

UNIVERSITÄT HAMBURG – UNIVERSITÄTSKLINIKUM
EPPENDORF

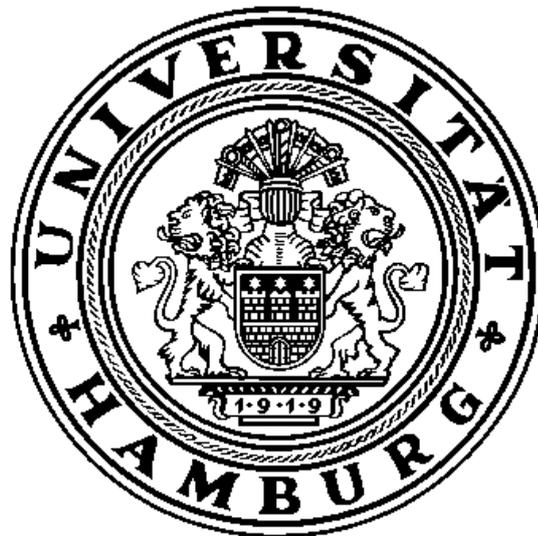
KLINIK FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. K. ULLRICH

**Zur Pathogenese der spätinfantilen neuronalen Ceroidlipofus-
zinose (CLN2): Beeinflussung des Energiestoffwechsels und
der Proliferation an einem zellulären Modell der CLN2-
Krankheit**

DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN DER
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT HAMBURG**



VORGELEGT VON JULIA LIERSCH

HAMBURG, 2006

Angenommen von der Universität Hamburg am: 26.03.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Kohlschütter

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Bentele

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Santer

Der höchste Grad der Arznei ist die Liebe.

Paracelsus (1493-1541)

Meinen Eltern gewidmet

Gefördert wurde diese Arbeit mit einem Stipendium des
Graduiertenkollegs „Molekulare Endokrinologie-
Molekularer Stoffwechsel 336“ des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
Allgemeines über neuronale Ceroidlipofuszinosen	1
1.1.1 Formen der neuronalen Ceroidlipofuszinose	2
Zur Pathogenese der spätinfantilen NCL (CLN2).....	9
1.1.2 Der Speicherprozess bei CLN2: Die Rolle der lysosomalen Tripeptidase 1	9
1.1.3 Der Prozess der Neurodegeneration bei CLN2: Die Rolle von Apoptose und Energiestoffwechsel.....	10
1.1.4 Die humane Zelllinie NT2 als Modell einer neuronalen Zelle....	11
1.1.5 Zellzyklus und Apoptose	11
1.1.6 Regulation der Apoptose	14
1.1.7 Mitochondrion und programmierter Zelltod (Apoptose)	17
1.1.8 Energiestoffwechsel.....	17
1.1.9 Verschiedene Forschungsfelder der CLN2-Erkrankung	20
Fragestellung dieser Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Molekularbiologische Methoden	23
2.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry	23
2.1.2 ATP-Bestimmung mittels Luminometrie	25
2.1.3 Viabilitätstest der Zellreihen (Dimethylthiazol-Tetrazolium- Bromid-Viabilitätstest).....	28
2.2 Zellbiologische Methoden.....	29
2.2.1 Zellkultur	29
2.2.2 Trypsinieren	29
2.2.3 K 562-Zellen	30
2.2.4 HEK 293-Zellen	30
2.2.5 NT2-Zellen	30
2.2.6 Retinsäureinduzierte Differenzierung.....	31
2.2.7 Inhibitor (Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon)	31
2.2.8 Pseudoinhibitor (H-D-Pro-Phe-Arg-Chlormethylketon).....	32
3. Ergebnisse	33
3.3 ATP-Bestimmung.....	33
2.3.1 NT2-Zellen	33
2.3.2 293-Zellen.....	37
2.3.3 K 562-Zellen	41
2.4 Viabilitätstest.....	46
2.4.1 NT2-Zellen	47
2.4.2 293-Zellen.....	49
2.4.3 K 562- Zellen	51
2.4.4 Differenzierte NT2 Zellen	52
Diskussion	54
Zusammenfassung.....	62

Anhang	63
Abkürzungsverzeichnis	63
Lebenslauf	64
Danksagung	65
Literaturverzeichnis	66
Erklärung.....	74

