inkubiert. An der Zelloberfläche gebundene Liganden wurden verdrängt und ein postnucleärer Überstand hergestellt. Dieser wurde auf einen dreistufigen Saccharose-Gradienten (1,2; 1,0; 0,8M Saccharose in Aqua bidest) aufgetragen und für 2 h bei 83.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Fraktionen 1 (oben) bis 10 (unten) abgenommen und β -Hexosaminidase-Aktivität sowie der Brechungsindex (○) bestimmt (A). $[^{125}\text{J}]$ -ASA wurde in jeder Fraktion gemessen (B, C und D). β -Hexosaminidase-Aktivität und $[^{125}\text{J}]$ -ASA in den einzelnen Fraktionen sind als Prozent der Gesamtaktivität bzw. der $[^{125}\text{J}]$ -ASA-Radioaktivität im Gradienten und der Brechungsindex dargestellt.

Die intrazelluläre Lokalisation endocytierter ASA wurde außerdem mittels Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden primär-kultivierte Fibroblasten von *nclf*- und Kontroll-Mäusen auf Deckgläschen ausgesät und humane rekomb-

binante ASA für 8 h bei 37 °C zur Endocytose angeboten. Die Lokalisation der ASA wurde anschließend mit Antikörpern gegen humane ASA (Abb. 4.10A, grün; Abb. 4.10B, rot) sowie Maus-spezifischen Antikörpern gegen LAMP-1 (Abb. 4.10A, rot) und MPR46 (Abb. 4.10B, grün) inkubiert. Die Überlagerungen der Färbungen in Abbildung 4.10A zeigen, dass endocytisierte ASA (grün) und LAMP-1 (rot) in Kontroll- und *nclf*-Zellen kolokalisieren (gelb). Dagegen zeigen die Überlagerungen der Färbungen gegen endocytisierte ASA (rot) und MPR300 (grün) in Abbildung 4.10B keine Kolokalisation, was eine endosomale Lokalisation der endocytisierten ASA ausschließt, da der MPR46 nicht in die Lysosomen gelangt (Storch & Bräulke, 2005).

In einem dritten unabhängigen Ansatz wurde die intrazelluläre Lokalisation und proteolytische Prozessierung der endocytisierten lysosomalen Tripeptidylpeptidase I (TPP I) untersucht. Die Prozessierung der proTPP I (68 kDa) zur reifen TPP I (46-48 kDa) erfolgt im Lysosom (Golabek *et al.*, 2003). CLN6-1- und Kontrollfibroblasten wurden mit [¹²⁵J]-proTPP I für 30 min oder 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Verdrängung oberflächengebundener [¹²⁵J]-proTPP I wurden die Zellen solubilisiert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die internalisierte [¹²⁵J]-proTPP I wurde anschließend durch Autoradiographie detektiert (Abb. 4.11A). Zusätzlich wurde [¹²⁵J]-TPP I (Vorläufer und prozessierte Form) entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Film aus dem Gel ausgeschnitten und quantifiziert (Abb. 4.11B). Nach 30 min Endocytose sind in den CLN6-2 Zellen 30 % mehr [¹²⁵J]-TPP I nachweisbar als in den Kontrollzellen (Abb. 4.11B, Σ Bahn 1 und 2). Davon sind in den Kontrollzellen 18 % (Abb. 4.11B; Bahn 1) und in CLN6-2-Zellen 19 % (Abb. 4.11B, Bahn 2) zur reifen Form prozessiert worden. Nach 2 h Endocytose sind in den CLN6-defekten Zellen 26 % [¹²⁵J]-TPP I mehr als in den Kontrollzellen (Abb. 4.11B, Σ Bahn 3 und 4). In Kontroll-Fibroblasten sind nach dieser Zeit 28 % (Abb. 4.11B, Bahn 3) und in CLN6-2-Zellen 30 % (Abb. 4.11B, Bahn 4) reife TPP I gebildet worden. In beiden Zelllinien ist der Anteil des [¹²⁵J]-TPP I-Vorläufers nach 2 h Endocytose nahezu unverändert im Vergleich zur Aufnahme nach 30 min (Abb. 4.11B, Bahn 1 und 3 bzw. 2 und 4, p). Dagegen nimmt der Anteil reifer TPP I innerhalb der 1,5 h um 70 % in beiden Zelllinien zu (Abb. 4.11B, Bahn 1/3 bzw. 2/4, m). Insgesamt sind nach 2 h Internalisierung 12 % mehr [¹²⁵J]-TPP I in Kontrollzellen und 10 % in CLN6-2 Zellen nachweisbar (Abb. 4.11B, Σ Bahn 1 und 3 bzw. 2 und 4).

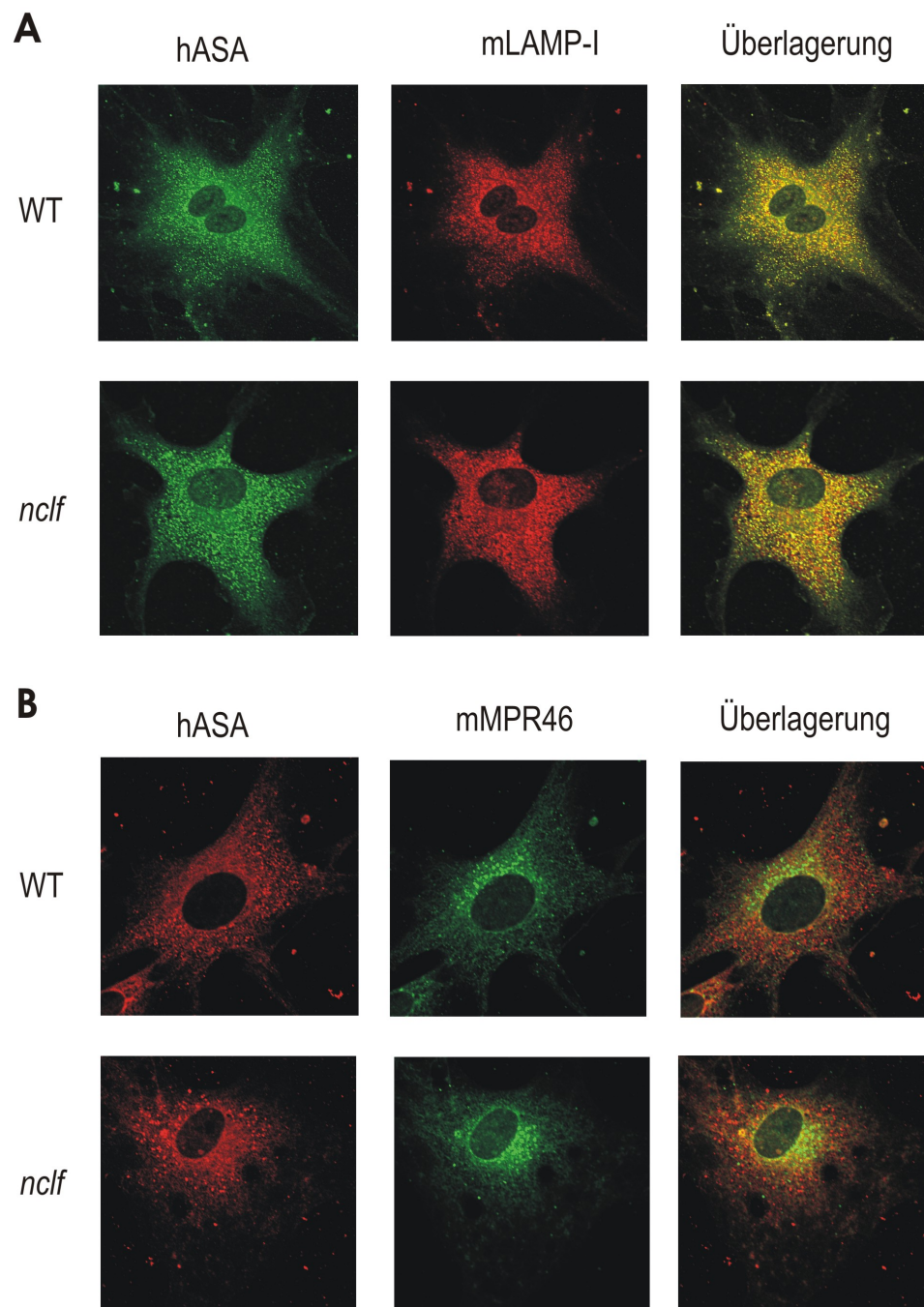


Abb. 4.10: Intrazelluläre Lokalisation endocytierter ASA. *Nclf*- und Kontroll-Fibroblasten (WT) wurden mit rekombinanter humaner ASA (250 mU/ ml) für 8 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und simultan mit Antikörpern gegen humane ASA (12A: grün, 12B rot) sowie murines LAMP-1 (12A: rot) bzw. murines MPR46 (12B: grün) inkubiert und durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

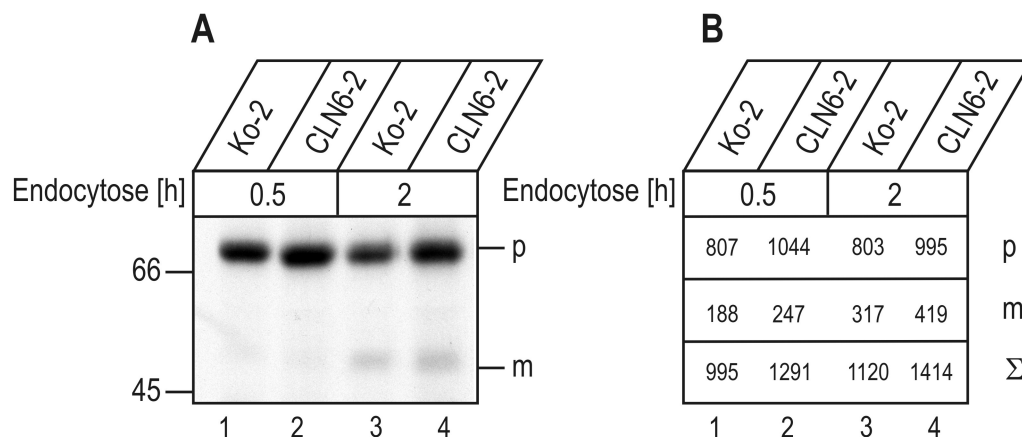


Abb. 4.11: Prozessierung endocytierter $[^{125}\text{J}]$ -proTPP in CLN6-Patientenfibroblasten. Fibroblasten von Patient CLN6-2 und einer Kontrolle (Ko-2) wurden mit $[^{125}\text{J}]$ -proTPP I (450.000 cpm/ml) für 0,5 und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung der an die Oberfläche gebundenen $[^{125}\text{J}]$ -proTPP I wurden die Zellextrakte unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sowie des Vorläufers (p) und der reifen Form (m) der TPP I sind gekennzeichnet (A). $[^{125}\text{J}]$ -TPP I-Polypeptide wurden entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Film aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die Radioaktivität quantifiziert. Die Werte für den $[^{125}\text{J}]$ -TPP-Vorläufer (p), die reife Form (m) und deren Summe sind angegeben (B). Die Nummern 1-4 unter der Tabelle entsprechen den Bahnen 1-4 in der Autoradiographie in Abb. 4.11A.

4.2.4.4 Degradation endocytierter lysosomaler Enzyme

Der Abbau endocytierter M6P-haltiger Liganden wurde durch Endocytose radioaktiv markierter ASA und TPP I mit anschließenden Chase-Perioden untersucht. CLN6-1- und Kontrollfibroblasten wurden mit $[^{125}\text{J}]$ -ASA für 3 h bei 37 °C inkubiert und entweder sofort oder nach 20-stündigem Chase lysiert. Die internalisierte $[^{125}\text{J}]$ -ASA wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht und densitometrisch ausgewertet. Abbildung 4.12 zeigt, dass die Gesamtmenge endocytierter $[^{125}\text{J}]$ -ASA in CLN6-1-Fibroblasten nach der Endocytose (Chase = 0 h) 150 % der Kontroll-Fibroblasten entsprach. Nach 20-stündigem Chase waren noch 32 % der internalisierten $[^{125}\text{J}]$ -ASA in Kontroll-Fibroblasten nachweisbar, während in den CLN6-1-Patienten-Fibroblasten noch ca. 64 % des Ausgangsmaterials vorhanden waren.

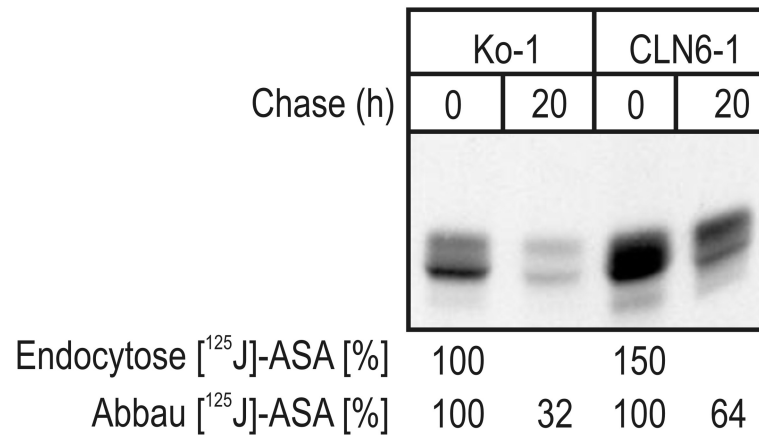


Abb. 4.12: Abbau von internalisierter [¹²⁵J]-ASA in CLN6-1-Patientenzellen. CLN6-1 Patienten- und Kontroll-Fibroblasten (Ko-1) wurden mit [¹²⁵J]-ASA (450.000 cpm/ml) für 3 h bei 37 °C inkubiert und Zellextrakte entweder sofort (0) oder nach 20-stündigem Chase präpariert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Das Autoradiogramm wurde densitometrisch ausgewertet und der Abbau von [¹²⁵J]-ASA als Prozent der nach Endocytose bzw. 20 h Chase in Kontroll- bzw. Patientenfibroblasten enthaltenen [¹²⁵J]-ASA angegeben.

Parallel wurde der Abbau internalisierter [¹²⁵J]-TPP I in Kontroll- und CLN6-2 Patientenfibroblasten untersucht. Die Zellen wurden mit [¹²⁵J]-proTPP I in An- und Abwesenheit von M6P für 4 h bei 37 °C inkubiert und entweder sofort geerntet oder nach einem Mediumwechsel für 5 bzw. 10 h weiterinkubiert. Die internalisierte [¹²⁵J]-TPP I wurde durch SDS-PAGE der Zellextrakte und Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 4.13A). Die [¹²⁵J]-TPP I-Banden wurden anschließend aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten und die Radioaktivität quantifiziert (Abb. 4.13B). Nach 4 h Endocytose waren in CLN6-2-Zellen (Abb. 4.13B; Bahn 3) 14 % mehr [¹²⁵J]-TPP I detektierbar als in Kontrollzellen (Bahn 1). Ein Überschuss an M6P hemmt die Aufnahme der [¹²⁵J]-TPP I nur um 60 % (Bahn 2). Nach 4 h Endocytose wurde in beiden Zelllinien ca. 17 % der internalisierten [¹²⁵J]-TPP I zur reifen 46-48 kDa-Form prozessiert (m, Bahn 1 und 3). Nach 5 h Chase verbleiben 17 % des Ausgangsmaterials (p + m) in den Kontrollzellen, während in den Patienten-Zellen 22 % vorhanden sind. Davon sind 42 % in Kontroll- und 39 % in den CLN6-defizienten Zellen als reife Form nachweisbar (15B, m, Bahn 4/5). Nach 10-stündiger Chaseperiode sind noch 12 % in den Kontrollzellen und 15 % [¹²⁵J]-TPP I in CLN6-2-Patienten-Zellen

zu detektieren, wobei der Anteil reifer TPP I jeweils 48 % bzw. 31 % ausmacht (Abb. 4.13B; Bahn 6 und 7).

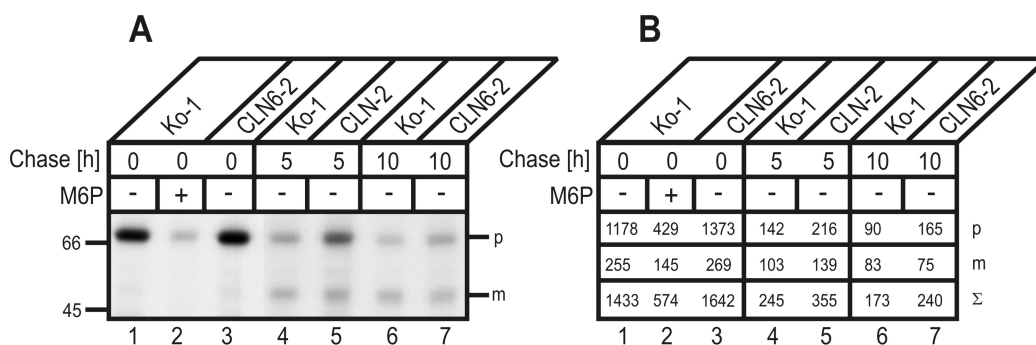


Abb. 4.13: Abbau von internalisierter $[^{125}\text{J}]$ -TPP I in CLN6-2-Patientenzellen. A, CLN6-2 Patienten- und Kontroll-Fibroblasten (Ko-1) wurden mit $[^{125}\text{J}]$ -proTPP I (450.000 cpm/ml) in An- (+) und Abwesenheit (-) von 10 mM M6P für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellextrakte wurden entweder sofort (0 h Chase, Bahn 1-3) oder nach 5- (Bahnen 4 und 5) und 10-stündigem Chase (Bahnen 6 und 7) unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sowie des Vorläufers (p) und der reifen Form (m) der TPP I sind gekennzeichnet. Aufgrund des schnellen Abbaus wurde die Expositionszeit des Films für die der Banden 1-3 auf 60 h begrenzt, während der Film zur Darstellung der Banden 4-7 die 4-fache Zeit exponiert wurde. B, $[^{125}\text{J}]$ -TPP I wurde entsprechend ihrer Lokalisation auf dem Film aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die Radioaktivität quantifiziert. Es sind die Werte für den $[^{125}\text{J}]$ -TPP-Vorläufer (p), die reife Form (m) und deren Summe angegeben. Die Nummern 1-7 unter der Tabelle entsprechen den Bahnen 1-7 in der Autoradiographie in Abb. 4.13A. Das Experiment wurde mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

4.2.5 Protein- und Lipidabbau in CLN6-defekten Zellen

4.2.5.1 Allgemeiner Proteinabbau

Nclf- und Kontroll-Fibroblasten (WT) wurden für 16 h bei 37 °C mit $[^{35}\text{S}]$ -Methionin in An- und Abwesenheit der Proteaseinhibitoren Pepstatin A und Leupeptin metabolisch markiert. Die Zellen wurden entweder direkt nach der Markierung geerntet ($t = 0$) oder für zwei Tage einem Chase in An- und Abwesenheit der Inhibitoren

unterzogen. Die Proteingebundene Radioaktivität wurde durch TCA-Präzipitation und Szintillationsspektrometrie bestimmt (Abb. 4.14). Nach 2-tägigem Chase sind von 100 % in Kontrollzellen 32 % und in *nclf*-Zellen 36 % proteingebundene Radioaktivität nachweisbar. In Anwesenheit der Proteaseinhibitoren steigt der Anteil proteingebundener Radioaktivität in Kontrollfibroblasten um 10 Prozentpunkte auf 42 % an. In Kontrollzellen sind unter Einfluss von Proteaseinhibitoren 49 % Radioaktivität nachweisbar, was einer Zunahme um 13 % entspricht. Vergleicht man den Abbau in An- und Abwesenheit von Proteaseinhibitoren in Kontroll- und *nclf*-Zellen wird deutlich, dass in *nclf*-Zellen ohne Proteaseinhibitoren der Abbau um 4 % und in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren um 7 % reduziert ist.