1. Einleitung

Allgemeines über neuronale Ceroidlipofuszinosen

Die Ceroidlipofuszinosen sind progrediente neurodegenerative Krankheiten vorwiegend des Kindesalters. Sie werden zum großen Teil autosomal-rezessiv vererbt. Im angloamerikanischen und englischen Sprachraum sind sie auch unter dem Namen Batten Disease bekannt. Die neuronalen Ceroidlipofuszinosen gehören zu den Neurolipidosen, wobei sich der neurodegenerative Prozess im Perikaryon der Nervenzelle abspielt. Dadurch werden Symptome einer Erkrankung der grauen Substanz hervorgerufen. Ihre Merkmale sind Demenz und Visusverlust durch Retinopathie.

Nach dem Erkrankungsalter werden die Ceroidlipofuszinosen in infantile, spätinfantile und juvenile Formen eingeteilt. Außerdem gibt es noch eine seltene adulte Form (Morbus Kufs) sowie Fälle von kongenitaler NCL.

Jahrzehnte lang wurden die neuronalen Ceroidlipofuszinosen unter dem Oberbegriff der „amaurotischen Idiotie“ zusammengefasst. Erst seit ungefähr 30 Jahren ist die Gruppe dieser Erkrankungen unter dem Namen der neuronalen Ceroidlipofuszinosen bekannt (NCL). Somit sind sie abgrenzbar von anderen ähnlichen Erkrankungen wie den Gangliosidosen, die nach Aufdecken der Defizienz der lysosomalen Enzyme Hexosaminidase A und beta-Galaktosidase von den Ceroidlipofuszinosen zu unterscheiden sind [Zeman W 1963; Kohlschuetter 1997]. Diese Abgrenzung ist auch der Entdeckung der Autofluoreszenz gespeicherter Lipopigmente zu verdanken [Siakotos AN 1970]. Die Überlieferungen über Krankheitsfälle dieser neurodegenerativen Erkrankung gehen über 170 Jahre zurück. Der Landarzt Christian Stengel beschrieb erstmals 1826 in einer mittelnorwegischen Bergarbeiterstadt die juvenile Form des Krankheitsbildes bei vier Kindern eines gesunden Ehepaars.

Es folgten Beschreibungen der Erkrankung im Jahre 1903 von F. E. Batten. Vogt und Spielmeyer sammelten 1906 Erkenntnisse der juvenilen Form.

Namensgeber der spätinfantilen Form war Bielschowsky im Jahre 1913 [Bielschowsky 1913].

Die neuronalen Ceroidlipofuszinosen bilden eine Gruppe autosomal-rezessiver, erblicher progredienter neurodegenerativer Krankheiten. Wahrscheinlich stellen sie die häufigsten derartigen Prozesse im Kindes- und Jugendalter dar. Gemeinsames Merkmal aller Formen ist die Entwicklung von Demenz und Amaurose sowie die intrazelluläre Speicherung von Ceroidlipofuszin [Boustany 1992]. Dieses Speichermaterial lässt sich in fast allen Körperzellen nachweisen, führt aber nur in Nervenzellen und der Retina zu Schäden. Diese Ablagerung von Lipopigmenten mit ihrer spezifischen Ultrastruktur ist für die Diagnostik von großer Bedeutung.

Obwohl die molekulargenetischen Erkenntnisse die Aufklärung der NCL deutlich vorangetrieben haben, wird das Krankheitsbild auch heute noch zum großen Teil bioptisch durch morphologisch-elektronenmikroskopischen Nachweis der spezifischen Lipopigmente diagnostiziert [Ikeda K 1979].

1.1.1 Formen der neuronalen Ceroidlipofuszinose

Klassisch eingeteilt werden die unterschiedlichen Formen der NCL nach dem Manifestationsalter der Erstsymptome. Eine präzisere molekulargenetische Einteilung sollte jedoch angestrebt werden. Es sind acht verschiedene Formen der neuronalen Ceroidlipofuszinose bekannt (CLN1 bis CLN8), die auf verschiedenen Mutationen in spezifischen Genen beruhen [Junaid MA 2001].

Tabelle 1: Heutige Klassifikation der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen

Gen	Chromosom	Andere Bezeichnung der Krankheit	Erste Erscheinungen
CLN1	1 p32	"Infantile" NCL	Meist im Säuglingsalter, alle Altersstufen möglich
CLN2	11 p15	Spätinfantile NCL	Etwa 3. Lebensjahr oder später
CLN3	16 p12	Juvenile NCL	Etwa 6. Lebensjahr
CLN4		Adulte NCL	Etwa 30. Lebensjahr
CLN5	13 q31-32	Finnische spätinfantile NCL	Ähnlich wie spätinfantile NCL
CLN6	15 q21-23	Indisch iberische NCL-Variante	Ähnlich wie spätinfantile NCL
CLN7		CLN7-assoziierte türkische	Ähnlich wie spätinfantile NCL
CLN8	8 p23	Nordische Epilepsie	Beginnt im Schulalter

1.1.1.1 CLN1 - Infantile NCL (M. Santavuori-Haltia)

Diese Form ist besonders in Finnland häufig mit einer Inzidenz von 8/100000 Geburten und wurde in Deutschland nur vereinzelt beobachtet [Santavuori 1988]. Die veraltete Bezeichnung „infantile NCL“ kann nicht mehr gelten, da Beobachtungen gezeigt haben, dass die Erkrankung auch außerhalb des Säuglingsalters beginnen kann. Der zu Grunde liegende genetische Defekt ist die Defizienz der lysosomalen Palmitoyl-Protein-Thioesterase [Vesa J 1995; Verkruyse LA 1996], dessen Funktion noch unklar ist. Das Speichermaterial sind Sphingolipidaktivatorproteine und Glykosphingolipide. Die chromosomale Lokalisation findet sich auf Chromosom 1p32 [Hellsten E 1993]. Diese in Finnland vorherrschende „single missense mutation“ (Arg122Trp) wird auch als „common mutation“ bezeichnet. Hierbei ist die Aminosäure Arginin durch Tryptophan ausgetauscht [Vesa J 1995]. Über 20 Mutationen des PPT1-Gens sind mittlerweile weltweit bei NCL-Patienten gefunden worden [Hofmann SL 1999].

Die betroffenen Kinder sind im ersten Lebensjahr gesund und in ihrer statomotorischen Entwicklung unauffällig. Doch bereits im zweiten Lebensjahr kommt es zu einem schnellen Verlust ihrer bis dahin erworbenen Fähigkeiten. An Bewegungsstörungen sind vor allem Stereotypen sowie Choreaathetosen vorherrschend. Diagnostisch wegweisend sind die starke Hirnatrophie in bildgebenden Verfahren [Santavuori P 2001] sowie eine Abflachung des EEG, welches wie beim Hirntod zu einem "Null-Linien-EEG" führt.

Bei der Erkrankung kommt es in den folgenden Lebensjahren zu einer sehr raschen Progredienz der Symptomatik. Die Kinder werden vollkommen hilflos, steif und regungslos. Die Lebenserwartung beträgt meist nur wenige Jahre [Santavuori P 1974].

Postmortal zeigen die Gehirne eine diffuse kortikale Atrophie. Im aufgetriebenen Zytoplasma der Nervenzellen findet sich granuläres, PAS- und sudanschwarzpositives, autofluoreszierendes Material. Elektronenmikroskopisch handelt es sich dabei um granuläre, osmiophile Einschlusskörperchen (granular osmiophilic deposits, GROD). Diagnostisch beweisend sind somit bei der infantilen Form der Nachweis von granulärem Speicherematerial in Blutlymphozyten oder einer Hautbiopsie.

Neuerdings ist der Nachweis der infantilen sowie der spätinfantilen Form der Erkrankung durch einen Enzymtest aus Trockenblutkarten zu erbringen [Lukacs Z 2003]. Eine pränatale Diagnose ist mittlerweile möglich [Rapola J 1993; Goebel HH 1995].

1.1.1.2 CLN2- Spätinfantile NCL (M. Jansky-Bielschowsky)

Diese Form der neuronalen Ceroidlipofuszinose beginnt im Alter von 2-3 Jahren und ist in Mitteleuropa relativ häufig; die Inzidenz beträgt ca. 0,5/100000 Geburten und ist nach der juvenilen Form in Deutschland am häufigsten.