Der Abbau von Oligosacchariden von Glycoproteinen, -Lipiden und Glycosaminoglycanen erfolgt im Lysosom durch spezifische Endo- und Exoglycosidasen (Tetamanti, 2004). Um den allgemeinen Abbau von Glycoproteinen zu untersuchen, wurden *nclf*- und Wildtyp-Fibroblasten für 4 h bei 37 °C mit [³H]-Mannose markiert. Mannose ist ein Baustein der Oligosaccharidketten von Glycoproteinen. Die Zellen wurden dann entweder sofort nach dem Pulse geerntet oder für 2, 4, 6 Tage

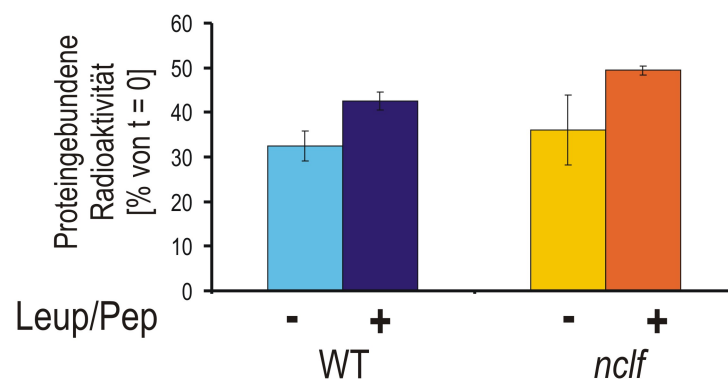


Abb. 4.14: Abbau von metabolisch markiertem Protein unter Einfluß von Proteaseinhibitoren in *nclf*- und Wildtypfibroblasten. Wildtyp- (WT) und *nclf*-Fibroblasten wurden in 24-Loch-Zellkulturschalen ($n = 3$) ausgesät und mit [³⁵S]-Methionin (10 μ Ci/ml) in An-(+) und Abwesenheit (-) der Proteaseinhibitoren Leupeptin (Leup; 100 μ M) und Pepstatin A (Pep; 50 μ M) für 16 h bei 37 °C markiert. Die Fibroblasten wurden entweder sofort oder nach 2-tägigem Chase geerntet und die proteingebundene Radioaktivität bestimmt. Die Grafik zeigt proteingebundene Radioaktivität in Prozent zum Ausgangswert. Die Werte geben Mittelwerte (+/-2,4) aus zwei Experimenten an ($n = 2$).

weiterinkubiert. Die in die Proteine inkorporierte [^3H]-Mannose wurde als TCA-unlösliche Radioaktivität gemessen (Abb. 4.15). Nach 2 bzw. 4 Tagen Chase sind von der Ausgangsinkorporationsrate bereits 78 % bzw. 83 % der markierten Glycoproteine in beiden Zelllinien abgebaut. Innerhalb von 6 Tagen sind noch 10 % der Ausgangsradioaktivität präzipitierbar. Dabei ist keine Veränderung im relativen Abbau in *nclf*-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar. Auch die Betrachtung der absoluten Werte ergibt keine Unterschiede im Abbauverhalten der radioaktiv markierten Glycoproteine (Daten nicht gezeigt).

Der lysosomale Abbau von Lipiden wurde in Fibroblasten von zwei Patienten und Kontrollen anhand des Glycosphingolipids Sphingomyelin analysiert. Sphingomyelin wird in den Lysosomen durch eine saure Sphingomyelinase zu Ceramid und Phosphatidylcholin abgebaut. Ceramid kann weiter in die Bausteine Sphingosin und einen Fettsäurerest zerlegt werden, die weiter abgebaut oder für die Synthese neuer Glycosphingolipide in einem „salvage Pathway“ genutzt werden können (Shayman, 2000; Tettamanti, 2004). Die Zellen wurden mit [^3H]-markiertem humanem Sphingomyelin und humanen LDL-Partikeln als Endocytosehilfe inkubiert. Die Lipide wurden danach aus den Zellen extrahiert und [^3H]-Sphingomyelin und die Abbauprodukte durch Dünnschichtchromatographie getrennt und densitometrisch ausgewertet. Das Laufverhalten des Ausgangsmaterials [^3H]-Sphingomyelin ist in Abbildung 4.16A

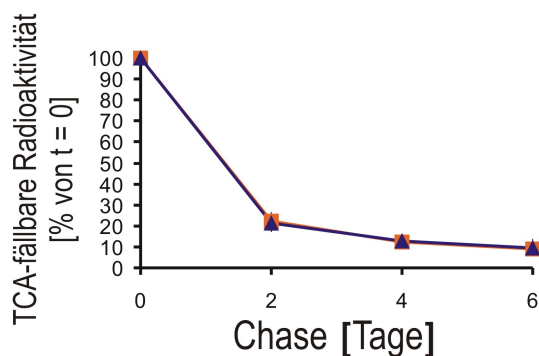


Abb. 4.15: Abbau von Glycoproteinen in *nclf*-Fibroblasten. Wildtyp- (▲) und *nclf*-Fibroblasten (■) wurden in 24-Loch Zellkulturschalen ausgesät, mit [^3H]-Mannose ($30 \mu\text{Ci/ml}$) für 4 h bei 37°C inkubiert ($t = 0$) und für 2, 4 und 6 Tage einem Chase unterzogen. Die TCA-unlösliche Radioaktivität aus der Zellsuspension wurde bestimmt und in Prozent vom Ausgangswert ($t = 0$) dargestellt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus zwei Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Standardabweichung ist angegeben, wenn sie größer ist als das Messwertsymbol.

gezeigt. Ein einzelner Peak war unter den gewählten Bedingungen 30 mm vom Auftragspunkt entfernt nachweisbar (S). Nach 2-stündiger Inkubation sind ca. 35 % des [^3H]-Sphingomyelins zu [^3H]-Ceramid (C, 145 mm Laufstrecke) hydrolysiert worden (Abb. 4.16B). Durchschnittlich sind 17 % [^3H]-Sphingomyelin (S*) nach der Inkubation noch detektierbar. Die Identität der [^3H]-Peaks bei 40, 50 und 160 mm ist nicht geklärt. Es sind keine Unterschiede in den Abbaumustern zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten zu erkennen.

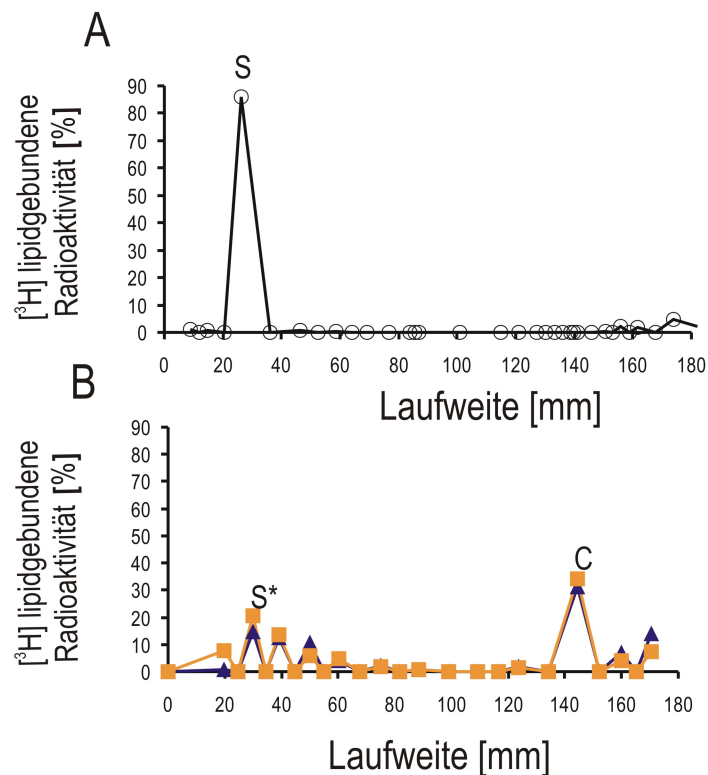


Abb. 4.16: Abbau von [^3H]-Sphingomyelin in CLN6-Patientenzellen. Zwei CLN6-1- und 2-Patientenzellen (■) und Kontrollen (▲) wurde [^3H]-Sphingomyelin (○) mit LDL als Trägermaterial für 2h bei 37 °C zur Endocytose angeboten. Ein Aliquot des Ausgangsmaterials wurde durch DC auf HPTLC-Platten aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität densitometrisch ermittelt (A). Die aus den Zellen extrahierten Lipide wurden parallel analysiert (B). Die Verteilung der [^3H]-Radioaktivität wurde aus den beiden verwendeten CLN6-Patienten- und Kontrollzelllinien gemittelt und als Prozent der insgesamt detektierbaren Radioaktivität dargestellt.

4.3 Einfluss erhöhter Inositolphosphat-Spiegel auf die M6P-abhängige Endocytose

Der Mechanismus der erhöhten Endocytoserate in CLN6-defekten Zellen ist unbekannt. Der Prozess der Endocytose ist komplex (Siehe Kap. 1.1) und benötigt das Zusammenspiel verschiedener Komponenten, u.a. Inositolpolyphosphate, wie Inositolhexakisphosphat (Hoy *et al.*, 2002). Da außerdem die Spiegel verschiedener Inositolphosphate im Hirn von *nclf*-Mäusen erhöht sind (T. Bräulke, Hamburg, persönliche Mitteilung), sollte der Einfluß von Inositolphosphaten auf die Endocytose lysosomaler Enzyme in Zellen untersucht werden. Dazu wurden HEK293-Zellen stabil mit der cDNA für die Inositolphosphat 3-Kinase (IP₃-Kinase) transfiziert. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphat (Ins(1,3,4,5)P₄) aus Ins(1,4,5)P₃ (Majerus, 1992). Durch weitere Kinasen und Phosphatasen können dann höher oder nach anderem Muster phosphorylierte Inositolphosphate gebildet werden (Irvine & Shell, 2001). Es wurde dann angenommen, dass der erhöhte Spiegel an Ins(1,3,4,5)P₄ das Gleichgewicht zu höheren Konzentrationen an Ins(1,4,5,6)P₄, Ins(1,3,4,5,6)P₅, InsP₆ und InsP₇ verschiebt. Die Expression der IP₃-Kinase als Fusionsprotein mit EGFP in verschiedenen Klonen (K3-K6) stabil transfizierter Zellen wurde mit Hilfe eines EGFP-Westernblots überprüft. Als Kontrolle dienten EGFP-transfizierte Zellen, in denen das 32 kDa EGFP-Protein nachweisbar war (Abb. 4.17). In den IP₃K-exprimierenden Zellklonen war dagegen eine Proteinbande bei 90 kDa

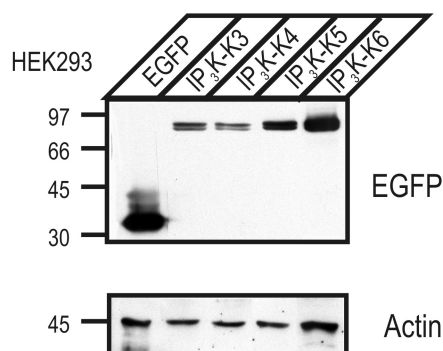


Abb. 4.17: Expression des IP₃-Kinase-EGFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen. Zellextrakte von EGFP (EGFP) und IP₃-Kinase (IP₃K K3-K6) überexprimierenden HEK293-Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit EGFP-Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Actin. Die Positionen des Protein-Standards sind gekennzeichnet.

zu sehen, die der erwarteten Größe (32 kDa EGFP und 58 kDa IP₃-Kinase) entspricht. Die höchste Expression des IP₃-Kinase-EGFP-Proteins war in Klon 6, die niedrigste in Klon 3 nachweisbar. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels diente ein Westernblot für Actin.

Stabil überexprimierende EGFP bzw. IP₃-K-K6-HEK293-Zellen wurden für 5 h mit [¹²⁵J]-ASA inkubiert und die internalisierten Liganden durch SDS-PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht (siehe Kap. 3.4.12). Abbildung 4.18 zeigt, dass die [¹²⁵J]-ASA-Aufnahme spezifisch ist und vollständig durch einen Überschuss M6P gehemmt wird. IP₃K-K6 akkumuliert durchschnittlich 30 % (+/-25; n = 3) mehr [¹²⁵J]-ASA als nicht-transfizierte Zellen. Die Analyse der intrazellulären Inositolphosphate zeigte nur eine leichte prozentuale Erhöhung von Ins(1,4,5,6)P₄ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ in IP₃-Kinase-überexprimierenden HEK293-Zellen (Dr H. Lin/ Prof. Mayr, UKE, persönliche Mitteilung).

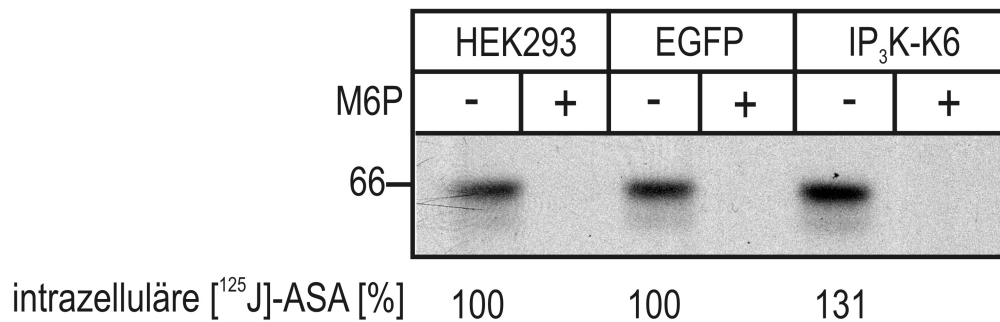


Abb. 4.18: Endocytose von [¹²⁵J]-Arylsulfatase A (ASA) in HEK293-IP₃K-Zellen. HEK293-Zellen, HEK293-EGFP- und HEK293-IP₃K-K6-Zellen wurden in An- (+) und Abwesenheit (-) von M6P (10 mM) mit [¹²⁵J]-ASA (450.000 cpm/ml) für 5 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der an die Plasmamembran gebundenen [¹²⁵J]-ASA wurden die Zellextrakte unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Die Position des Protein-Standards ist gekennzeichnet. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet und als Prozent der [¹²⁵J]-ASA in nicht-transfizierten HEK293-Zellen angegeben.

4.4 Untersuchung der Gangliosidzusammensetzung im Cortex von *nclf*-Mäusen verschiedener Altersstufen

Bei vielen lysosomalen Speichererkrankungen mit Neurodegeneration ist eine sekundäre Akkumulation von Gangliosiden im Hirn zu beobachten (Walkley et al., 2004). Da nicht bekannt ist, ob auch bei defektem CLN6 Ganglioside akkumulieren, wurde Hirnmaterial von *nclf*-Mäusen unterschiedlicher Altersstufen analysiert. Dazu wurde aus den Cortices von 5, 12, 19 und 25 Wochen alten *nclf*- und Kontrollmäusen Lipide extrahiert und durch Hydrophobizitätschromatographie über eine C18-Säule polare von sehr polaren Lipiden getrennt. Die sehr polaren Lipide, zu denen auch die Ganglioside zählen, wurden anschließend durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mittels Resorcinol-Färbung sichtbar gemacht. Mit zunehmendem Alter war in den Cortices der *nclf*-Mäuse eine schwache Akkumulation des GM3-Gangliosid nachweisbar, die bei den 25 Wochen alten Kontrollmäusen nicht detektierbar war (Abb. 4.19). Außerdem war bei *nclf*-Mäusen bereits ab der 5. Woche eine GD3-Bande zu sehen, die bei den 25 Wochen alten Kontrollmäusen sehr schwach ausgeprägt war. Der Gehalt der übrigen Ganglioside sowie GT/GQ war im Vergleich mit der 25 Wochen alten Kontrollmaus unverändert.

4.5 Suche nach potentiellen CLN6-Interaktionspartnern mittels des „Yeast two-Hybrid“-Systems

Die Funktion des CLN6-Proteins ist nicht bekannt. Durch Kenntnis von Wechselwirkungen mit anderen Proteinen könnten Rückschlüsse auf die Funktion des CLN6-Proteins gezogen werden. Um CLN6-interagierende Proteine zu identifizieren, wurde eine cDNA-Bank aus humanem Hirn mit Hilfe des „Yeast Two-Hybrid“-Systems durchsucht. Diese cDNA-Bank wurde u.a. ausgewählt, da Defekte im CLN6 zur Neurodegeneration führen und hirsnspezifische Wechselwirkungspartner des CLN6 auch Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der Krankheit zulassen könnten.