Als Erstbeschreiber gilt Bielschowsky im Jahre 1913 [Bielschowsky 1913]. Den betroffenen Kindern fehlt eine lysosomale Peptidase (TPP1) [Vines DJ 1999; Ezaki J 2000]. Das in Lysosomen gespeicherte Material der Nervenzellen enthält große Mengen der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-

Synthese [Hagopian 1995; Ezaki J 1996]. Wahrscheinlich ist somit der Untergang der Nervenzellen in Retina und Gehirn und ihre typischen Krankheitsercheinungen erklärbar, da diese Gewebe einen sehr hohen Energieumsatz haben und sie somit für Störungen der mitochondrialen Energieversorgung anfällig macht.

Die chromosomale Lokalisationen des Gendefektes befindet sich auf Chromosom 11p15. Als „common mutation“ werden die beiden vorherrschenden Mutationen R208X und IVS5-1G > C bezeichnet. Daneben sind einige seltenere „missense mutations“ identifiziert worden (R127Q, N286S, and T353P) [Steinfeld R 2002].

Klinische Symptome finden sich bei den betroffenen Kindern meist im Alter zwischen 2-4 Jahren in Form von schwerster Epilepsie, die sich medikamentös kaum einstellen lässt. Die Entwicklung der Kinder war zuvor bis auf eine leichte motorische Ungeschicklichkeit und eine etwas verlangsamte Sprachentwicklung unauffällig. Eine langsam progrediente Visusstörung stellt sich im Alter von 2-3 Jahren ein. Obwohl die Kinder nicht blind erscheinen, ist das ERG pathologisch und der Augenhintergrund mit Maculadegeneration und Pigmentaggregation stark verändert. An Bewegungsstörungen finden sich vor allem Myoklonien. Das EEG zeigt im Frühstadium der Erkrankung okzipitale Spikes oder Polyspikes nach Einzelblitzen. Bei diesen Befunden sollten Augen- und Kinderärzte an die spätinfantile Form der neuronalen Ceroidlipofuszinose denken [Heim 1995].

Die Diagnose ergibt sich aus dem Zusammenspiel der verschiedenen Symptome sowie im bioptischen Nachweis. Es finden sich elektronenmikroskopisch, z.B. in Fibroblasten oder Lymphozyten charakteristische curvilineäre Einschlüsse mit Fingerabdruck-Profilen (fingerprints). Autofluoreszierendes Material (PAS- und sudanschwarz-positiv) findet sich auch bei dieser Form der neuronalen Lipofuszinose in Nervenzellen.

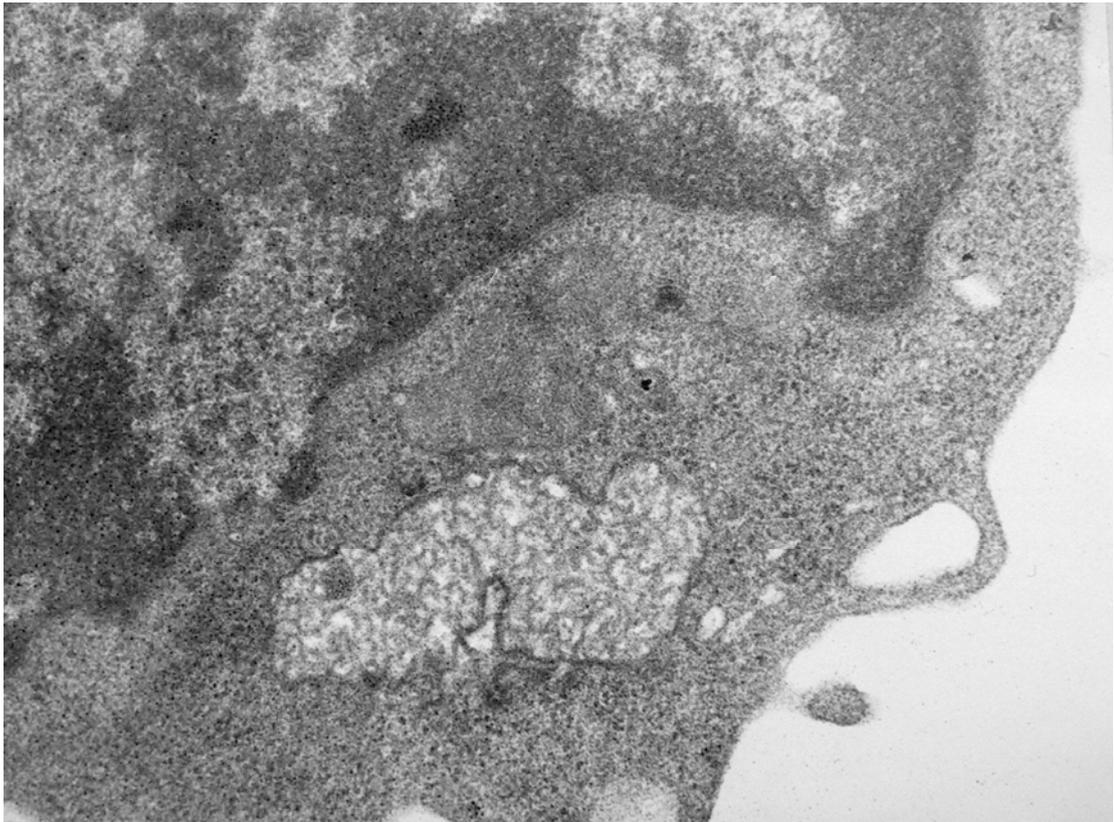


Abbildung 1: Curvilineäre Einschlüsse, EM-Bild: H.H. Goebel, Mainz.

Eine pränatale Diagnostik ist elektronenmikroskopisch sowie molekulargenetisch möglich. Außerdem gelingt diagnostisch der Nachweis der Erkrankung mittels eines Enzymtestes aus Trockenblutkarten [Lukacs Z 2003]. Der Verlauf der Erkrankung ist im Vergleich zu anderen Formen rasch und führt meist vor der Pubertät zum Tode. Atypische Mutationen können mit einem protrahierten Verlauf einhergehen [Steinfeld R 2002].

1.1.1.3 CLN3- Juvenile NCL (M. Spielmeyer- Vogt)

Dies ist die in Deutschland am meisten verbreitete Form der NCL mit ca. 0,7 pro 100.000 Lebendgeborenen [Claussen 1992]. In der Säuglings- und Kleinkindzeit sind die Kinder in ihren psychomotorischen Fähigkeiten völlig normal entwickelt. Mit dem Schuleintritt treten meist die ersten Sehschwächen auf. Eine verordnete Brille bringt keinen Erfolg, eine rasche Erblindung der Kinder

lässt sich nicht aufhalten und tritt durchschnittlich mit 10 Jahren ein [Kohlschütter A 1988]. Ein typischer Augenhintergrund zeigt Pigmentverschiebungen sowie eine atrophische Retina. Bei außerdem erloschenem ERG wird häufig eine sonst in dieser Altersklasse sehr selten verbreitete „Retinitis pigmentosa“ diagnostiziert. Da die Degeneration der Netzhaut vom Zentrum zur Peripherie fortschreitet, beobachtet man bei betroffenen Kindern das sogenannte „overlooking“. Patienten blicken über den Untersucher scheinbar hinweg, bei der Aufforderung, ihn anzuschauen. So können sie noch Umrisse ihrer Mitmenschen wahrnehmen. Die Kinder werden bei Nichterkennung ihrer zugrundeliegenden Stoffwechselerkrankung meist in Blindenschulen unterrichtet, wo bald ein weiterer Abbau ihrer geistigen Leistungen bemerkt wird, vor allem im mathematischen Bereich. Epileptische Anfälle stellen sich meist zwischen dem 8.-16. Lebensjahr ein. Die Trias Demenz, Epilepsie und Amaurose sind die typischen Zeichen für die juvenile NCL. Die erst spät einsetzende und schleichend verlaufende Symptomatik sowie die in die Zeit der Pubertät fallenden Demenzsymptome, die leicht als psychogen eingestuft werden, erschweren die Erkennung der Erkrankung.

Zur Diagnosefindung dienen die im Blutausschlag erkennbaren Lymphozytenvakuolen, die „fingerprints“ und „curvilinären“ Einschlüsse in geeignetem Biopsiematerial sowie das schon früh erloschene ERG. So gelingt auch eine Diagnosefindung bei jüngeren Geschwisterkindern vor Ausbruch der Symptomatik. Das EEG zeigt oft multifokale oder generalisierte Krampfbereitschaft. Der Gendefekt auf Chromosom 16 (in 80% eine Deletion) führt zum Ausfall von 438 Aminosäuren eines Polypeptids, dessen Funktion unklar ist. Das Speichermaterial enthält vorwiegend die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthetase.