Das „Yeast Two-Hybrid“-System ermöglicht die Untersuchung von Protein-Proteinwechselwirkungen *in vivo* und basiert auf der modularen Struktur des Hefe-GAL4-Transkriptionsfaktors, der aus zwei funktionell unabhängigen Domänen, einer DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) aufgebaut ist. Bei diesem System werden Fusionsproteine, die in dieser Untersuchung zum einen aus der 3. luminalen Schleife des CLN6 und der DNA-BD sowie unbekanntem Prote-

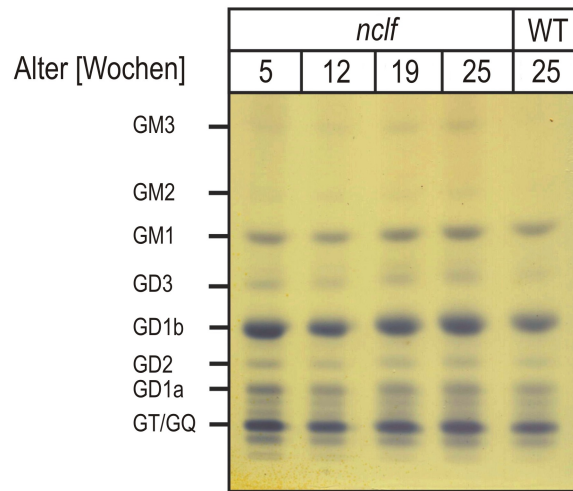


Abb. 4.19: Altersabhängige Expression von Gangliosiden im Cortex von *nclf*-Mäusen. Aus jeweils 2 mg Cortex von 5-, 12-, 19- und 25-Wochen alten *nclf*-Mäusen sowie von einer 25-Wochen alten Kontrollmaus wurden Lipide extrahiert (Methanol:Chloroform; 2:1). Durch C18-Hydrophobizitätschromatographie wurden polare von sehr polaren Lipiden fraktioniert und letztere nach Konzentrierung durch Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Platten getrennt. Die Ganglioside wurden durch Anfärbung mit Resorcinol sichtbar gemacht. Die Position der einzelnen Ganglioside ist angegeben.

inen und der AD bestehen, in Hefezellen koexprimiert. Die 3. luminale Domäne des CLN6 wurde eingesetzt, da nach luminalen Wechselwirkungspartnern des CLN6 gesucht werden sollte, die möglicherweise Hinweise zur Bedeutung von CLN6 für lysosomale Funktionen geben. Weiterhin darf eine bestimmte Länge der im „Yeast Two-Hybrid“-System eingesetzten Fragmente nicht unterschritten werden, um falsch-positive Interaktionen zu vermeiden und neben dem C-Terminus ist die 3. luminale Domäne die längste luminale CLN6-Domäne. Ferner sind Mutationen mit dieser Domäne assoziiert, die Funktionen für diese Domäne vermuten lassen (Wheeler *et al.*, 2002). Durch Interaktion des CLN6-Fragments und einem der unbekannt Proteine wird die Aktivität des Gal4-Transkriptionsfaktors rekonstituiert. Die DNA-BD interagiert mit einer Verstärkersequenz, der *GAL4*-UAS („*GAL4*-upstream activating sequence“) und die AD aktiviert die Transkription der Gene für die Selektionsmarker *HIS3* bzw. *ADE2* sowie für die Reportergene *lacZ* bzw. *MEL1*, die sich jeweils

an die Promotorregion anschließen und für die Enzyme β -Galactosidase bzw. α -Galactosidase kodieren.

In der hier beschriebenen Untersuchung wurde der Hefestamm AH109 verwendet, bei dem die endogenen *Gal4*- und *Gal80*-Gene deletiert sind. Durch weitere Deletionen der *TRP1*-, *LEU2*-, *HIS3*- und *ADE2*-Gene entsteht ein Trp-, Leu-, His-, Adenin-auxotropher Phänotyp der durch Selektionsmarker, die sich auf den Vektoren befinden, komplementiert werden kann.

4.5.1 „Screen“ einer cDNA-Bank aus humanem Hirn mit einem luminalen CLN6-Fragment

Die 132 bp cDNA, die die 3. luminale Schleife des humanen CLN6 (AS 137 bis 181) kodiert, wurde über eingefügte *EcoRI*- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen in den Hefe-Expressionsvektor pGBKT7 subkloniert. Das Expressionsprodukt enthält N-terminal die DNA-BD.

Die cDNA-Bank wurde aus humanen adulten Hirnen sowohl mit Hilfe zusammengesetzter Oligonucleotide als auch von Oligo(dT)-Nucleotiden synthetisiert (Clontech). Sie enthält ca. 5×10^6 unabhängige Klone mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 1,5 kb die gerichtet über eingefügte *EcoRI* und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pACT 2 kloniert sind. Die Expressionsprodukte des pACT 2 enthalten N-terminal die AD des GAL4-Transkriptionsfaktors.

S. cerevisiae AH109 wurde sequentiell mit den Vektoren pGBKT7-CLN6-Loop3 und pACT2-cDNA-Bank transformiert und auf SD-Mangelmedium ohne Histidin, Leucin, Tryptophan und Adenin ausplattiert. Die 147 angewachsenen Hefeklone wurden mittels β -Galactosidase Filtertest analysiert und auf α -Galactosidase-Expression untersucht. Aus 127 Hefeklonen, die in beiden Testverfahren positiv reagierten, wurde die Gesamtplasmid-DNA isoliert und in chemokompetente *E.coli* TOP10F transformiert, die anschließend auf Ampicillin-haltigen Agarplatten kultiviert wurden. Das Amp^r-Gen auf dem Vektor pACT2 vermittelt Ampicillin-Resistenz, wodurch nur die Bakterien auf den Ampicillin-haltigen Agarplatten anwachsen, die den Vektor pACT2 enthielten. Die cDNA-Fragmente der verbliebenen 38 Klone wurden mit Hilfe des Primers Gal4ADSeq *for* der Sequenzanalyse unterzogen. Dabei konnten auf Grund GC-reicher oder zu kurzer Sequenzen 14 cDNA-Fragmente nicht analysiert werden. Mit den übrigen Sequenzen der cDNA-Fragmente, die in Abb. 4.20 dargestellt sind, wurden Gendatenbanken durchsucht (Tabelle 4.2). Die cDNA-Fragmente der Klone 18 und 20 kodieren für Transkriptionsfaktoren. Die cDNA-Fragmente der Klone 19 und 4 enthalten Sequenzen, die für mitochondriale Proteine kodieren und

das cDNA-Fragment von Klon 15 kodiert für ein peroxisomales Protein. Für cytosolisch lokalisierte Proteine kodieren die Sequenzen der Klone 2, 3, 5 und 14. Bei den cDNA-Fragmenten der Klone 10 und 12 handelt es sich um Sequenzen RNA-bindender Proteine, von denen Klon 10 nicht näher charakterisiert ist und das Genprodukt von Klon 12 Östrogen-bindende Eigenschaften aufweist (Norris *et al.*, 2002). Auf Grund ihrer DNA-bindenden Eigenschaften oder der intrazellulären Lokalisation, die eine Interaktion mit der dem Lumen des ER zugewandten Seite des CLN6 unwahrscheinlich macht, handelt es sich bei diesen cDNA-Fragmentprodukten wahrscheinlich um falsch-positive Interaktionen.

Die Proteine, die von den cDNA-Fragmenten 1, 8, 17 und 21 kodiert werden, sind das Fe^{3+} -transportierende Transferrin, der lysosomale Proteaseinhibitor Cystatin C, das Vitamin B12-transportierende Transcobalamin 2 bzw. eines der in den Lipidstoffwechsel involvierten Angiopoietin-ähnlichen Proteine. Alle diese Proteine werden am ER synthetisiert, transloziert, glycosyliert und sezerniert. cDNA-Fragment 11 kodiert ein sezerniertes Protein mit Funktionen bei der neuronalen Entwicklung namens Noelin-2 (Moreno & Bronner-Fraser, 2005) und die cDNA-Sequenz von Klon 16 kodiert für NOMO 2, ein Protein, das an der Ausbildung der rechts-links bzw. anterior-posterior Symmetrie im sich entwickelnden Embryo beteiligt ist. Das cDNA-Fragment von Klon 13 kodiert für eine Untereinheit eines Aminosäuretransporters, der an der Plasmamembran lokalisiert ist und die cDNA-Fragmente von Klon 23 und 24 für die β -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natrium-Kanals. Die Klone 6, 7, 9 und 22 sind cDNA-Klone, denen bislang kein funktionelles Protein zugeordnet ist.

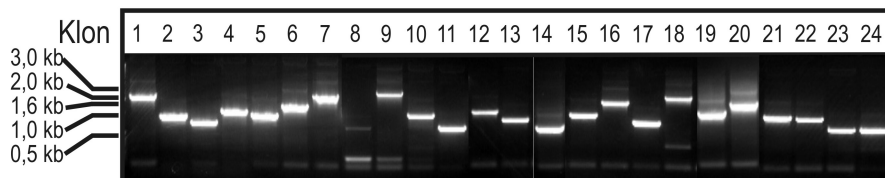


Abb. 4.20: cDNA-Fragmente der zur Sequenzierung eingesetzten Klone. Die cDNA-Fragmente der Klone 1-24 wurden durch Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Positionen des DNA-Standards sind angegeben.

Tabelle 4.2: Datenbankanalyse β - und α -Galactosidase-positiver Act 2-Klone

Klon	Ermittelte Sequenz/ Durchsuchen eingesetzt Sequenz [bp]	Se- zum cDNA- Sequenz [bp]	Kodierende Sequenz [bp]	AS	Lokalisation/ Funktio- on
1	<i>h.s.</i> Transferrin , mRNA/ 741-1349		51-2147	697	extrazellulär/ Transport Fe ³⁺
2	<i>h.s.</i> Proteasome β -Untereinheit 4, mRNA/ 223-796		24-881	265	cytoplasmatisch/ Degradation
3	<i>h.s.</i> HSCARG Protein , mRNA/ 835-1366		382-1281	300	?/?
4	<i>h.s.</i> Peroxiredoxin 5 mRNA/ 39-595		120-764	215	mitochondrial/ Abbau von Peroxiden
5	<i>h.s.</i> ribosomal protein SA , mRNA/ 227-836		1-885	295	cytoplasmatisch/
6	<i>h.s.</i> cDNA clone IMAGE:4302394/ 10-550		1-1156	?	?/?
7	<i>h.s.</i> DNA Sequenz Klon RP11-73H14		?	?	?/?
8	<i>h.s.</i> Cystatin C , mRNA 3-476		76-516	145	lysosomal u. extrazellu- lär/Proteaseinhibitor,
9	<i>h.s.</i> chromoso- me 17, clone RP13-1277B16 , 142884-142424		182701/?	?	?/?
10	<i>h.s.</i> RNA binding motif protein 4 , mRNA / 720-1104		70-1164	365	nukleär/cytoplasmatisch/ mRNA-Bindung
11	<i>h.s.</i> NOELIN-2 , mRNA /73891-74364		84679/ ?	454	sezerniert/ ?;
12	<i>h.s.</i> RNA binding motif protein 9 , mRNA / 110-562		106-1278	391	nukleär/cytoplasmatisch/ mRNA-Bindung

13	<i>h.s.</i> Solute Carrier Family 3 Mitglied 2 (SLC3A2), mRNA/	225-2117	946	Plasmamembran/ Aminosäuretransporter mit Amylase-Aktivität und Integrin-bindenden Eigenschaften
14	<i>h.s.</i> Cytochrome b245, α-Untereinheit, mRNA / 6-445	28-615	196	cytoplasmatisch, Teil des NADPH-Oxidase-Komplexes an der Plasmamembran/ Modulation der ROS-Konzentration
15	<i>h.s.</i> Enoyl Coenzyme A Hydratase 1, (ECH1), mRNA/ 86-546	86-1072	329	peroxisomal/ β -Oxidation von Fettsäuren
16	<i>h.s.</i> NODAL modulator 2 (NOMO2), mRNA / 2281-2779	73-3741	1223	extrazellulär/ Antagonist der Nodal-Signalkaskade; Entwicklung von links-rechts und anterior-posterior-Symmetrie
17	<i>h.s.</i> angiopoietin-like 1, mRNA/ 1496-1796	477-1952	492	extrazellulär, gehört zur VEGF-Familie, Modulation des Lipid-Spiegels im Plasma
18	<i>h.s.</i> nuclear receptor co-repressor 1 (NCOR1), mRNA/ 5143-5647	241-7563	2241	cytoplasmatisch, nukleär/ Transkriptionsfaktor
19	<i>h.s.</i> enoyl Coenzyme A hydratase mRNA/ 11-387 IMAGE-Klon: 3875751	1261	?	mitochondrial, β -Oxidation von Fettsäuren
20	<i>h.s.</i> sterol regulatory element binding transcription factor 2 (SREBF2), mRNA/ 36-533	170-3595	1142	nukleär, cytoplasmatisch/ Transkriptionsfaktor

21	<i>h.s.</i> Transcobalamin 2, TCN2, mRNA /804-1380	159-1442	428	extrazellulär/ transportiert VitaminB12
22	<i>h.s.</i> BAC clone RP11-758P17 from 7/ 223490-73785	?	?	?/?
23	<i>h.s.</i> sodium channel, voltage-gated, type I, beta, mRNA / 604-852	1239	413	Plasmamembran/?
24	<i>h.s.</i> sodium channel, voltage-gated, type I, beta, mRNA /632-857	1239	413	Plasmamembran/?

h.s.: *homo sapiens*; bp: Basenpaare AS: Aminosäuren; ROS: „reactive oxygen species“

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Biogenese von Lysosomen und lysosomale Funktion bei CLN6-Defekt

Der Zusammenhang zwischen den mutierten NCL-Genen *CLN1-8* und den lysosomalen Speicherungen ist unklar. Die verschiedenen CLN-Genprodukte besitzen lysosomale Enzymaktivität (CLN1, CLN2), sind lösliche lysosomale Proteine unbekannter Funktion (CLN5), sind lysosomale Transmembranproteine (CLN3), oder sind Membranproteine im Endoplasmatischen Retikulum (CLN6 und CLN8). Gemeinsam ist den Krankheiten aber offensichtlich der Pathomechanismus, der zur Zerstörung von Neuronen und der Photorezeptorschicht im Auge führt. Es ist eher unwahrscheinlich, dass das weitgehend identische Speichermaterial, das bei den verschiedenen NCL akkumuliert, neurotoxisch wirkt, weil es in jeder Zelle des Organismus nachweisbar ist (Mitchison *et al.*, 2005). Da seine Konzentration weder mit dem Grad der Neurodegeneration noch mit klinischen Symptomen korreliert (Cooper, 2003), müssen andere Mechanismen angenommen werden, die zu lysosomalen Dysfunktionen und Zelluntergang führen.

Ziel der Arbeit war es zunächst einen möglichen Zusammenhang zwischen dem im ER-residenten polytopen Membranprotein CLN6 und der Biogenese sowie der Funktionalität der Lysosomen zu finden. Als Untersuchungsmaterial standen Fibroblasten der Haut von zwei CLN6-Patienten sowie primär kultivierte Fibroblasten aus *nclf*-Mäusen, einem natürlichen Tiermodell der Krankheit, zur Verfügung.

5.1.1 Biosyntheseweg lysosomaler Hydrolasen

Ob der *CLN6*-Gendefekt Einfluss auf die Synthese, Prozessierung und den Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme hat, wurde mittels Pulse-Chase-Experimenten und anschließender Immunpräzipitation von Cathepsin D (CtsD) in humanen und murinen *CLN6*-defekten Fibroblasten analysiert. Die Experimente zeigen, dass die Syntheserate, Sekretion und Prozessierung von CtsD in humanen und murinen *CLN6*-defekten Fibroblasten normal verläuft (Abb. 3 a/b). Diese Ergebnisse konnten anhand eines zweiten Beispiels, der β -Hexosaminidase, bestätigt werden. Weiterhin sind die spezifischen Aktivitäten der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase und Arylsulfatase A (ASA) in *CLN6*-defekten humanen, murinen und ovinen Fibroblasten und Kontrollzellen vergleichbar (Heine *et al.*, 2004), was ebenfalls auf eine normale Synthese und korrekte Prozessierung dieser lysosomalen Enzyme schließen lässt.

Untersuchungen an Fibroblasten von *CLN5*-Patienten und an Hirnextrakten von *CLN3*-Patienten habe eine erhöhte *CLN2*/TPP I-Aktivität gezeigt (Vesa *et al.*, 2002; Cooper, 2003), die sich allerdings in Hirnen von *CLN5*-defizienten Mäusen nicht bestätigen ließ (Kopra *et al.*, 2004). Golabek *et al.* (2000) beschrieben nach Überexpression von Wildtyp-*CLN3* in HEK293-Zellen einen erhöhten lysosomalen pH, der sekundär zu Veränderungen in der Reifung von intermediärem (47 kDa) zu reifem (31 kDa) Cathepsin D führt. Dieser Effekt war nach Expression von mutantem *CLN3* nicht nachweisbar. Aufgrund der Homologie des *CLN3*-Proteins zu *btn1* der Hefe, das an der Regulation des pH-Werts der Vakuole, einem dem Lysosom der Säuger äquivalenten Organell der Hefe, beteiligt ist, wurde geschlussfolgert, dass defektes *CLN3*/*btn1* den lysosomalen pH durch Protonentransportaktivität beeinflusst (Pearce and Sherman, 1998; Gachet *et al.*, 2005). Auch an einem *CLN3* knock-in-Modell wurden Veränderungen der steady-state Konzentration von CtsD-Formen beschrieben (Fossale *et al.*, 2004), die sich durch Abweichungen im lysosomalen pH erklären lassen. Obwohl auch bei *CLN6*-Fibroblasten erhöhte lysosomale pH-Werte dokumentiert wurden (Holopainen *et al.*, 2001), sind unter den hier beschriebenen Bedingungen weder die Aktivität verschiedener Enzyme noch die Prozessierung von CtsD und β -Hexosaminidase in *CLN6*-defekten Fibroblasten verändert.

5.1.2 Endocytoseweg zum Lysosom

Der intrazelluläre Transport lysosomaler Enzyme erfolgt in Säugerzellen durch zwei Typen von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) mit molaren Massen von 46 kDa (MPR46) und 300 kDa (MPR300). Beide MPR binden im Golgi Mannose-6-

Phosphat (M6P)-Reste neusynthetisierter lysosomaler Enzyme und vermitteln ihren Transport zu späten endosomalen Kompartimenten. Hier dissoziieren die lysosomalen Enzyme auf Grund des sauren pH-Wertes von den Rezeptoren und gelangen auf wenig untersuchte Weise in die Lysosomen. Sezernierte lysosomale Enzyme, die im Golgi nicht an MPR gebunden haben, können durch Endocytose, die ausschließlich durch den MPR300 vermittelt wird, zu den Lysosomen gelangen (Storch & Braulke, 2005). Um zu überprüfen, ob der CLN6-Defekt den Transport lysosomaler Enzyme über den Endocytoseweg beeinträchtigt und damit sekundär zu Dysfunktionen des Lysosoms beiträgt, wurde die Aufnahme rekombinanter, radioaktiv markierter lysosomaler Enzyme Arylsulfatase A (ASA), Tripeptidyl Peptidase I (TPP I), sowie von Proteinen aus Sekreten MPR-defizienter Mauszellen in CLN6-defekten Fibroblasten untersucht.