1.1.1.4 Sonstige Formen von NCL

CLN4-Adulte NCL

Diese erwachsene Form der NCL wird auch „Kuf's disease“ genannt nach dem Erstbeschreiber [Kufs 1925]. Ein entscheidender Unterschied zu den an-

deren Formen der NCL besteht darin, dass keine Retinopathia pigmentosa und Blindheit bei den Patienten besteht. Typisch sind Symptome wie progressive Myoklonusepilepsie, Demenz und Dyskinesien, die sich ungefähr im 30. Lebensjahr manifestieren [Berkovic 1988]. Es bestehen auch Beschreibungen von Erstmanifestationen um das 60. Lebensjahr [Constantinidis J. 1992]. Es sind unterschiedliche klinische und genetische Phänotypen bekannt. Ein (noch unbekannter) Genlokus wurde CLN4 genannt. Es gibt eine autosomal rezessive und eine dominante Form. Der Nachweis der Erkrankung gelingt immunhistochemisch, z.B. aus Haut- oder Muskelbiopsien.

CLN5-Finnische Variante

Diese Mutation im Gen CLN5 wird fast nur in Finnland gefunden. Sie weist viele Gemeinsamkeiten mit der spätinfantilen NCL auf [Vesa J 2002]. Der Unterschied besteht in der späteren Manifestation der Symptome und der typischen neurophysiologischen Befunde [Santavuori P. 1991].

CLN6-Indisch-iberische spätinfantile NCL-Variante

Diese Variante wurde auch als „früh-juvenile NCL“ bezeichnet, da sie in ihrer klinischen Präsenz wie spätinfantile NCL erscheinen, jedoch die histologischen Befunde der juvenilen NCL zeigen [Lake B.D. 1978]. Sie wird durch Mutationen des CLN6-Gens verursacht [Heine C 2004]. Das Alter beim Auftreten der typischen klinischen Erscheinungen der Erkrankung variiert zwischen 18 Monaten und 8 Jahren.

Die offenbar aus Indien stammende Krankheit wurde in Tschechien, Kroatien, Portugal, Mittel- und Südamerika gefunden und dürfte auch in Deutschland vorkommen [Sharp et al. 2003; Teixeira et al. 2003; Heine et al. 2004].

CLN7-Türkische Variante der spätinfantilen NCL

Diese Gruppe von Erkrankungen kristallisierte sich bei Untersuchungen über klassische spätinfantile NCL und deren Varianten heraus. Es zeigte sich, dass alle betroffenen türkischen Familien Kombinationen aus CLN2 und CLN6 auf-

wiesen. Es bestand eine Konsanguinität in fast allen Familien. Das Erkrankungsalter variiert zwischen 1 und 6 Jahren. Es ist noch kein Gendefekt bekannt.

Zur Pathogenese der spätinfantilen NCL (CLN2)

1.1.2 Der Speicherprozess bei CLN2: Die Rolle der lysosomalen Tripeptidase 1

Die lysosomale Peptidase (TPP 1) ist bei der spätinfantilen NCL defizient. TPP 1 ist eine lysosomale Exopeptidase mit einer geringen Endoprotease-Aktivität. TPP 1 ist codiert auf Chromosom 11p15. Die Aminosäuresequenz von TPP 1 besteht aus 563 Aminosäuren. Das Enzym, welches aus menschlichen Osteoclasten, Rattenmilz- und Nierenzellen sowie menschlichen Hirnzellen gewonnen wurde, hat eine Molekülmasse von 46-48 kDa, das Proenzym eine Masse von 66 kDa.

Natürliche Substrate von TPP 1 sind unbekannt. Es scheint, dass diese Peptidase beteiligt ist beim Abbau von kleinen, unstrukturierten Polypeptiden mit nicht substituiertem N-Terminus und ungeladener Aminosäure in der P1-Position. *In vitro* spaltet TPP 1 Peptidhormone wie Angiotensin II, Glucagon, Substanz P, Angiotensin III sowie die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase, ein Proteolipid, welches sich bei der spätinfantilen NCL in Lysosomen akkumuliert. Die Aktivität von TPP 1 kann inhibiert werden durch Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon (AAF-CMK) [Ezaki J 2000]. Außerdem ist TPP 1 als Serin-Protease inhibierbar durch 3,4-Dichlorisocumarin und Diisopropylflourphosphat.