5.1.2.1 Endocytose rekombinanter lysosomaler Enzyme ASA und TPP I

Nach MPR300-abhängiger Endocytose von [^{125}J]-markierter Arylsulfatase A waren erhöhte Mengen dieses lysosomalen Enzyms in Fibroblasten von CLN6-Patienten, *nclf*-Mäusen und OCL6-Schafen im Vergleich zu Kontrollen detektierbar (Abb. 4A, Heine *et al.*, 2004). Während erhöhte Mengen an endocytierter [^{125}J]-ASA auch in Fibroblasten von CLN2- und CLN3-Patienten zu finden waren, war die Akkumulation in CLN6-Fibroblasten jedoch am höchsten (Abb. 4B). Dies lässt vermuten, dass die Akkumulation internalisierter lysosomaler Enzyme eine generell veränderte Eigenschaft der NCL sein könnte, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die Endocytose eines zweiten lysosomalen Enzyms, der TPP I in CLN6-defekten Zellen gemessen. Dabei erlaubt die Prozessierung der als 68 kDa Vorläuferpolypeptid (p) angebotenen TPP I zur reifen 48 kDa Form (m) erste Aussagen zur Lokalisation der endocytiierten TPP I, da die proteolytische Aktivierung im Lysosom stattfindet (Golabek *et al.*, 2003). Während in CLN6-defekten Zellen die Menge der reifen Form der [^{125}J]-TPP I leicht erhöht war, war die Gesamtmenge detektierbarer [^{125}J]-TPP I nach 2 und 5 h Endocytose in CLN6-defekten Zellen und Kontrollen vergleichbar (Abb. 5). [^{125}J]-ASA akkumuliert also wesentlich stärker in CLN6-defekten Zellen als TPP I, was vermuten lässt, dass a) der Mechanismus der MPR300-abhängigen Aufnahme, b) die Geschwindigkeit des Transportes und die Verweildauer in Kompartimenten im endocytotischen Weg unterschiedlich sind, oder c) die Stabilität verschiedener endocytierter Hydrolasen im Lysosom variiert. Erschwerend für den direkten Vergleich der beiden [^{125}J]-markierten endocytiierten Liganden ist, dass offensichtlich ein Teil der Zell-assoziierten [^{125}J]-TPP I M6P-unabhängig aufgenommen wurde, während die [^{125}J]-ASA ausschließlich über den MPR300-vermittelten Weg in die Zelle gelangt. Für TPP I ist eine M6P-

abhängige und eine M6P-unabhängige Aufnahme bereits in cerebellären Neuronen aus Ratten nachgewiesen worden (Lin & Lobel 2001). Der M6P-unabhängige Anteil zellassoziierter TPP I scheint also weder eine Frage der Expression/Aufreinigung, noch des M6P-Gehalts der Zuckerreste zu sein. Es ist also nahe liegend zu vermuten, dass TPP I-Vorläuferpolypeptide unspezifisch an die Plasmamembran binden und nicht internalisiert werden. Kürzlich wurde berichtet, dass TPP I die Fähigkeit hat, an Glycosaminoglycane (GAG), wie zum Beispiel Heparin zu binden, was die Aktivität und Prozessierung der TPP I beeinflusst (Golabek *et al.*, 2005). Es ist also möglich, dass die [¹²⁵J]-TPP I Vorläuferformen nach der Inkubationszeit nicht internalisierte sondern an Zelloberflächen-GAG gebundene TPP I darstellen. Dies könnte durch Bindungsexperimente von TPP I bei 4° C in An- und Abwesenheit von M6P, Heparin und einer Kombination aus Heparin und M6P überprüft werden.

5.1.2.2 Selektivität der Aufnahme lysosomaler Enzyme

Um zu untersuchen, ob ASA und TPP I sich zufälligerweise im Endocytoseverhalten unterscheiden, wurde die Internalisierung der Gesamtheit von Proteinen getestet, die aus Sekreten MPR-defizienter Zellen stammen. Auf Grund der MPR-Defizienz sollten die Sekrete neben den konstitutiv sezernierten Proteinen alle neusynthetisierten M6P-haltigen Proteine enthalten. Die Sekrete wurden durch metabolische Markierung der MPR-defizienten Zellen mit [³⁵S]-Methionin gewonnen und ohne weitere Aufreinigungsschritte *nclf*- und Kontrollzellen zur Endocytose angeboten. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von M6P wurde in *nclf*-Zellen eine generell erhöhte Aufnahme aller [³⁵S]-markierter Polypeptide im Vergleich zu Kontrollen festgestellt. In Abwesenheit von M6P wurden erwartungsgemäß mehr [³⁵S]-markierte Proteine internalisiert (Abb. 6). Außerdem sind bei Kontrollen und *nclf*-Zellen identische Polypeptidmuster der endocytierten Proteine nachweisbar, die dafür sprechen, dass auch nach Endocytose von M6P-haltigen Vorläuferformen lysosomaler Proteine eine korrekte Prozessierung in *nclf*-Zellen vorliegt. Da also keine spezifische Anreicherung distinkter Proteine nachweisbar war, ist ein selektiver Aufnahmemechanismus für bestimmte lysosomale Enzyme wie ASA auszuschließen.

5.1.3 Selektive Anreicherung von ASA in CLN6-defekten Zellen

Da alle M6P-haltigen Proteine denselben Aufnahmemechanismus nutzen, könnte die für [¹²⁵J]-ASA spezifisch gesteigerte Akkumulation in CLN6-defekten Zellen auf Unterschiede im intrazellulären Transport entlang des Endocytoseweges oder im Abbau

internalisierter [^{125}J]-ASA zurückzuführen sein. Um zu untersuchen, ob sich ASA spezifisch in prä-lysosomalen Kompartimenten anreichert, aus denen der Transport zum Lysosom verzögert ist, wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten die subzelluläre Verteilung endocytierter ASA durch Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 11) bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb. 12) analysiert. Es wurde festgestellt, dass endocytierte rekombinante ASA, wie die rekombinante TPP I (Abb. 13) zu den Lysosomen transportiert wird. Damit kann geschlossen werden, dass die Akkumulation von ASA auf einen selektiv verringerten Abbau im Lysosom selbst zurückzuführen ist.

5.1.3.1 Halblebenszeit rekombinanter lysosomaler Enzyme ASA und TPP I

Die in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten [^{125}J]-markierten Enzyme TPP I und ASA haben nach ihrer Endocytose eine vergleichsweise kurze Halbwertszeit ($t_{1/2}$). Aus den Pulse-Chase-Experimenten wurde die $t_{1/2}$ von [^{125}J]-TPP in Kontrollfibroblasten mit ca. 3 h (Abb. 15) ermittelt und ist wesentlich kürzer als die von [^{125}J]-ASA mit einer $t_{1/2}$ von 11 h (Abb. 14). Die unveränderte Menge und das Prozessierungsmuster von TPP I, die in 2 oder 5 h endocytiert wurde (Abb. 5) bestätigt, dass in dieser Zeit ein *steady state* erreicht ist, in dem sich Internalisierung und Abbau die Waage halten. Jedoch sind die $t_{1/2}$ endogener lysosomaler Enzyme wesentlich länger (ASA: < 40 Tage (Waheed *et al.*, 1982); Cathepsin D 16 Tage (Waheed *et al.*, 1982); α -Kette der β -Hexosaminidase 7 Tage (Hickman, 1974). Offensichtlich werden lysosomale Enzyme, die über den Biosyntheseweg zum Lysosom gelangen, stabilisierenden Modifikationen unterworfen, die lysosomale Enzyme, die über den Endocytoseweg zu den Lysosomen transportiert werden, nicht erhalten. So könnte z.B. endocytierte [^{125}J]-ASA von oktameren Strukturen im Lysosom ausgeschlossen werden, die für endogene ASA beschrieben wurde (Vagedes *et al.*, 2002). Andererseits wurde die $t_{1/2}$ endocytierter ASA aus [^{35}S]-markierten Sekreten von humanen Fibroblasten in humane Fibroblasten mit 4-8 Tagen bestimmt (Steckel, 1985), was ebenfalls kürzer als die $t_{1/2}$ endogener ASA, aber länger als die der endocytierten [^{125}J]-ASA ist. Unterschiede der $t_{1/2}$ von ASA könnten daher auch vom Zelltyp bzw. Zelltyp-spezifischen Modifikationen (Glycosylierung, Zucker-Sulfatierung) beeinflusst sein. Es ist bekannt, dass die $t_{1/2}$ von [$^{35}\text{SO}_4$]-markierter endocytierter ASA mit 26 h wesentlich kürzer ist als die der [^{35}S]-Methionin-markierten ASA in den gleichen Zellen (Bräulke *et al.*, 1987). Auch für endocytierte rekombinante TPP I liegen unterschiedliche Beobachtungen vor. So beschrieben Lin & Lobel (2001) eine $t_{1/2}$ endocytierter rekombinanter TPP I aus CHO-Zellen in humane Fibroblasten mit 12 Tagen, die durch Aktivitätsmessungen der internalisierten

TPP I bestimmt wurden, während die $t_{1/2}$ der in der vorliegenden Arbeit verwendeten TPP I, die auch aus Sekreten von CHO-Zellen gewonnen wurde (Golabek *et al.*, 2004) und in Kontroll- und *nclf*-Zellen durch Quantifizierung der Radioaktivität ermittelt wurde, bei 3 h lag.

Möglicherweise tragen aber auch strukturelle Veränderungen, die durch die Iodierung von ASA und TPP I induziert werden, zur erhöhten Abbaurate bei. Bei der Markierung wird [125 Jod] über eine Oxidationsreaktion kovalent an Tyrosinreste gebunden (Parker und Strominger, 1983). Jod hat einen Atomradius von 133 pm, während Tyrosin-Wasserstoff, der durch [125 Jod] substituiert wird, nur einen Atomradius von 32 pm hat. Dieser 4-fache Größenunterschied im Atomradius könnte zu Konformationsänderungen oder Veränderungen der biochemischen Eigenschaften der iodierten Proteine führen, wodurch diese Proteine für Proteasen leichter zugänglich wären und schneller degradiert werden könnten. Beispielsweise besteht bei ASA zwischen Tyrosin439 und Threonin408 eine Wasserstoffbrückenbindung, die an der Stabilisierung von ASA-Homodimeren beteiligt ist (Vagedes *et al.*, 2002). Eine [125 J]-Substitution von Wasserstoff an Tyrosin439 könnte also die Dimerisierung von [125 J]-ASA-Monomeren behindern und sie vom nachfolgenden Einbau in endogene ASA-Oligomere ausschließen und zur schnelleren Degradation führen.

5.1.3.2 Spezifität lysosomaler Dysfunktionen bei CLN6

Internalisierte [125 J]-ASA wird in Lysosomen von CLN6-defizienten Zellen signifikant langsamer abgebaut als in Kontrollzellen. Vergleichende Experimente mit [125 J]-TPP I waren nicht aussagekräftig genug, da erstens die endocytierte TPP I noch schneller als ASA abgebaut wird und zweitens ein Teil der [125 J]-TPP I M6P-unabhängig wahrscheinlich an Glycosaminoglykane an der Zelloberfläche bindet und dem lysosomalen Abbau während der hier gewählten Versuchsbedingungen entgeht. Die Bestimmung der Abbaurate der Gesamtheit der Proteine (Abb. 16), Glycoproteine (Abb. 17) oder endocytierter Lipide (Abb. 18) ergab auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und CLN6-defekten Zellen. Diese Befunde lassen vermuten, dass die lysosomale Dysfunktion auf Grund eines Gendefekts von *CLN6* spezifische Reaktionen betreffen, für deren Nachweis endocytierte [125 J]-ASA als Reportermolekül dienen kann. Spezifische Merkmale, in denen sich ASA von anderen lysosomalen Proteinen unterscheidet, sind a) der Oligomerisierungsgrad, sie liegt im Lysosom als Oktamer vor (Lewinsky *et al.*, 2000), und b) die Formylglycinmodifikation im aktiven Zentrum (Dierks *et al.*, 1997), die allerdings bei allen 8 lysosomalen Sulfatasen für die enzymatische Aktivität essentiell ist. Ob bei CLN6 ein spezifisches Enzym oder ein Co-Faktor oder eine essentielle Modifikation betroffen ist, die

für den Abbau von oligomeren Strukturen oder von Sulfatasen wichtig sind, bedarf weiterer Untersuchungen. So könnten Internalisierungsstudien mit β -Galactosidase, die ebenfalls Oktamere bilden kann (Pshezhetsky, 1992) und im Lysosom in einem multimeren Komplex mit Neuraminidase, *N*-Acetylaminogalacto-6-Sulfat-Sulfatase und Cathepsin A vorliegt (Ostrowska *et al.*, 2003), oder mit einer anderen Sulfatase, Arylsulfatase B (ASB), die Tetramere bildet (Weller & Austen, 1983), Hinweise auf spezifische Abbauwege für Oligomere geben. Ob der Abbau von Formylglycin-haltigen Proteinen spezifische Enzyme oder Transporter benötigt, ist unklar und könnte durch Internalisierungsversuche anderer lysosomaler Sulfatasen in CLN6-defekten Zellen untersucht werden.

5.1.3.3 Funktion von CLN6

Eine zentrale Frage ist weiterhin der Zusammenhang zwischen Mutationen im ER-residenten Membranprotein CLN6 und lysosomalen Dysfunktionen, die sich am Abbau endocytierter [125 J]-ASA sichtbar machen lassen (Heine *et al.*, 2004). Erschwerend ist, dass CLN6 keinerlei Homologien zu anderen bekannten Proteinen oder funktionelle Domänen aufweist (Wheeler *et al.*, 2002), die Hinweise auf mögliche Funktionen im ER geben. Denkbar wäre eine Beteiligung von CLN6 an der Generierung bestimmter post-translationaler Modifikationen einzelner oder einer Gruppe lysosomaler Hydrolasen oder von Aktivatorproteinen für lysosomale Hydrolasen. Ein Präzedenzfall für ein ER-lokalisiertes Protein, das spezifisch lysosomale Sulfatasen post-translational modifiziert, ist das „formyl generating enzyme“ (FGE). Dieses lösliche Enzym katalysiert die für die Aktivität der Sulfatasen essentielle Oxidation eines Cysteinrestes zu einem Formylglycin-Rest im aktiven Zentrum der Sulfatasen (Dierks *et al.*, 1997). Kann diese Modifikation auf Grund von FGE-Defizienz nicht durchgeführt werden, kommt es zum Verlust der enzymatischen Aktivität aller Sulfatasen, die sich als „Multiple Sulfatase Defizienz“ (MSD), einer fatalen lysosomalen Speichererkrankung, manifestiert (Dierks *et al.*, 2003). Eine andere Möglichkeit wäre die Beteiligung von CLN6 an Modifikationen lysosomaler Membranproteine im ER, die z.B. an der Acidifizierung des Lysosoms beteiligt sind. Holopainen *et al.* (2001) beschreiben für CLN6-defekte Fibroblasten einen Anstieg des pH-Wertes von 4,0 auf pH 5,08. Eine pH-Verschiebung von 4 auf 5 *in vitro* hat beispielsweise für die lysosomale Protease Cathepsin D, die ein sehr enges pH Optimum besitzt, die Reduktion ihrer proteolytischen Aktivität um ca. 50 % zur Folge (Partanen *et al.* 2003). Ein weiteres NCL-Protein, dessen pH-Optimum *in vitro* bei 3,5 liegt, ist die TPP I (Sohar *et al.*, 1999). Bei einem pH-Sprung von 3,5 auf 4,5 sinkt die TPP I-Aktivität ebenfalls um 50 %. Dies könnte auch *in vivo* zu einem entsprechend verlangsamteten Abbau entsprechender Substrate von Cathepsin D oder TPP I führen.

Im Gegensatz dazu führt die gleiche pH-Verschiebung bei anderen lysosomalen Enzymen, wie der lysosomalen α -Mannosidase oder der α -1,6-Mannosidase, deren pH-Optimum nicht so eng ist, *in vitro* nur zu einer Reduktion der Aktivität um 10 % (Park *et al.*, 2005). Daran wird deutlich, dass nicht alle lysosomalen Hydrolasen von einem erhöhten intra-lysosomalen pH-Wert gleichmäßig in ihrer Aktivität beeinflusst werden müssen. Schließlich könnte die Funktion von CLN6 auch in der Verankerung/Assoziation von löslichen Proteinen/Proteinkomplexen an ER-Membranen liegen. Das oben beschriebene FGE ist z.B. ein lösliches Enzym, das über noch unbekannte Protein-Protein-Wechselwirkungen im ER fixiert ist. In diesem Zusammenhang wäre es hilfreich Proteine zu identifizieren, die mit CLN6 interagieren, um Hinweise auf die Funktion zu bekommen. Mit Hilfe des „Yeast Two-Hybrid“-Systems sollte deshalb versucht werden, Interaktionspartner für die dritte luminaire Domäne des CLN6 (Aminosäuren: 131-186) zu identifizieren. Potentielle Interaktionskandidaten wären somit Proteine, die a) als Transmembran- oder lösliche Proteine im ER lokalisiert sind und dort Funktionen ausüben wie z.B. Enzyme der Cholesterol/Lipid-Synthese, der *N*- oder *O*-Glycosylierung, FGE und permanent an CLN6 binden, oder b) transient mit CLN6 interagieren und später das ER verlassen, um zu anderen subzellulären Organellen wie Endosomen, Plasmamembran oder Lysosomen transportiert oder sezerniert zu werden. Allerdings könnten auch cytosolische Bereiche von CLN6 funktionelle Domänen beinhalten, die beispielsweise das Andocken von Vesikeln, die vom Golgi stammen, an das ER vermitteln. Da Defekte im CLN6 zu einer lysosomalen Speichererkrankung führen, sind vor allem potentielle CLN6-Interaktionspartner auf der luminalen ER-Seite des ER interessant. Ferner sind Mutationen in der 3. luminalen Domäne bei Patienten beschrieben worden, die essentielle Funktion für diese Domäne vermuten lassen (Wheeler *et al.*, 2002; Sharp *et al.*, 2003). Schließlich wurde die 3. luminaire Domäne von CLN6 ausgewählt, weil im „Yeast Two-Hybrid“-System eingesetzte Fragmente eine ausreichende Länge haben müssen, die ansonsten nur bei dem luminalen C-Terminus oder dem cytosolischen N-Terminus von CLN6 gegeben ist, um falsch-positive Interaktionen zu vermeiden.

Von 24 identifizierbaren cDNA-Sequenzen erschienen 18 Kandidaten auf Grund ihrer Lokalisation bzw. Funktion als potentielle CLN6-Wechselwirkungspartner von vornherein als unwahrscheinlich. Nur eine der gefundenen cDNA-Sequenzen kodiert für ein Protein, das permanent in der ER-Membran lokalisiert ist. Die übrigen cDNA-Sequenzen kodieren für Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert bzw. lösliche lysosomale Proteine sind oder sezerniert werden. Bei dem ER-lokalisierten Protein handelt es sich um SREBF2 („sterol regulatory element binding protein“), das ein Transkriptionsfaktor ist (Hua *et al.*, 1993), der in die Membran des ER mit zwei Transmembrandomänen integriert ist, verbunden durch eine luminaire hydrophile

Domäne von 31 Aminosäuren. Die N- und C-terminalen Segmente von SREBF2 sind dem Cytosol zugerichtet (Brown & Goldstein, 1997). Bevor die N-terminale SREBF2-Domäne die Transkription aktivieren kann, und den Stoffwechsel von Cholesterin und von freien Fettsäuren reguliert, sind proteolytische Spaltungen u.a. in der ER-luminalen Domäne notwendig (Wang *et al.*, 1996).

Eine zweite Gruppe potentieller CLN6-Wechselwirkungspartner sind die am ER synthetisierten, löslichen Proteine Transferrin, Transcobalamin 2, Cystatin C und Noelin-2 sowie die β -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals. Diese Proteine werden glycosyliert und z.T. sezerniert. Transferrin und Transcobalamin sind am Fe^{3+} - bzw. am Vitamin B12-Transport beteiligt. Störungen im Eisen- oder Vitamin B12-Haushalt sind bisher bei CLN6-Patienten jedoch nicht beschrieben. Cystatin C ist ein sezernierter Cysteinproteinaseinhibitor, der aus einem nicht glycosylierten Polypeptid besteht und als Monomer in allen Körperflüssigkeiten, aber vor allem in der Cerebrospinalflüssigkeit vorkommt (Mussap & Plebani, 2004). Von dem sezernierten Protein Noelin-2 wird angenommen, dass es eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielt und im Embryo in der Neuralleiste exprimiert wird (Moreno & Bronner-Fraser, 2002; Moreno & Bronner-Fraser, 2005). Die β -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals, *Scn1b*, ist wichtig bei der Entstehung und Weiterleitung von Signalen in elektrisch erregbaren Geweben wie dem ZNS und in Muskeln (George, 2005). Interessanterweise ist die β -Untereinheit dieses spannungsabhängigen Natriumkanals bei vier Wochen alten *nclf*-Mäusen herabreguliert (Dr. C. Heine, persönliche Mitteilung).

Einige der ermittelten cDNA-Sequenzen kodieren für Proteine, die mit einzelnen klinischen CLN6-Symptomen wie Neurodegeneration oder Epilepsie assoziierbar erscheinen. In nachfolgenden Experimenten müssen die einzelnen potentiellen Interaktionspartner durch Co-Transformation im „Yeast Two-Hybrid“-System noch ein zweites mal bestätigt werden. Anschließend sollten die potentiellen Interaktionskandidaten mittels weiterer Methoden, wie gezielter „Yeast Two-Hybrid“-Analyse von Full-Length-cDNA-Klonen mit der 3. luminalen Domäne des CLN6-Proteins und einer anderen CLN6-Domäne als Kontrolle sowie durch Immunpräzipitation oder Pull-down-Untersuchungen verifiziert werden.

5.2 Molekularer Mechanismus der veränderten Endocytose CLN6-defekter Zellen

Eine verringerte Degradation internalisierter rekombinanter lysosomaler Enzyme auf Grund lysosomaler Dysfunktionen ist für die temporäre, beobachtete Akkumulati-

on von ASA in CLN6-defekten Zellen verantwortlich zu machen. Daneben war eine erhöhte Endocytoserate der ASA in CLN6-Fibroblasten gegenüber Kontrollen nachweisbar, die auf a) eine erhöhte Anzahl von MPR300 an der Zelloberfläche oder b) eine erhöhte Internalisierungskinetik von MPR300 zurückzuführen sein könnte.

5.2.1 Umverteilung von MPR300 an die Plasmamembran in CLN6-defekten Zellen

Untersuchungen zur Bestimmung der MPR300-Konzentration an der Plasmamembran mit Hilfe von Biotinylierung/Präzipitation, Bindungsverfahren mit M6P-haltigen Liganden oder MPR300-Antikörpern ergab, dass die Zahl der MPR300 an der Zelloberfläche in CLN6-defizienten Zellen bei vergleichbarer Gesamtexpression der MPR300 im Vergleich zu Kontrollen erhöht war (Abb. 8/9). Die Internalisierungskinetik dieser Rezeptoren war unverändert in CLN6-defekten Zellen (Abb. 10). Dies bedeutet, dass sich mehr MPR300 im Recycling-Pool zwischen Endosomen und der Zelloberfläche befinden, die mit unveränderter Kinetik zwischen den Kompartimenten transportiert werden. Die relativ erhöhte Bindung von [125 J]-ASA bei 4° C an der Zelloberfläche von CLN6-defekten Zellen gegenüber der [125 J]-2C2-Antikörper-Bindung lässt vermuten, dass auch die Zahl der MPR46 an der Zelloberfläche erhöht ist. MPR46 können zwar M6P-haltige Liganden an der Zelloberfläche binden, sind aber nicht an der Internalisierung beteiligt (Stein *et al.*, 1987). Eine kurzzeitige Umverteilung von MPR300 aus intrazellulären Kompartimenten an die Plasmamembran, ohne Veränderung der Internalisierungskinetik kann in Fibroblasten und Ratten-Adipocyten durch die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II (IGF I und IGF II), IGF oder Insulin induziert werden (Braulke *et al.*, 1990; Oka *et al.*, 1984). Kontroll- und CLN6-defekte Fibroblasten wurden aber unter gleichen Zellkulturbedingungen kultiviert und die Internalisierung der Liganden unter Serumfreien Bedingungen durchgeführt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die permanente Umverteilung von MPR300 an die Zelloberflächen von CLN6-defekten Zellen auf Wachstumsfaktorunterschiede zurückzuführen ist. Dennoch sollte die Syntheserate und die Sekretionsrate von in Fibroblasten produzierten IGF (Cohick & Clemmons, 1993) untersucht werden, da auch bekannt ist, dass die Bindung von IGF II an den MPR300 die Bindung und Internalisierung des lysosomalen Enzyms β -Galactosidase hemmen kann (Kiess *et al.*, 1990).

Für die Anwesenheit von MPR300, aber auch von MPR46, an der Zelloberfläche ist der Phosphorylierungsgrad der cytosolischen Domäne entscheidend. Der MPR300 besitzt zwei Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II (CK II) (Serin82 und Serin157) und mehrere noch nicht identifizierte PKC-phosphorylierbare Serin-Res-

te (Rosorius *et al.*, 1993a). Der MPR46 ist am Serin-Rest 56 der cytoplasmatischen Domäne durch CK II phosphorylierbar (Hemer *et al.*, 1993). Diese Phosphorylierung ist essentiell für den Transport zur Zelloberfläche (Breuer *et al.*, 1997). Außerdem ist die Inkubation von Fibroblasten in Gegenwart von Aktivatoren der PKC mit einer Hyperphosphorylierung des MPR300 und einer Umverteilung an die Zelloberfläche verbunden (Braulke *et al.*, 1990, Hu *et al.*, 1990). Mit der PKC-induzierten Umverteilung kann auch eine erhöhte Liganden-Bindungsaffinität der MPR300 verbunden sein (Braulke *et al.*, 1990), die bislang in CLN6-defekten Fibroblasten noch nicht untersucht wurde. Außerdem kann der „transforming growth factor β (TGF- β)-Rezeptor V nach Bindung von TGF- β MPR300 phosphorylieren und die Aufnahme M6P-haltiger Liganden erhöhen (Liu *et al.*, 1999). Umgekehrt führt eine Inhibierung der Protein Phosphatase 2A, die MPR300 *in vitro* dephosphoryliert, *in vivo* zu einer Depletion der MPR300 an der Plasmamembran (Braulke & Mieskes, 1992). Es bleibt zu untersuchen, ob in CLN6-defekten Zellen die Aktivität von PKC, CK II bzw. Protein Phosphatase 2A verändert ist.

5.2.2 Einfluss von Inositolphosphaten auf die Endocytose

Es liegen Ergebnisse vor, dass *nclf*-Mäuse im Hirn erhöhte Spiegel an Inositolphosphaten, insbesondere Ins(1,2,3,4,5,6)Phosphat (IP_6), aufweisen (persönliche Mitteilung, T. Braulke, Hamburg). IP_6 verstärkt die Dynamin-abhängige Endocytose durch Aktivierung von PKC (Hoy *et al.*, 2002), die auch für eine Umverteilung von MPR300 an die Plasmamembran in CLN6-defekten Zellen verantwortlich sein könnte (Braulke *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob auch erhöhte Inositolphosphatspiegel in CLN6-defekten Zellen für die gesteigerte Endocytose von [^{125}J]-ASA bzw. die Umverteilung der MPR300 verantwortlich/beteiligt sind, wurde zunächst eine Analyse der IP -Spiegel in Kontroll- und *nclf*-Zellen durchgeführt, die jedoch auf Grund zu niedriger Gesamtkonzentrationen an Inositolphosphaten in den murinen Fibroblasten nicht auswertbar waren.

In einem anderen experimentellen Ansatz wurde versucht, die zelluläre IP_6 -Konzentration durch stabile Überexpression der humanen IP_3 -Kinase in HEK293-Zellen zu erhöhen, um anschließend diese Zellen für [^{125}J]-ASA Endocytose-Experimente zu verwenden. Das Substrat der IP_3 -Kinase ist Ins(1,4,5) P_3 , das durch Phospholipase C an der Plasmamembran aus PI(4,5) P_2 gebildet wird (Menniti *et al.*, 1990). Nach Phosphorylierung von Ins(1,4,5) P_3 durch die IP_3 -Kinase entsteht Ins(1,3,4,5) P_4 , welches durch weitere Phosphorylierung durch die Inositolphosphat Multikinase (IPMK), die auch 5-Kinase genannt wird, in Ins(1,3,4,5,6) P_5 umgewandelt wird (Irvine & Shell 2001, Chang & Majerus, 2006). Diesen Experimenten lag der Ge-

danke zu Grunde, dass eine Erhöhung der Fraktion von InsP_4 fließend zu einer Erhöhung von InsP_5 -Spezies und IP_6 führt. Die lediglich leicht erhöhten Spiegel an $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ in IP_3 -Kinase-überexprimierenden Zellen reichten aber offensichtlich nicht aus, die IP_6 -Konzentration zu erhöhen bzw. die Endocytose von [^{125}J]-ASA zu steigern (Abb. 20) oder CLN6-ähnliche Verhältnisse nachzustellen. Es wurde berichtet, dass die Erhöhung der zellulären IP_6 -Konzentration durch Überexpression der 5/6-Kinase erreicht werden kann. Die 5/6-Kinase phosphoryliert $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$, das anschließend durch eine 5-Kinase und eine 2-Kinase zu IP_6 phosphoryliert werden kann (Verbsky *et al.*, 2005). Laufende Untersuchungen zur Überexpression der 5/6-Kinase sollen klären, ob erhöhte IP_6 -Spiegel eine Umverteilung der MPR300 bei der Rezeptor-abhängigen Endocytose vermitteln kann.

5.3 Akkumulation von Gangliosiden im Cortex von *nclf*-Mäusen

Gendefekte im lysosomalen Abbau von Gangliosiden verursachen zwei gut beschriebene aber seltene lysosomale Speichererkrankungen, die GM1- und GM2-Gangliosidose. Da Ganglioside am häufigsten im ZNS vorkommen, ist es nicht überraschend, dass Defekte im Abbau von Gangliosiden verheerende Auswirkungen auf das Hirn haben. Neben den Gangliosidosen gibt es weitere lysosomale Speichererkrankungen, wie Niemann-Pick Typ A-D, Morbus Gaucher oder Mucopolysaccharidosen, bei denen die Akkumulation von Gangliosiden sekundär erfolgt (Walkley, 2004). Keines dieser Ganglioside kann unter nicht-pathologischen Bedingungen in ausdifferenzierten Neuronen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals systematisch die Gangliosidmuster in Cortices von *nclf*-Mäusen verschiedener Altersstufen untersucht. Bereits ab einem Alter von 5 Wochen war eine Akkumulation von GM2 und GM3 in *nclf*-Mäusen nachweisbar. Während der relative Anteil von GM2 bis zur ältesten getesteten Altersstufe (25. Woche) gleich blieb, nahm er für GM3 ab der 19. Lebenswoche zu. Bei den Kontrollmäusen war in einem Alter von 25 Wochen weder GM2 noch GM3 detektierbar (Abb. 21). Bis vor kurzem war die Bedeutung von Gangliosid-Ablagerungen bei lysosomalen Speichererkrankungen, bei denen dieses Phänomen auftrat noch relativ unklar. GM2 wird unter nicht-pathologischen Bedingungen während der Hirnentwicklung erhöht in pyramidalen Neuronen exprimiert und spielt eine Rolle bei der Bildung von Dendritenbäumen dieser Zellen (Walkley *et al.*, 2000). Die Akkumulation von GM2 bei den Gangliosidosen und Glycosphingolipidosen führt zur Entstehung ektopischer Neuriten, sogenannten Meganeuriten, die

aus Axonhügeln von Pyramidalzellen des Cortex hervorgehen (Walkley *et al.*, 1995). Auch bei Patienten mit juveniler und adulter NCL wurden Meganeuriten nachgewiesen (Braak & Braak 1987, Paula-Barbosa *et al.*, 1982), die jedoch keine ektopischen Dendriten aufwiesen. Weiterhin wurde eine erhöhte Expression von GM2 auch bei juveniler NCL in Glia-Zellen und nicht-pyramidalen Neuronen detektiert (Walkley, 1995). Ob auch bei CLN6 die erhöhte Konzentration von GM2 regional zur Ausbildung von Meganeuriten führt, muss untersucht werden. Bei Niemann-Pick Typ C wurde eine konsistente spezifische Akkumulation von GM3 in Cholesterolspeichernden Neuronen beschrieben (Gondre-Lewis *et al.*, 2003). Daher sollte auch auf zellulärer Ebene mit Hilfe von *in situ*-Immunfluoreszenzanalysen und Immunhistochemie untersucht werden, ob in GM3-positiven Neuronen von *nclf*-Mäusen eine Cholesteroll-Akkumulation nachweisbar ist. Es wird angenommen, dass GM2 und GM3 in Neuronen die Zellerkennung und Synaptogenese beeinflussen (Walkley *et al.*, 1991), die Apoptose fördern (Huang *et al.*, 1997) und abnormes Neuritenwachstum induzieren (Walkley *et al.*, 1988). Bei Mucopolysaccharidose Typ I gilt die Akkumulation von GM2 und GM3 als Marker für die Progression des neurodegenerativen Prozesses, der durch Adeno-assoziierte Virus 2 (AVV2)-vermittelte intrakranielle Gentherapie für die defekte α -Iduronidase bei der Maus rückgängig gemacht werden kann (Desmaris *et al.*, 2004). Für die Akkumulation von GM1-Gangliosid bei der GM1- β -Galactosidase-Defizienz konnte erstmals der Pathomechanismus aufgeklärt werden, der zur Neurodegeneration führt (Tessitore *et al.*, 2004). Neben der Akkumulation im Lysosom steigt die Konzentration von GM1 stark im ER der β -Galactosidase-defizienter Zellen an und führt zur Aktivierung eines Apoptoseprogramms durch Freisetzung der intraluminalen Calcium-Vorräte aus dem ER. Die Gründe für den Untergang von Neuronen und Photorezeptorzellen, für inflammatorische Prozesse und/oder Apoptose sind bei NCL allgemein unklar. Allerdings wurde die Akkumulation von palmitoyliertem GAP-43 im ER von CLN1-defizienten Neuronen für die Auslösung des „unfolded protein response“ (UPR) verantwortlich gemacht (Zhang *et al.*, 2006). Die Ablagerung der Ganglioside GM2 und GM3 im Hirn der *nclf*-Mäuse könnte an der Neurodegeneration beteiligt sein. In einem Maus-Modell für die Sandhoff'sche Krankheit, bei der GM2 akkumuliert, ist die Aufnahme von Ca^{2+} in ER-haltige Microsomen stark erniedrigt (Pelled *et al.*, 2003). Dieser Effekt kann aufgehoben werden, wenn die Mäuse mit einem spezifischen Inhibitor der Glycolipidsynthese (N-Butylmethoxynojirycin) behandelt werden, der zur Reduktion der GM2-Ablagerung führt. Für die Funktion zahlreicher Ca^{2+} -bindender Proteine im ER, die an der Faltung neusynthetisierter Proteine beteiligt sind, wie BiP und Proteindisulfidisomerase ist die Aufrechterhaltung einer hohen Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des ER durch Ca^{2+} -Pumpen in der ER-Membran essentiell (Macer & Koch, 1988). Eine Störung der Ca^{2+} -Konzentration könnte zur Anhäufung falsch-gefalteter

Proteine und somit zur Aktivierung des UPR und Einleitung eines ER-induzierten Apoptoseprogramms führen. Dies spricht für einen Einfluss von GM2 auf die Ca^{2+} -Homeostase, die wiederum zu einer erhöhten Sensitivität der Neuronen gegenüber Stress und schließlich zum Zelltod führen könnte. Auch wenn *nclf*-Mäuse im Vergleich zu den Sandhoff-Mäusen GM2 nicht stark akkumulieren, wäre für CLN6 ein solcher Mechanismus denkbar. Die Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel und der des ER in primär-kultivierten *nclf*-Neuronen oder ähnliche *in vitro* Experimente mit Microsomen könnten darüber Aufschluss geben.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) sind eine der am weitesten verbreiteten neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter. NCLs, die sich genetisch und klinisch in mindestens 8 Formen (CLN1-CLN8) einteilen lassen, werden den lysosomalen Speichererkrankungen zugeordnet. Der den NCLs zugrunde liegende Pathomechanismus der Neurodegeneration ist weitgehend unklar. *CLN6* kodiert für ein ER-residentes polytopes Transmembranprotein unbekannter Funktion, das ubiquitär exprimiert wird. Defekte im *CLN6*-Gen, die die spätinfantile variante Form der NCL verursachen, führen spezifisch zum Untergang neuronaler Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von CLN6-Patientenfibroblasten und primär kultivierten Fibroblasten der *nclf*-Maus, einem natürlich vorkommenden Tiermodell für CLN6, mittels verschiedener biochemischer und zellbiologischer Methoden untersucht, welchen Einfluss der CLN6-Defekt auf den Biosyntheseweg und endocytotischen Weg zum Lysosom hat und es wurde gezeigt, dass in CLN6-defekten Fibroblasten

- die Synthese, proteolytische Prozessierung und der Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme, wie Cathepsin D, normal verläuft;
- nach Mannose-6-Phosphat (M6P)-abhängiger Endocytose eines [¹²⁵J]-markierten lysosomalen Enzyms, der Arylsulfatase A (ASA), die Menge des internalisierten Enzyms 2,5-fach erhöht war, während die Aufnahme der lysosomalen [¹²⁵J]-Tripeptidyl Peptidase I (TPP I) nur 1,2-fach und die von [¹²⁵J]-Transferrin nicht gesteigert war;
- die erhöhte Akkumulation von [¹²⁵J]-ASA nicht auf eine Anreicherung in prä-lysosomalen Kompartimenten zurückzuführen ist;

- weder der allgemeine Proteinabbau noch die Degradation von Glycoproteinen und aufgenommenen Lipiden (Sphingomyelin) verändert ist und internalisierte ASA als Marker für spezifische lysosomale Dysfunktionen eingesetzt werden kann;
- neben lysosomalen Dysfunktionen die intrazelluläre Akkumulation von endocytierter [125 J]-ASA auf eine gesteigerte Endocytose zurückzuführen ist, die auf einer erhöhten Zahl von 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren an der Zelloberfläche beruht;
- die Beteiligung erhöhter Ins(1,4,5,6)P₄- und Ins(1,3,4,5,6)P₅-Spiegel an der Umverteilung von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren als unwahrscheinlich angesehen werden kann.
- In Cortices von *nclf*-Mäusen verschiedener Altersstufen (4-25 Wochen) sind erhöhte Konzentrationen der Ganglioside GM2 und GM3 nachweisbar, die nicht in 25 Wochen-alten Kontrollmäusen detektierbar waren. Damit scheinen auch in *nclf*-Mäusen ähnliche, jedoch nicht so ausgeprägte, Mechanismen der Neurodegeneration abzulaufen wie bei anderen Tiermodellen lysosomaler Speichererkrankungen.
- Mit Hilfe des „Yeast Two Hybrid“-Systems, bei dem die dritte luminaire Schleife des CLN6-Proteins als Köder eingesetzt wurde, konnten erstmalig potentielle Interaktionspartner des CLN6-Proteins identifiziert werden, die die Analyse der Funktion des CLN6-Proteins stimulieren könnten.