1.1.3 Der Prozess der Neurodegeneration bei CLN2: Die Rolle von Apoptose und Energiestoffwechsel

Die Pathogenese der Neurodegeneration bei der spätinfantilen Form der NCL ist noch immer nicht geklärt, obwohl es in den letzten Jahren zu vielen Fortschritten in der Mutationsanalyse der Erkrankungen gekommen ist. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass eine mitochondriale Beteiligung an der Neurodegeneration anzunehmen ist. In einigen Arbeiten fand man strukturell veränderte Mitochondrien [March PA 1995; Walkley SU 1995] und konnte zeigen, dass gerade die Neurone, die abhängig von dem Energiestoffwechsel der Mitochondrien sind, sehr anfällig für den Zelltod sind. Bei der spätinfantilen Form findet man in den Lysosomen große Mengen der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase. Die Untereinheit c ist normalerweise ein Teil des mitochondrialen ATP-Synthase-Komplexes. Interessant ist die Tatsache, dass sich lysosomales Speichermaterial in verschiedenen Organen findet, allerdings zeigen nur neuronale Zellen Dysfunktionen und Zelltod [Kida E 2001]. So bleibt der genaue Zusammenhang zwischen den genetischen Defekten der NCL und den morphologischen Befunden, wie die Akkumulation von Speichermaterial, weiterhin unklar.

Bei akuten und chronischen Prozessen schädigen verschiedene Störungen Neuronen: Überaktivierung von Glutamatrezeptoren, Anstieg des zytoplasmatischen Calciums, mitochondriale Fehlfunktion und Störung des endoplasmatischen Retikulums. Die Pathophysiologie der akuten Neurodegeneration unterscheidet sich von Krankheit zu Krankheit und ist von chronischen Neurodegenerationen mit ebenfalls verschiedenen Pathomechanismen z.T. noch weiter entfernt. Allerdings können einige neuroprotektive Maßnahmen akute und chronische Neurodegeneration betreffen, z.B. Neuroprotektion durch Verhinderung der Apoptose. Zytokine (IL-1, TNF- α , TGF- β) wirken v.a. bei akuter Neurodegeneration. TGF- β ist wohl vor allem neuroprotektiv, während TNF- α sowohl neurodegenerativ als auch neuroprotektiv wirkt. IL-1 vermittelt ischämische, exzitotoxische und traumatische Hirnschädigungen, wahrscheinlich über verschiedene Angriffspunkte an Glia, Neuronen und Gefäßen.

Die Apoptose spielt bei der Neurodegeneration im Menschen eine zentrale

Rolle. Die Aktivierung des apoptotischen Enzyms Caspase-3 wurde kürzlich bei akuter und chronischer Neurodegeneration beobachtet. Interessanterweise scheint eine neuroprotektiv ischämische Präkonditionierung durch verminderte Caspase-3-Aktivierung zustande zu kommen. Caspase-Inhibitoren verhindern Neuronenverlust in Tiermodellen vor Hirnschädigungen und Schlaganfall. Eine klare Beziehung zwischen einer erblichen neurodegenerativen Krankheit und einer mangelhaften Caspase-Hemmung wurde jüngst für die spinale Muskelatrophie vorgeschlagen. Eine alternative therapeutische Strategie bei akuten und chronischen Hirnerkrankungen könnten neurotrophe Faktoren oder die Induktion von Wachstumsfaktoren im zentralen Nervensystem sein.

1.1.4 Die humane Zelllinie NT2 als Modell einer neuronalen Zelle

NT2 ist eine humane Teratomkarzinomzelllinie, die neuronal determiniert ist. Das bedeutet, dass sich die Zellen in einem neuronalen Vorläuferstadium befinden. Unter Zugabe von Retinsäure differenzieren die Zellen *in vitro* zu Zellen mit neuronalem Charakter. Es wurde gezeigt, dass im Laufe dieses Differenzierungsprozesses die Zellen neuroepitheliale Marker verlieren und dafür spezifische neuronale Marker exprimieren [Pleasure 1993]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass nach Injektion von NT2-Zellen in das Gehirn und Rückenmark von Ratten sich diese Zellen in das Zentralnervensystem integrieren. Bereits sechs Monate später zeigten die Zellen den molekularen Phänotyp von ausgereiften postmitotischen Neuronen. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die NT2-Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der neuronalen Differenzierung bei der spätinfantilen neuronalen Ceroidlipofuszinose gewählt.