Kapitel 7

Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
AD	Aktivierungsdomäne
ASA	Arylsulfatase A
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	copy-DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
c.p.m.	„counts per minute“ (Impulse pro Minute)
Ctsd/CTSD	Murines/humanes Cathepsin D
DNA-BD	DNA-Bindungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ø	Durchmesser
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FKS	fötale Kälberserum
GAL1-UAS	„GAL1-upstream activating sequence“
h	Stunde
HEK 293	„human embryonal kidney“ 293
HEPES	N-[Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	horseradish peroxidase
kb	kilo Basen

kDa	kilo Dalton
k.o.	Knock out
LB	liquid broth
min	Minute
M6P	Mannose-6-Phosphat
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
NaAc	Natriumacetat
NCL	Neuronale Ceroid Lipofuszinose
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate-buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Synthetische Dextrose
Stabw	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TBS	„Tris buffered saline“
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
UPR	„unfolded protein response“
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nerven System

Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, da in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich ist.

7.2 Oligonucleotide (Primer)

Für Klonierung und Sequenzierung und Genotypisierung benutzte Oligonucleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

a) Primer zur Genotypisierung der Cathepsin D-knock-out Mäuse

CtsD <i>for</i>	5'-AGA CTA ACA GGC CTG TTC CC -3'
CtsD <i>rev</i>	5'-TCA GCT GTA GTT GCT CAC ATG-3'
neo <i>for</i>	5'-ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC-3'
neo <i>rev</i>	5'-TTC GTC CAG ATC ATC CTG ATC GAC-3'

b) Primer zur Sublonierung von *CLN6aa137-181* in pGBKT7 und Sequenzierung:

137 <i>for</i>	5'-GGA ATT CCT GCT CTT CAG TGG CTA C -3'
137-181 _{BamH1} <i>rev</i>	5'-CGG GAT CCC GTC ACC ACA TGC ACT GAC CCA G-3'

c) Primer zur Sequenzierung der CLN6-Interaktionskandidaten

Gal4ADSeq <i>for</i>	5'-AAT ACC ACT ACA ATG GAT-3
ADInsert <i>for</i>	5'-GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG AT-3
ADInsert <i>rev</i>	5'-GGA ATT CCG ATG GAG GCG ACG CGG AGG CGG -3

7.3 PCR-Programme

a) Subklonierung von von *CLN6aa137-181* in pGBKT7:

CLN6-Y2H

Deckeltemperatur: 105°C

- 1) 95 °C 2 min
- 2) 95 °C 30 sec
- 3) 55 °C 30 sec
- 4) 68 °C 30 sec
- 5) Go to 2 36 x
- 6) 68 °C 10 min
- 7) 4 °C „for ever“

b) Amplifikation der cDNA der CLN6-Interaktionskandidaten:

pAct2

Deckeltemperatur: 105°C

- 1) 95 °C 2 min
- 2) 95 °C 30 sec
- 3) 62 °C 30 sec
- 4) 72 °C 30 sec
- 5) Go to 2 36 x
- 6) 72 °C 10 min
- 7) 4 °C „for ever“

c) Sequenzierung der CLN6-Interaktionskandidaten:

GC-Sequenz

Deckeltemperatur: 105°C

- 1) 96 °C 5 min
- 2) 956 °C 50 sec
- 3) 50 °C 50 sec
- 4) 60 °C 50 sec
- 5) Go to 2 25 x
- 6) 4 °C „for ever“

7.4 Ermittelte cDNA-Klone aus der humanen Hirnbibliothek

Tabelle 7.1: Datenbankanalyse β - und α -Galactosidase positiver pAct 2-Klone II

Klon	Ermittelte cDNA-Sequenz
1	Homo sapiens transferrin (TF), mRNA gi 21536430 ref NM_001063.2 [21536430]
2	Homo sapiens proteasome (prosome, macro-pain) subunit, beta type, 4 (PSMB4), mRNA gi 22538466 ref NM_002796.2 [22538466]
3	Homo sapiens HSCARG protein (HSCARG), mRNA gi 24476001 ref NM_020677.2 [24476001]

4	Homo sapiens peroxiredoxin 5 (PRDX5), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA gi 32455258 ref NM_012094.3 [32455258]
5	Homo sapiens ribosomal protein SA , transcript variant 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:3141130) gi 33869419 gb BC018867.2 [33869419]
6	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4302394 , partial cds gi 39795397 gb BC063382.1 [39795397]
7	Human DNA sequence from clone RP11-73H14 on chromosome 10 Contains the CSPG6 gene for chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)(BAM, HCAP, SMC3, SMC3L1), a ribosomal protein L7 (RPL7) pseudogene, the 5' end of a novel gene and three CpG islands, complete sequence gi 17381329 emb AL359260.20 [17381329]
8	Homo sapiens cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) (CST3), mRNA gi 19882253 ref NM_000099.2 [19882253]
9	Homo sapiens chromosome 17, clone RP13-1277B16 , complete sequence gi 24414461 gb AC129919.9 [24414461]
10	Homo sapiens RNA binding motif protein 4 , mRNA (cDNA clone MGC:8418 IMAGE:2820928), complete cds gi 33991040 gb BC000307.2 [33991040]
11	TPA: Homo sapiens NOELIN2_V1 (OLFM2) gene, complete cds gi 46575885 tpg BK001428.1 [46575885]
12	Homo sapiens RNA binding motif protein 9 mRNA , complete cds gi 19584571 gb AY072786.1 [19584571]
13	Homo sapiens solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2 (SLC3A2), transcript variant 3, mRNA gi 65506890 ref NM_002394.4 [65506890]

14	Homo sapiens cytochrome b-245 , alpha polypeptide, mRNA (cDNA clone MGC:2279 IMAGE:3502788), complete cds gi 13623676 gb BC006465.1 [13623676]
15	Homo sapiens enoyl Coenzyme A hydratase 1 , peroxisomal (ECH1), mRNA gi 70995210 ref NM_001398.2 [70995210]
16	Homo sapiens NODAL modulator 2 (NOMO2) , transcript variant 2, mRNA gi 51944972 ref NM_173614.2 [51944972]
17	Homo sapiens angiopoietin-like 1 , mRNA (cDNA clone IMAGE:5754129) gi 28839485 gb BC047670.1 [28839485]
18	Homo sapiens nuclear receptor co-repressor 1 (NCOR1) , mRNA gi 22538460 ref NM_006311.2 [22538460]
19	Homo sapiens enoyl Coenzyme A hydratase , short chain, 1, mitochondrial, mRNA (cDNA clone IMAGE:3875751) gi 15301568 gb BC013264.1 [15301568]
20	Homo sapiens sterol regulatory element binding transcription factor 2 (SREBF2) , mRNA gi 27477112 ref NM_004599.2 [27477112]
21	Homo sapiens TCN2 full length open reading frame (ORF) cDNA clone (cDNA clone C22ORF:pGEM.TCN2.V2) gi 47678712 emb CR456591.1 [47678712]
22	Homo sapiens BAC clone RP11-758P17 from 7 , complete sequence gi 16306521 gb AC092849.4 [16306521]
23	Homo sapiens sodium channel, voltage-gated, type I, beta , mRNA (cDNA clone IMAGE:4585335), partial cds gi 40225908 gb BC021266.2 [40225908]
24	Homo sapiens sodium channel, voltage-gated, type I, beta , mRNA (cDNA clone IMAGE:4585335), partial cds gi 40225908 gb BC021266.2 [40225908]

7.5 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30 % / Bisacrylamid 0,8 %	Roth, Karlsruhe
Adenin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose für DNA- Gelelektrophorese	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- α - Galactopyranisid (X- α Gal)	MP-Biomedicals, Eschwege
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β - Galactopyranisid (X- β Gal)	MP-Biomedicals, Eschwege
Bromphenolblau	BioRad, München
Coomassie R, Serva Blue	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
ECL-Reagenz (Super Signal)	Pierce, Rockford, IL, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
L-Histidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lithiumacetat (LiAc)	Merck, Darmstadt
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Mannose-6-Phosphat Barium-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mannose-6-Phosphat Dinatrium- Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim

Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Para-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepton	Roth, Karlsruhe
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Protein A Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Silbernitrat (AgNO_3)	Merck, Darmstadt
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TE- MED)	BioRad, München
L-Treonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Serva, Heidelberg
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Valin	Sigma-Aldrich, Steinheim
UltraLink® Immobilized Strepta- vidin Plus	Pierce, Rockford, IL, USA
Uracil	Sigma-Aldrich, Steinheim

7.6 Geräte

ABI-Sequenator 337	Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, USA
Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Thermocycler T-Personal	Biometra, München
LighCycler	Roche, Mannheim
Dounce-Homogenisator	Wheaton, Millville, USA
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt der Universität Göttingen

Drygalski-Spatel	Schütt Labortechnik, Göttingen
Einfriebehälter, „Nagene[2122] Cryo 1°C Freezing Container“	Nalgene, Rochester, NY, USA
Eismaschine AF 10	Scotsman
Elektrophoresekammern für Aga- rosegele	BioRad, München
Elektrophoresekammern für	Hoefer Scientific Instruments, USA
Polyacrylamidgele	
Filmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Modell Gevamic 60	
Gammastrahlenzähler, 1470 Wi- zard[2122]	Wallac, Finnland
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick, Edison
Geltrockner, Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Sc., Edison
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
 <u>Mikroskope:</u>	
konfokales Laserscanning Mikro- skop	Leica, Bensheim
Modell TSC SL	
Phasenkontrastmikroskop,	Zeiss, Oberkochen
Modell ID 03	
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert	Zeiss, Oberkochen
100	
Fraktionssammler, AUTO DENSI- FLOW	Labconco, OR, USA
Zusatzausstattung für das Axio- vert 100:	
DP 50-Kamera	Olympus, Hamburg
Software: Analysis Soft Imaging System	
Fluoreszenzfilter für das Axiovert 100:	
Fluorochrom:	Anregungsfilter: Farbteiler: Emissi- onsfilter:
FITC, Cy2	BP 450-490 FT 510 LP 515-565
Texas-Rot, Cy3	BP 546 FT 580 LP 590
Mikrowellenherd	Bosch

Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hoefer Scientific Instruments, USA
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Netzgerät EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
Photometer, Model RS 232 C	Eppendorf Hamburg
Sterilbank HS 12	Heraeus Osterode
Sterilfilter Minisart NML	Sartorius AG, Göttingen
Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55	Air Liquide, Frankreich
Tissue Tearer	Dremel, USA
UV-Handlampe (312 nm und 254 nm)	Bachofer, Reutlingen
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA
Vakuum Konzentrator Model Speed Vac SPD 111V	Vacuubrand, Wertheim
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich
Wasserbad Typ HOR 7225	Köttermann, Häningsen
<u>Zentrifugen:</u>	
Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Hanau
Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417	Eppendorf Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf Hamburg
Sorvall RC 5C PLUS	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery M120	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Du Pont OTD SOB	Du Pont de Nemours, Bad Homburg
<u>Rotoren für die Minifuge:</u>	
F-45-30-11	Heraeus, Osterode
F-45-24-11	Heraeus, Osterode
Rotoren für die	
<u>Sorvall-Zentrifugen:</u>	
SS-34	Eppendorf Hamburg
SLA-3000	Eppendorf Hamburg

Rotoren für die Ultrazentrifugen:

S 100 AT4, S55S, SW55

Kendro Laboratory Products,
Newtown, Connecticut USA**7.7 Verbrauchsmaterialien**

Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ²	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen, Ø 36, 60 und 100 mm	Greiner, Nürtingen
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulose Blotting Membrane 0,2 µm	BioRad, München
Objektträger und Deckgläser	Menzel Gläser
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Das- se
Whatman GB003-Papier, extra dick	Schleicher & Schüll, Das- sel
Zentrifugenbecher:	
SS-34 Polypropylen	Nalgene, München
JA-10 Polypropylen	Nalgene, München

Literaturverzeichnis

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston R.E.; Moore, D.D.; Seidmann, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (2000)

Current protocols in molecular biology. in: *Current Protocols*, Vol I-IV, John Wiley & Sons Inc, USA

Behnia, R.; Munro, S. (2005)

Organelle identity and the signposts for membrane traffic.
Nature. **438**, 597-604.

Bernardini, F.; Warburton, M. J. (2002)

Lysosomal degradation of cholecystinin-(29-33)-amide in mouse brain is dependent on tripeptidyl peptidase-I: implications for the degradation and storage of peptides in classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.

Biochem. J. **366**, 521-9.

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. (1987)

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.

Electrophoresis **8**, 93-99.

Boldrini, R.; Biselli, R.; Santorelli, F.M.; Bosman, C. (2001)

Neuronal ceroid lipofuscinoses: an ultrastructural, genetic, and clinical study report.

Ultrstruct. Pathos. **25**, 51-58.

Bonner, W.M.; Laskey, R. (1974)

A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels.

Eur. J. Biochem. **46**, 83-88.

Braak, H.; Braak, E. (1987)

Projection neurons of basolateral amygdaloid nuclei develop meganeurites in juvenile and adult human neuronal ceroid lipofuscinosis.

Clin. Neuropathol. **6**, 116-119.

Braulke, T.; Hille, A.; Huttner, W.B.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987)

Sulfated oligosaccharides in human lysosomal enzymes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **143**, 178-185.

- Braulke, T.; Gartung, C.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987)**
Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes?
J. Cell. Biol. **104**, 1735-1742.
- Braulke, T.; Tippmer, S.; Chao H.J.; von Figura, K. (1990)**
Insulin-like growth factors I and II stimulate endocytosis but do not affect sorting of lysosomal enzymes in human fibroblasts.
J. Biol. Chem. **265**, 6650-6656.
- Braulke, T.; Tippmer S, Chao HJ, von Figura K. (1990)**
Regulation of mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor distribution by activators and inhibitors of protein kinase C.
Eur. J. Biochem. **189**, 609-616.
- Braulke, T.; Mieskes G. (1992)**
Role of protein phosphatases in insulin-like growth factor II (IGF II)-stimulated mannose 6-phosphate/IGF II receptor redistribution.
J. Biol. Chem. **267**, 17347-17353.
- Braulke, T. (1996)**
Origin of lysosomal proteins.
Subcell. Biochem. **27**, 15-49.
- Breuer, P.; Körner, C.; Böker, C.; Herzog, A.; Pohlmann, R.; Braulke, T. (1997)**
Serine phosphorylation site of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for transport to the plasmamembrane in Madin-Darby canine kidney and mouse fibroblast cells.
Mol. Biol. Cell **8**, 567-576.
- Brown, M.S.; Goldstein, J.L. (1997)**
The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor.
Cell. **89**, 331-340.
- Bronson, R.T.; Donahue, L.R.; Johnson, K.R.; Tanner, A.; Lane, P.W.; Faust, J.R. (1998)**
Neuronal ceroid lipofuscinosis (nclf), a new disorder of the mouse linked to chromosome 9.
Am. J. Med. Genet. **26**, 289-297.
- Camp, L.A.; Verkruyse, L.A.; Afendis, S.J.; Slaughter, C.A.; Hofmann S.L. (1994)**
Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase.
J. Biol. Chem. **269**, 23212-23219.
- Camp, L.A.; Hofmann, S.L. (1993)**
Purification and properties of a palmitoyl-protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras.
J. Biol. Chem. **268**, 22566-22574.
- Chang, S.C.; Majerus, P.W. (2006)**

- Inositol polyphosphate multikinase regulates inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **339**, 209-216.
- Chen, H.J.; Remmler, J.; Delaney, J.C.; Messner, D.J.; Lobel, P. (1993)**
Mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. A consensus casein kinase II site followed by 2 leucines near the carboxyl terminus is important for intracellular targeting of lysosomal enzymes.
J. Biol. Chem. **268**, 22338-22346.
- Chen, H.J.; Yuan, J.; Lobel, P. (1997)**
Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain. An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting.
J. Biol. Chem. **272**, 7003-7012.
- Cho, S.; Dawson, P.E.; Dawson, G. (2000)**
In vitro depalmitoylation of neurospecific peptides: implication for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.
J. Neurosci. Res. **59**, 32-38.
- Cho, S.K.; Gao, N.; Pearce, D.A.; Lehrman, M.A.; Hofmann, S.L. (2005)**
Characterization of lipid-linked oligosaccharide accumulation in mouse models of Batten disease.
Glycobiology. **15**, 637-648.
- Ciechanover, A.; Schwartz, A.L.; Dautry-Versat, A.; Lodish, H.F. (1983)**
Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in human hepatoma cell line
J. Biol. Chem. **258**, 9681-9689.
- Clague, M.J. (1999)**
Membrane transport: Take your fusion partners.
Curr. Biol. **9**, R258-60.
- Claussen, M.; Kübler, B.; Wendland, M.; Neifer, K.; Schmidt, B.; Zapf, J.; Braulke, T. (1997)**
Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D.
Endocrinology. **138**, 3797-3803.
- CLONTECH, Heidelberg**
MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual
PT3247, 1999.
- CLONTECH, Heidelberg**
Yeast Protocols Handbook
PT3024-1, 2001.
- Cohick, W.S.; Clemmons, D.R. (1993)**
Regulation of IGFBP secretion and modulation of cell growth in MDBK cells.
Growth. Regul. **3**, 20-23.

Cook, R.W.; Jolly, R.D.; Palmer, D.N.; Tammen, I.; Broom, M.F.; McKinnon R. (2002)

Neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep.

Aust. Vet. J. **80**, 292-297.

Cooper, J.D. (2003)

Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofuscinosis.

Curr. Opin. Neurol. **16**, 121-128.

Desmaris, N.; Verot, L.; Puech, J.P.; Caillaud, C.; Vanier, M.T.; Heard, J.M. (2000)

Prevention of neuropathology in the mouse model of Hurler syndrome. *Ann. Neurol.* **56**, 68-76.

Dierks, T.; Schmidt, B.; von Figura, K. (1997)

Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **94**, 11963-11968.

Dierks, T.; Schmidt, B.; Borissenko, L.V.; Peng, J.; Preusser, A.; Mariappan, M.; von Figura, K. (2003)

Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme.

Cell. **113**, 435-444.

Di Guglielmo, G.M.; Le Roy, C.; Goodfellow, A.F.; Wrana, J.L. (2003)

Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover.

Nat. Cell. Biol. **5**, 410-421.

Drögemüller, C.; Wöhlke, A.; Distl, O. (2005)

Characterization of candidate genes for neuronal ceroid lipofuscinosis in dog.

J. Hered. **96**, 735-738.

Dyken, P.J. (1989)

The neuronal Ceroid lipofuscinoses.

J. Child. Neurol. **4**, 165-174.

Ezaki, J.; Wolfe, L.S.; Higuti, T.; Ishidoh, K.; Kominami, E. (1995)

Specific delay of degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease).

J. Neurochem. **64**, 733-741.

Ezaki, J.; Wolfe, L.S.; Kominami, E. (1996)

Specific delay in the degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is derived from cellular proteolytic dysfunction rather than structural alteration of subunit c.

J. Neurochem. **67**, 1677-1687.

Ezaki, J.; Tanida, I.; Kanehagi, N.; Kominami, E. (1999)

J. Neurochem. **72**, 2573-2582.

Ezaki, J.; Takeda-Ezaki, M.; Kominami, E. (2000)

- Tripeptidyl peptidase I, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product, initiates the lysosomal degradation of subunit c of ATP synthase.
J. Biochem. **128**, 509-516.
- Ezaki, J.; Takeda-Ezaki, M.; Koike, M.; Ohsawa, Y.; Taka, H.; Mineki, R.; Murayama, K.; Uchiyama, Y.; Ueno, T.; Kominami, E. (2003)**
Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein.
J. Neurochem. **87**, 1296-1308.
- Faust, J.R., Rodman, J.S., Daniel, P.F.; Dice, J.F.; Bronson, R.T. (1994)**
Two related proteolipids and dolichol-linked oligosaccharides accumulate in motor neuron degeneration mice (mnd/mnd), a model for neuronal ceroid lipofuscinosis.
J. Biol. Chem. **269**, 10150-10155.
- Fossale, E.; Wolf, P.; Espinola, J.A.; Lubicz-Nawrocka, T.; Teed, A.M.; Gao, H.; Rigamonti, D.; Cattaneo, E.; MacDonald, M.E.; Cotman, S.L. 2004**
Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis.
BMC. Neurosci. **5**, 57-.
- Fürst, W.; Sandhoff, K. (1992)**
Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism.
Biochim. Biophys. Acta. **1126**, 1-16.
- Gao, H.,; Boustany, R.M.; Espinola, J.A.; Cotman, S.L.; Srinidhi, L.; Antonellis, K.A.; Gillis, T.; Qin, X.; Liu, S.; Donahue, L.R., Bronson, R.T.; Faust, J.R.; Stout, D.; Haines, J.L.; Lerner, T.J.; MacDonald, M.E. (2002)**
Mutations in a novel CLN6-encoded transmembrane protein cause variant neuronal ceroid lipofuscinosis in man and mouse.
Am. J. Hum. Genet. **70**, 324-335.
- Gachet, Y.; Codlin, S.; Hyams, J.S.; Mole, S.E. (2005)**
btn1, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the human Batten disease gene CLN3, regulates vacuole homeostasis.
J. Cell. Sci. **118**, 5525-5536.
- Gardiner, R.M. (2000)**
The molecular genetic basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses.
Neurol.Sci. **21**, S35-S41.
- George, A.L. Jr. (2005)**
Inherited disorders of voltage-gated sodium channels.
J. Clin. Invest. **115**, 1990-1999.
- Gerke, V.; Creutz, C.E.; Moss, S.E. (2005)**
Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **6**, 449-461.
- Ghosh, P.; Dahms, N.M.; Kornfeld, S. (2003)**
Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**, 202-212.
- Gieselmann, V.; Pohlmann, R.; Hasilik, A. (1983)**

- Biosynthesis and Transport of Cathepsin D in Cultured Human Fibroblasts.
J. Cell. Biol. **97**, 1-5.
- Gieselmann, V.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1985)**
Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro.
J. Biol. Chem. **260**, 3215-3220.
- Gietz, R.D.; Schiestl, R.H. (1991)**
Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier.
Yeast. **7**, 253-63.
- Goebel, H.H.; Wisniewski, K.E. (2004)**
Current state of clinical and morphological features in human NCL.
Brain Pathol. **14**, 61-69.
- Golabek, A.A.; Kida, E.; Walus, M.; Kaczmarek, W.; Michalewski, M.; Wisniewski, K.E. (2000)**
CLN3 protein regulates lysosomal pH and alters intracellular processing of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor and cathepsin D in human cells.
Mol. Genet. Metab. **70**, 203-213.
- Golabek, A.A.; Kida, E.; Walus, M.; Wujek, P.; Mehta, P.; Wisniewski, K.E. (2003)**
Biosynthesis, Glycosylation, and Enzymatic Processing in Vivo of Human Tripeptidyl-peptidase I
J. Biol. Chem. **278**; 7135-7145,
- Golabek, A.A.; Wujek, P.; Walus, M.; Bieler, S.; Soto, C.; Wisniewski, K.E.; Kida, E. (2004)**
Maturation of human tripeptidyl-peptidase I in vitro.
J. Biol. Chem. **279**, 31058-31067
- Golabek, A.A.; Walus, M.; Wisniewski, K.E.; Kida, E. (2005)**
Glycosaminoglycans modulate activation, activity, and stability of tripeptidyl-peptidase I in vitro and in vivo.
J. Biol. Chem. **280**, 7550-7561.
- Gondre-Lewis, M.C.; McGlynn, R.; Walkley, S.U. (2003)**
Cholesterol accumulation in NPC1-deficient neurons is ganglioside dependent.
Curr. Biol. **13**, 1324-1329.
- Graham, F.L.; Smiley, J.; Russel, W.C.; Nairn, R. (1977)**
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.
J. Gen. Virol. **36**, 59-74.
- Gruenberg, J.; Stenmark, H. (2004)**
The biogenesis of multivesicular endosomes.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **5**, 317-23.
- Guillas, I.; Jiang, J.C.; Vionnet, C.; Roubaty, C.; Uldry, D.; Chuard, R.; Wang, J.; Jazwinski, S.M.; Conzelmann, A. (2003)**

- Human homologues of LAG1 reconstitute Acyl-CoA-dependent ceramide synthesis in yeast.
J. Biol. Chem. **278**, 37083-37091.
- Hall, N.A.; Lake, B.D.; Dewji, N.N.; Patrick, A.D. (1991)**
Lysosomal storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in Batten's disease (ceroid-lipofuscinosis).
Biochem. J. **275**, 269-72.
- Haltia, M. (2003)**
The neuronal ceroid-lipofuscinoses.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. **62**, 1-13.
- Hasilik, A.; Neufeld, E.F. (1980)**
Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts: synthesis as precursors of higher molecular weight.
J. Biol. Chem. **255**, 4937-4945.
- Haucke, V. 2005**
Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis.
Biochem. Soc. Trans. **33**, 1285-1289.
- Heine, C.; Tynnela, J.; Cooper, J.D.; Palmer, D.N.; Elleder, M.; Kohlschütter, A.; Braulke, T. (2003)**
Enhanced expression of manganese-dependent superoxide dismutase in human and sheep CLN6 tissues.
Biochem. J. **376**, 369-76.
- Heine, C.; Koch, B.; Storch, S.; Kohlschütter, A.; Palmer, D.N.; Braulke, T. (2004)**
Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A.
J Biol Chem. **279**, 22347-22352.
- Hemer, F.; Körner,; C. Braulke, T. (1993)**
Phosphorylation of the human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor in the cytoplasmic domain at serine 56.
J. Biol. Chem. **268**, 17108-17113.
- Hellsten, E.; Vesa, J.; Olkkonen, V.M.; Jalanko, A.; Peltonen. L. (1996)**
Human palmitoyl protein thioesterase: evidence for lysosomal targeting of the enzyme and disturbed cellular routing in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.
EMBO J. **15**, 5240-52405.
- Hickman, S.; Shapiro, L.J.; Neufeld, E.F. (1974)**
A recognition marker required for uptake of a lysosomal enzyme by cultured fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **57**, 55-61
- Holopainen, J.M.; Saarikoski, J.; Kinnunen, P.K.; Jarvela, I. (2001)**
Elevated lysosomal pH in neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs).
Eur. J. Biochem. **268**, 5851-5856.

Hoy, M.; Efanov, A.M.; Bertorello, A.M.; Zaitsev, S.V.; Olsen, H.L.; Bokvist, K.; Leibiger, B.; Leibiger, I.B.; Zwiller, J.; Berggren, P.O.; Gromada, J. (2002)

Inositol hexakisphosphate promotes dynamin I- mediated endocytosis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **99**, 6773-6777.

Hu, K.Q.; Backer, J.M.; Sahagian, G.; Feener, E.P.; King, G.L. (1990)

Modulation of the insulin growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in microvascular endothelial cells by phorbol ester via protein kinase C.

J. Biol. Chem. **265**, 13864-13870

Hua, X.; Yokoyama, C.; Wu, J.; Briggs, M.R.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L.; Wang, X. (1993)

SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **90**, 11603-11607.

Hua, Z.; Fatheddin, P.; Graham, T.R. (2002)

An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system.

Mol. Biol. Cell. **13**, 3162-3177.

Huang, J.Q.; Trasler, J.M.; Igdoura, S.; Michaud, J.; Hanal, N.; Gravel, R.A. (1997)

Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases.

Hum. Mol. Genet. **6**, 1879-1885.

Irvine, R.F.; Schell, M.J. (2001)

Back in the water: the return of the inositol phosphates.

Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2**, 327-338.

Isosomppi, J.; Vesa, J.; Jalanko, A.; Peltonen, L. (2002)

Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein.

Hum. Mol. Genet. **11**, 885-891.

Jadot, M.; Canfield, W.M.; Gregory, W.; Kornfeld, S. (1992)

Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor.

J. Biol. Chem. **267**, 11069-11077.

James et al., 1996 Hefe-Stamm AH109

Janes, R.W.; Munroe, P.B.; Mitchison, H.M.; Gardiner, R.M. Mole, S.E. Wallace, B.A. (1996)

A model for Batten disease protein CLN3: functional implications from homology and mutations.

FEBS Lett.; **399**; 75-77.

Janvier, K.; Bonifacino, J.S. (2005)

Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins.

Mol. Biol. Cell. **16**, 4231-4242.

Jarvela, I.; Sainio, M.; Rantamaki, T.; Olkkonen, V.M.; Carpen, O.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1998)

Biosynthesis and intracellular targeting of the CLN3 protein defective in Batten disease.

Hum. Mol. Genet. **7**, 85-90.

Jentsch, T.J.; Stein, V.; Weinreich, F.; Zdebik, A.A. (2002)

Molecular structure and physiological function of chloride channels.

Physiol. Rev. **82**, 503-68.

Jolly, R.D.; Shimada, A.; Dopfmer, I.; Slack, P.M.; Birtles, M.J.; Palmer, D.N.; (1989)

Ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis and sequential neuropathological changes in the ovine model.

Neuropathol: Appl. Neurobiol. **15**, 371-383.

Jolly, R.D.; Walkley, S.U. (1999)

Ovine ceroid lipofuscinosis (OCL6): postulated mechanism of neurodegeneration.

Mol. Genet. Metab. **66**, 376-380.

Johnson, K.F.; Kornfeld, S. (1992a)

The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi.

J. Cell. Biol. **119**, 249-257.

Johnson, K.F.; Kornfeld, S. (1992b)

A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function.

J. Cell. Biol. **267**, 17110-17115.

Junaid, M.A.; Wu, G.; Pullarkat, R.K. (2000)

Purification and characterization of bovine brain lysosomal pepstatin-insensitive proteinase, the gene product deficient in the human late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.

J. Neurochem. **74**, 287-94

Kasper, D.; Planells-Cases, R.; Fuhrmann, J.C.; Scheel, O.; Zeitz, O.; Ruether, K.; Schmitt, A.; Poet, M.; Steinfeld, R.; Schweizer, M.; Kornak, U.; Jentsch, T.J. (2005)

Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration.

EMBO J. **24**, 1079-1091.

Kiess, W.; Thomas, C.L.; Sklar, M.M.; Nissley, S.P. (1990)

Beta-galactosidase decreases the binding affinity of the insulin-like-growth-factor-II/mannose-6-phosphate receptor for insulin-like-growth-factor II.

Eur. J. Biochem. **190**, 71-77.

Kirkham, M.; Fujita, A.; Chadda, R.; Nixon, S.J.; Kurzchalia, T.V.; Sharma, D.K.; Pagano, R.E.; Hancock, J.F.; Mayor, S.; Parton, R.G. (2005)

- Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles.
J. Cell. Biol. **168**, 465-476.
- Kirkham, M.; Parton, R.G. (2005)**
Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers.
Biochim. Biophys. Acta. **1746**, 349-363.
- Körner, C.; Nürnberg, B.; Uhde, M.; Braulke, T. (1995)**
Mannose 6-Phosphate/ Insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins.
J. Biol. Chem. **270**, 287-295
- Koike, M.; Nakanishi, H.; Saftig, P.; Ezaki, J.; Isahara, K.; Ohsawa, Y.; Schulz-Schaeffer, W.; Watanabe, T.; Waguri, S.; Kametaka, S.; Shibata, M.; Yamamoto, K.; Kominami, E.; Peters, C.; von Figura, K.; Uchiyama, Y. (2000)**
Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons.
J. Neurosci. **20**, 6898-6906.
- Kominami, E.; Ezaki, J.; Muno, D.; Ishido, K.,.; Ueno, T.; Wolfe, L.S. (1992)**
Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease)
Biochem. **111**, 278-82.
- Kopra, O.; Vesa, J.; von Schantz, C.; Manninen, T.; Minye, H.; Fabritius, A.L.; Rapola, J.; van Diggelen, O.P.; 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.
Ann. Rev. Cell. Biol. **5**, 483-525.
- Kyttala, A.; Ihrke, G.; Vesa, J.; Schell, M.J.; Luzio, J.P. (2004)**
Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells.
Mol. Biol. Cell. **15**, 1313-1323.
- Le Borgne, R.; Alconada, A.; Bauer, U.; Hoflack, B. (1998)**
The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins.
J. Biol. Chem. **273**, 29451-29461.
- Le Roy, C.; Wrana, J.L. (2005)**
Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **6**, 112-126.
- Lewinski, K.; Chruszcz, M.; Ksiazek, D.; Laidler, P. (2000)**

- Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a new crystal form of arylsulfatase A isolated from human placenta.
Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **56**, 650-2.
- Lin, L.; Lobel P. (2001)**
Production and characterization of recombinant human CLN2 protein for enzyme-replacement therapy in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.
Biochem. J. **357**, 49-55.
- Lin, L.; Sohar, I.; Lackland. H.; Lobel, P. (2001)**
The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH.
J. Biol. Chem. **276**, 2249-2255.
- Liu, Q.; Grubb, J.H.; Huang, S.S.; Sly, W.S.; Huang, J.S. (1999)**
The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a substrate of type V transforming growth factor-beta receptor.
J. Biol. Chem. **274**, 20002-20010
- Llorente, A.; Rapak, A.; Schmid, S.L.; van Deurs, B.; Sandvig, K. (1998)**
Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus.
J. Cell. Biol. **140**, 553-563.
- Lonka, L.; Kyttala, A.; Ranta, S.; Jalanko, A.; Lehesjoki, A.E. (2000)**
The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum.
Hum. Mol. Genet. **9**, 1691-167.
- Lonka, L.; Salonen, T.; Siintola, E.; Kopra, O.; Lehesjoki, A.E.; Jalanko, A. (2004)**
Localization of wild-type and mutant neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 proteins in non-neuronal and neuronal cells.
J. Neurosci. Res. **76**, 862-871.
- Macer, D.R.; Koch, G.L. (1988)**
Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum.
J. Cell. Sci. **91**, 61-70.
- Majerus, P.W. (1992)**
Inositol phosphate biochemistry.
Annu. Rev. Biochem. **61**, 225-250.
- Mayhew, I.G.; Jolly, R.D.; Pickett, B.T.; Slack, P.M. (1985)**
Ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis of blindness in the ovine model.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. **11**, 273-290.
- Menniti, F.S.; Oliver, K.G.; Nogimori, K.; Obie, J.F.; Shears, S.B.; Putney, J.W. Jr. (1990)**
Origins of myo-inositol tetrakisphosphates in agonist-stimulated rat pancreatoma cells. Stimulation by bombesin of myo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate breakdown to myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate.
J. Biol.Chem. **265**, 11167-1176.

Minshall, R.D.; Tiruppathi, C.; Vogel, S.M.; Niles, W.D.; Gilchrist, A.; Hamm, H.E.; Malik, A.B. (2000)

Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway.
J. Cell. Biol. **150**, 1057-1070.

Mitchell, W.A.; Wheeler, R.B.; Sharp, J.D.; Bate, S.L.; Gardiner, R.M.; Ranta, U.S.; Lonka, L.; Williams, R.E.; Lehesjoki, A.E.; Mole, S.E. (2000)

Turkish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN7) may be allelic to CLN8.
Eur. J. Paediatr. Neurol. **5**, 21-27.

Mitchison, H.M.; Lim, M.J.; Cooper, J.D. (2004)

Selectivity and types of cell death in the neuronal ceroid lipofuscinoses.
Brain. Pathol. **14**, 86-96.

Mole, S.; Gardiner, M. (1999)

Molecular genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses.
Epilepsia **3**, 29-32.

Mole, S.E.; Michaux, G.; Codlin, S.; Wheeler, R.B.; Sharp, J.D.; Cutler, D.F. (2004)

CLN6, which is associated with a lysosomal storage disease, is an endoplasmic reticulum protein.
Exp. Cell. Res. **298**, 399-406.

Moreno, T.A.; Bronner-Fraser, M. (2002)

Neural expression of mouse Noelin-1/2 and comparison with other vertebrates.
Mech. Dev. **119**, 121-125.

Moreno, T.A.; Bronner-Fraser, M. (2005)

Noelins modulate the timing of neuronal differentiation during development.
Dev. Biol. **288**, 434-447.

Mukhopadhyay, A.; Talukdar, S.; Bhattacharjee, A.; Ray, K. (2004)

Bioinformatic approaches for identification and characterization of olfactomedin related genes with a potential role in pathogenesis of ocular disorders.
Mol. Vis. **20**, 304-314.

Muschol, N.; Matzner, U.; Tiede, S.; Gieselmann, V.; Ullrich, K.; Braulke, T. (2002)

Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages.
Biochem. J. **368**, 845-853.

Mussap, M.; Plebani, M. (2004)

Biochemistry and clinical role of human cystatin C.
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **41**, 467-550.

Oh, P.; McIntosh, D.P.; Schnitzer, J.E. (1998)

Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium.
J. Cell. Biol. **141**, 101-114.

- Oka, Y.; Mottola, C.; Oppenheimer, C.L.; Czech, M.P. (1984)**
Insulin activates the appearance of insulin-like growth factor II receptors on the adipocyte cell surface.
Proc Natl Acad Sci U S A. **81**, 4028-4032.
- Ostrowska, H.; Krukowska, K.; Kalinowska, J.; Orłowska, M.; Lengiewicz, I. (2003)**
Lysosomal high molecular weight multienzyme complex.
Cell. Mol. Biol. Lett. **8**, 19-24.
- Oswald, M.J.; Palmer, D.N.; Kay, G.W.; Shemilt, S.J.; Rezaie, P.; Cooper, J.D. (2005)**
Glial activation spreads from specific cerebral foci and precedes neurodegeneration in presymptomatic ovine neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6).
Neurobiol. Dis. **20**, 49-63
- Palmer, D.N.; Barns, G.; Husbands, D.R.; Jolly, R.D. (1986)**
Ceroid lipofuscinosis in sheep. II. The major component of the lipopigment in liver, kidney, pancreas, and brain is low molecular weight protein.
J. Biol. Chem. **261**, 1773-1777.
- Palmer, D.N.; Martinus, R.D.; Cooper, S.M.; Midwinter, G.G.; Reid, J.C.; Jolly, R.D. (1989) a**
Ovine ceroid lipofuscinosis. The major lipopigment protein and the lipid-binding subunit of mitochondrial ATP synthase have the same NH₂-terminal sequence.
J. Biol. Chem. **264**, 5736-5740.
- Palmer, D.N.; Fearnley, I.M.; Medd, S.M.; Walker, J.E.; Martinus, R.D.; Bayliss, S.L.; Hall, N.A.; Lake, B.D.; Wolfe, L.S.; Jolly, R.D. (1989) b**
Lysosomal storage of the DCCD reactive proteolipid subunit of mitochondrial ATP synthase in human and ovine ceroid lipofuscinoses.
Adv. Exp. Med. Biol. **266**:211-224.
- Parker, K.C.; Strominger, J.L. (1983)**
Localization of the sites of iodination of human beta 2-microglobulin: quaternary structure implications for histocompatibility antigens.
Biochemistry. **22**, 1145-1153.
- Pearce, D.A.; Sherman, F. (1997)**
BTN1, a yeast gene corresponding to the human gene responsible for Batten's disease, is not essential for viability, mitochondrial function, or degradation of mitochondrial ATP synthase.
Yeast. **13**, 691-697.
- Pearce, D.A.; Sherman, F. (1998)**
A yeast model for the study of Batten disease.
Proc Natl Acad Sci U S A. **95**, 6915-6918.
- Pearce, D.A.; Nosel, S.A.; Sherman, F. (1999)**
Studies of pH regulation by Btn1p, the yeast homolog of human Cln3p.
Mol. Genet. Metab. **66**, 320-323.
- Pardo, C.A.; Rabin, B.A.; Palmer, D.N.; Price, D.L. (1994)**

- Accumulation of the adenosine triphosphate synthase subunit C in the mnd mutant mouse. A model for neuronal ceroid lipofuscinosis.
Am. J. Pathol. **144**, 829-835.
- Park, C.; Meng, L.; Stanton, L.H.; Collins, R.E.; Mast S.W.; Yi, X.; Strachan, H.; Moremen, K.W. (2005)**
Characterization of a human core-specific lysosomal alpha1,6-mannosidase involved in N-glycan catabolism.
J. Biol. Chem. **280**, 37204-37216.
- Parker KC, Strominger JL. (1983)**
Localization of the sites of iodination of human beta 2-microglobulin: quaternary structure implications for histocompatibility antigens.
Biochemistry **22(5)**,1145-1153.
- Partanen, S.; Storch, S.; Loffler, H.G. ; Hasilik, A.; Tyynela, J.; Braulke, T. (2003)**
A replacement of the active-site aspartic acid residue 293 in mouse cathepsin D affects its intracellular stability, processing and transport in HEK-293 cells.
Biochem. J. **369**, 55-62.
- Paula-Barbosa, M.M.; Tavares, M.A.; Lavandeira, M.T. (1982)**
Axonal enlargements (meganeurites) in neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL).
Ultrastruct. Pathol. **3**, 237-242.
- Pelled, D.; Lloyd-Evans, E.; Riebeling, C.; Jeyakumar, M.; Platt, F.M.; Futerman, A.H. (2003)**
Inhibition of calcium uptake via the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a mouse model of Sandhoff disease and prevention by treatment with N-butyldeoxynojirimycin.
J. Biol. Chem. **278**, 29496-29501.
- Pshezhetsky, A.V.; Levashov, A.V.; Wiederschain, G.Ya. (1992)**
Regulation of the GM1-galactosidase supramolecular structure and catalytic activity in vitro.
Biochim. Biophys. Acta. **1122**, 154-160.
- Raiborg, C.; Rusten, T.E.; Stenmark, H. (2003)**
Protein sorting into multivesicular endosomes.
Curr. Opin. Cell. Biol. **15**, 446-455.
- Ramirez-Montealegre, D.; Pearce, D.A. (2005)**
Defective lysosomal arginine transport in juvenile Batten disease.
Hum. Mol. Genet. **14**, 3759-3773.
- Ranta, S.; Zhang, Y.; Ross, B.; Lonka, L.; Takkunen, E.; Messer, A.; Sharp, J.; Wheeler, R.; Kusumi, K.; Mole, S.; Liu, W.; Soares, M.B.; Bonaldo, M.F.; Hirvasniemi, A.; de la Chapelle, A.; Gilliam, T.C.; Lehesjoki, A.E. (1999)**
The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and mnd mutant mice are associated with mutations in CLN8.
Nat. Genet. **23**, 233-6.

Ranta, S.; Topcu, M.; Tegelberg, S.; Tan, H.; Ustubutun, A.; Saatci, I.; Dufke, A.; Enders, H.; Pohl, K.; Alembik, Y.; Mitchell, W.A.; Mole, S.E.; Lehesjoki, A.E. (2004)

Variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis in a subset of Turkish patients is allelic to Northern epilepsy.

Hum. Mutat. **23**, 300-305.

Rosorius, O.; Mieskes, G.; Issinger, O.G.; Körner, C.; Schmidt, B.; von Figura, K.; Braulke, T. (1993)

Characterization of phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of the 300 kDa mannose-6-phosphate receptor.

Biochem. J. **292**, 833-838.

Rous, B.A.; Reaves, B.J.; Ihrke, G.; Briggs, J.A.; Gray, S.R.; Stephens, D.J.; Banting, G.; Luzio, J.P. (2002)

Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes.

Mol. Biol. Cell. **13**, 1071-1082.

Sabharanjak., S.; Sharma, P.; Parton, R.G.; Mayor, S. (2002)

GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway.

Dev. Cell. **2**, 411-423.

Saftig, P. (2005)

Lysosomal membrane proteins.

in *Lysosomes* (Saftig/Eurekah, Landes Bioscience)

Saftig, P.; Hetmann, M.; Schmahl, W.; Weber, K.; Heine, L.; Mossmann, H.; Köster, A.; Hess, B.; Evers, M.; von Figura, K. and Peters, C. (1995)

Mice deficient for the lysosomal proteinase Cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells.

EMBO. **14**, 3599-3608.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science **239**, 487-491.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci USA **74**, 5463-5467.

Sauvonnet, N.; Dujeancourt, A.; Dautry-Varsat, A. (2005)

Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor.

J. Cell. Biol. **168**, 155-163.

Sharp, J.D.; Wheeler, R.; Parker, K.A.; Gardiner, R.M.; Williams, R.E.; Mole, S.E. (2003)

- Spectrum of CLN6 mutations in variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.
Hum. Mutat. **22**, 35-42.
- Shayman, J.A. (2000)**
Sphingolipids.
Kidney. Int. **58**, 11-26.
- Schiestl, R.H.; Gietz, R.D. (1989)**
High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier..
Curr. Genetics **16(5-6)**, 339-46.
- Schu P. (2005)**
Adaptor proteins in lysosomal biogenesis.
in *Lysosomes* (Saftig/Eurekah, Landes Bioscience)
- Schulz, A. Dhar, S.; Rylova, S.; Dbaibo, G.; Alroy, J.; Hagel, C.; Artacho, I.; Kohlschütter, A.; Lin, S.; Boustany, R.M. (2004)**
Impaired cell adhesion and apoptosis in a novel CLN9 Batten disease variant.
Ann. Neurol. **56**, 342-350.
- Schulz, A.; Mousallem, T.; Venkataramani, M.; Persaud-Sawin, D.A.; Zucker, A.; Luberto, C.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Holthuis, J.C.; Jazwinski, S.M.; Kozhaya, L.; Dbaibo, G.S.; Boustany, R.M. (2006)**
The CLN9 protein, a regulator of dihydroceramide synthase.
J. Biol. Chem. **281**, 2784-2794.
- Shajahan, A.N.; Timblin, B.K.; Sandoval, R.; Tiruppathi, C.; Malik, A.B.; Minshall, R.D. (2004)**
Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells.
J. Biol. Chem. **279**, 20392-20400.
- Siintola, E.; Topcu, M.; Kohlschütter, A.; Salonen, T.; Joensuu, T.; Anttonen, A.K.; Lehesjoki, A.E. (2005)**
Two novel CLN6 mutations in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis patients of Turkish origin.
Clin. Genet. **68**, 167-173.
- Sleat, D.E.; Donnelly, R.J.; Lackland, H.; Liu, C.G.; Sohar, I.; Pullarkat, R.K.; Lobel, P. (1997)**
Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.
Science. **277**, 1802-1805.
- Sohar, I.; Sleat, D.E.; Jadot, M.; Lobel P. (1999)**
Biochemical characterization of a lysosomal protease deficient in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (LINCL) and development of an enzyme-based assay for diagnosis and exclusion of LINCL in human specimens and animal models.
J. Neurochem. **73**, 700-711.

Steckel, F.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1985)

Multiple sulfatase deficiency: degradation of arylsulfatase A and B after endocytosis in fibroblasts.

Eur. J. Biochem. **151**, 147-152.

Stein, M.; Zijderhand-Bleekemolen, J.E.; Geuze, H.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987)

Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes.

EMBO J. **6**, 2677-2681.

Stengel, C. (1826)

Account of a singular illness among four siblings in vicinity of Roraas. In Ceroid Lipofuscinosis (Batten disease). K. N. Armstrong, D.; Rider, J.A..

ed. (Amsterdam, Elsevier Biomedical Press). 17-19.

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.

Storch, S.; Braulke, T. (2005)

Transport of lysosomal Enzymes.

in *Lysosomes* (Saftig/Eurekah, Landes Bioscience)

Takei, K.; Yoshida, Y.; Yamada, H. (2005)

Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis.

J. Biochem (Tokyo). **137**, 243-247.

Teixeira, C.A.; Espinola, J.; Huo, L.; Kohlschütter, J.; Persaud Sawin, D.A.; Minassian, B.; Bessa, C.J.; Guimaraes, A.; Stephan, D.A.; Sa Miranda, M.C.; MacDonald, M.E.; Ribeiro, M.G.; Boustany, R.M. (2003)

Novel mutations in the CLN6 gene causing a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.

Hum. Mutat. **21**, 502-508.

Tettamanti, G. (2004)

Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts.

Glycoconj. J. **20**, 301-317.

Tessitore, A.; del P.; Martin, M.; Sano, R.; Ma, Y.; Mann, L.; Ingrassia, A.; Laywell, ED.; Steindler, D.A.; Hendershot, L.M.; d'Azzo, A. (2004)

GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis.

Mol. Cell. **15**, 753-766.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 4350-4354.

Tyynela, J.; Palmer, D.N.; Baumann, M.; Haltia, M. (1993)

- Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis.
FEBS Lett. **330**, 8-12.
- Tyynela, J.; Sohar, I.; Sleat, D.E.; Gin, R.M.; Donnelly, R.J.; Baumann, M.; Haltia, M.; Lobel, P. (2000)**
A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration.
EMBO J. **19**, 2786-2792.
- Vagedes, P.; Saenger, W.; Knapp, E-W.; (2002)**
Driving forces of protein association: the dimer-octamer equilibrium in arylsulfatase A.
Biophys. J. **83**, 3066-3078
- Vesa, J.; Chin, M.H.; Oelgeschlager, K.; Isosomppi, J.; DellAngelica, E.C.; Jalanko, A.; Peltonen, L. (2002)**
Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3.
Mol. Biol. Cell. **13**, 2410-2420.
- Verbsky, J.W.; Chang, S.C.; Wilson, M.P.; Mochizuki, Y.; Majerus, P.W. (2005)**
The pathway for the production of inositol hexakisphosphate in human cells.
J. Biol. Chem. **280**, 1911-1920.
- Verkruyse, L.A.; Hofmann, S.L. (1996)**
Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase.
J. Biol. Chem. **271**, 15831-1586.
- Vines, D.; Warburton, M.J. (1999)**
Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I.
FEBS Lett. **443**, 131-135.
- Walkley, S.U. (1995)**
Pyramidal neurons with ectopic dendrites in storage diseases exhibit increased GM2 ganglioside immunoreactivity.
Neuroscience. **68**, 1027-1035.
- Waheed, A.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1982)**
Synthesis and processing of arylsulfatase A in human skin fibroblasts.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **363**, 425-430
- Walkley, S.U.; Haskins, M.E.; Shull, R.M. (1988) a**
Alterations in neuron morphology in mucopolysaccharidosis type I. A Golgi study.
Acta. Neuropathol. (Berl.). **75**611-620.
- Walkley, S.U.; Siegel, D.A.; Wurzelmann, S. (1988)b**
Ectopic dendritogenesis and associated synapse formation in swainsonine-induced neuronal storage disease.
J. Neurosci. **8**, 445-457.
- Walkley, S.U.; Baker, H.J.; Rattazzi, M.C.; Haskins, M.E.; Wu, J.Y. (1991)**

- Neuroaxonal dystrophy in neuronal storage disorders: evidence for major GABAergic neuron involvement.
J. Neurol. Sci. **104**, 1-8.
- Walkley, S.U. (1995)**
Pyramidal neurons with ectopic dendrites in storage diseases exhibit increased GM2 ganglioside immunoreactivity.
Neuroscience. Oct;68(4):1027-35.
- Walkley, S.U.; Siegel, D.A.; Dobrenis, K. (1995)**
GM2 ganglioside and pyramidal neuron dendritogenesis.
Neurochem. Res. **20**, 1287-1299.
- Walkley, S.U.; Zervas, M.; Wiseman, S. (2000)**
Gangliosides as modulators of dendritogenesis in normal and storage disease-affected pyramidal neurons.
Cereb. Cortex. **10**, 1028-1037.
- Walkley, S.U. (2004)**
Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders.
Semin. Cell. Dev. Biol. **15**, 433-444.
- Wang, X.; Zelenski, N.G.; Yang, J.; Sakai, J.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. (1996)**
Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis.
EMBO J. **15**, 1012-1020.
- Warburton, M.J.; Bernardini, F. (2001)**
The specificity of lysosomal tripeptidyl peptidase-I determined by its action on angiotensin-II analogues.
FEBS Lett. **500**, 145-148.
- Weisz, O.A. (2003)**
Organelle acidification and disease.
Traffic. **4**, 57-64.
- Weller, P.F.; Austen, K.F. (1983)**
Human eosinophil arylsulfatase B. Structure and activity of the purified tetrameric lysosomal hydrolase.
J. Clin. Invest. **71**, 114-123.
- Wheeler, R.B.; Sharp, J.D.; Schultz, R.A.; Joslin, J.M.; Williams, R.E.; Mole, S.E. (2002)**
The gene mutated in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6) and in nelf mutant mice encodes a novel predicted transmembrane protein.
Am. J. Hum. Genet. **70**, 537-542.
- Williams, R.E.; Lake, B.D.; Shap, J.D. (1999)**
CLN6-Variant late infantile/early juvenile NCL.
In: The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease); Goebel, H.H; Mole, S.E.; Lake, B.D. (eds). *IOS Press: Amsterdam*. 102-113.
- Winter, E.; Ponting, C.P. (2002)**

- TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains?
Trends. Biochem. Sci. **27**, 381-383.
- Wisniewski, K.E.; Kida, E.; Golabek, A.A.; Kaczmarek, W.; Connell, F.; Zhong, N. (2001)**
Neuronal ceroid lipofuscinoses: classification and diagnosis.
Adv. Genet. **45**, 1-34.
- Woodman, P.G. (2000)**
Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5.
Traffic. Sep;1, 695-701.
- Yoshikawa, M.; Uchida, S.; Ezaki, J.; Rai, T.; Hayama, A.; Kobayashi, K.; Kida, Y.; Noda, M.; Koike, M.; Uchiyama, Y.; Marumo, F.; Kominami, E.; Sasaki, S. (2002)**
CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis.
Genes. Cells. **7**, 597-605.
- Zeman, W.; Dyken, P. (1969)**
Neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): relationship to amaurotic family idiocy?
Pediatrics. **44**, 570-583.
- Zerial, M.; McBride, H. (2001)**
Rab proteins as membrane organizers.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2**, 107-117.
- Zhang, Z.; Lee, Y.C.; Kim, S.J.; Choi, M.S.; Tsai, P.C.; Xu, Y.; Xiao, Y.J.; Zhang, P.; Heffer, A.; Mukherjee, A.B. (2006)**
Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency mediates the activation of the unfolded protein response and neuronal apoptosis in INCL.
Hum. Mol. Genet. **15**, 337-346.

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Braulke möchte ich für die Bereitstellung des Themas, für die kollegiale Unterstützung dieser Arbeit und die Möglichkeit im Ausland zu arbeiten danken.

Bei Prof. Dr. Konrad Wiese möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich in all meinen Entscheidungen und Unternehmungen unterstützen.

Marc möchte ich für seine beruhigende Wirkung auf mich danken, und mir nahegebracht zu haben, manche Dinge einfach mal „als sportliche Herausforderung“ zu sehen.

Jaana und Sanna und all den anderen Finnen und Finninen sei nicht nur für ihre außerordentliche Gastfreundschaft in Helsinki gedankt, sondern auch für den Versuch, mich an stressfreies Arbeiten zu gewöhnen... leider umsonst...

Inke und Britta bin ich dankbar, dass der Vorrat an Gummibärchen, Euromünzen und ähnlichen Leckereien fast nie versiegt ist. Bernd danke ich für die kleinen sportlichen Aktivitäten, die der Laboralltag so bietet, sowie für seine Diskussionsbereitschaft. Sandra (Pohlsen-Chasen) und Stephan (Nucleo-) Tiede danke ich für die „Eppendorfer Spätzle“- Die will ich auch!!!! Na, und natürlich auch bei Claudia, Franzi, Chris, Stephan Storch, Arne und Maico will ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Volleyballern sei gedankt, dass sie mir die hohe Reisetätigkeit während der Spielsaison nicht übel genommen haben, und mir beim Entspannen geholfen haben, indem ich ihnen ein paar Bälle „um die Ohren hauen“ durfte.

Zu guter letzt will ich Prof. Dr. Hans-Joachim Seitz für die Aufnahme in das GRK336-Molekulare Endokrinologie-Molekularer Stoffwechsel danken sowie all den anderen Mitgliedern für lustige Zeiten - „Enjoy the Palace“.