1.1.5 Zellzyklus und Apoptose

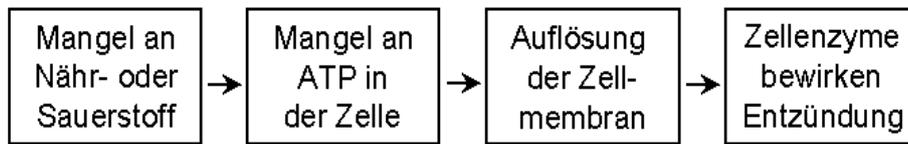
Bis vor einigen Jahren hat man den Zelltod als ein Ereignis betrachtet, das für den Organismus grundsätzlich negativ ist. Dass der Zelltod eine wichtige regulatorische Funktion während Entwicklung und Erhalt des Organismus besitzt und damit einen zentralen Teil des Lebens darstellt, war eine überra-

schende Entdeckung. Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein Selbstmordprogramm der Zelle, das innerhalb weniger Stunden die Zelle vollständig eliminiert. Dieses Phänomen ist schon seit Jahrzehnten bekannt. Aber erst durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose im Jahre 1972 [Kerr J.F.R. 1972] wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose geprägt. Der Begriff Apoptose (a-po = ab, weg, los; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst. Fünf Jahre später wurden beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die ersten Gene entdeckt, die für die Apoptose verantwortlich sind. Durch Mutationen wurden die Gene gefunden, die zur Störung der Apoptose während der Entwicklung führen [Sulston J.R. 1977]. Im Jahr 1990 fanden Forscher heraus, dass ein tumorerzeugendes Gen bei Überexpression Apoptose verhindert [McDonnell 1990]. Damit war die Apoptose zu einem der attraktivsten neuen Forschungsgebiete mit ständig ansteigenden Veröffentlichungszahlen geworden. Diese Entwicklung spiegelt sich in den über 50.000 bisher erschienenen wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema wieder.

Zellen können durch Nekrose („Mord“) oder Apoptose („Selbstmord“) sterben. Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse, z.B. durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanischen Verletzungen zugrunde. Diese führen in größeren Bereichen des Gewebes zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Die Folge ist das Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran. Dadurch werden Stoffe aus dem Cytoplasma freigesetzt, die Fresszellen anlocken und damit eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Nekrose: passiver Zelltod

betrifft: Zellgruppe



Apoptose: aktive Selbstzerstörung

betrifft: isolierte Einzelzelle

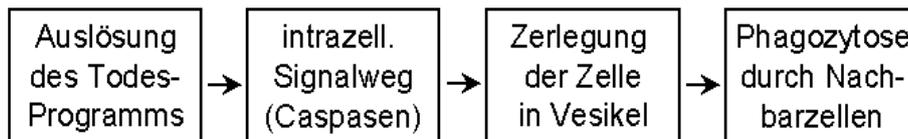


Abbildung 2: Schema der Nekrose und Apoptose

Im Gegensatz dazu läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ab. Es sind in der Regel nur einzelne Zellen betroffen und diese reagieren auf Signale von innen, auch wenn sich die Auslöser des Signals außerhalb der Zelle befinden. In der Anfangsphase schrumpfen Zellkern, Cytoplasma und Mitochondrien; die Zellmembran bleibt jedoch unbeschädigt, so dass keine Entzündungsreaktion eintritt. Infolge des sinkenden Zellvolumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen und tritt in eine als Zeiose bezeichnete Phase ein. Während der Zeiose verdichtet sich das Chromatin (DNA und assoziierte Strukturproteine) und wird zerstückelt. Schließlich zerfällt die Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen, die von Nachbar- oder Fresszellen eliminiert werden. Die resorbierten Vesikel werden durch Lysozyme biochemisch aufgeschlossen und auf diese Weise werden die Reste der abgestorbenen Zelle vollständig wiederverwertet .

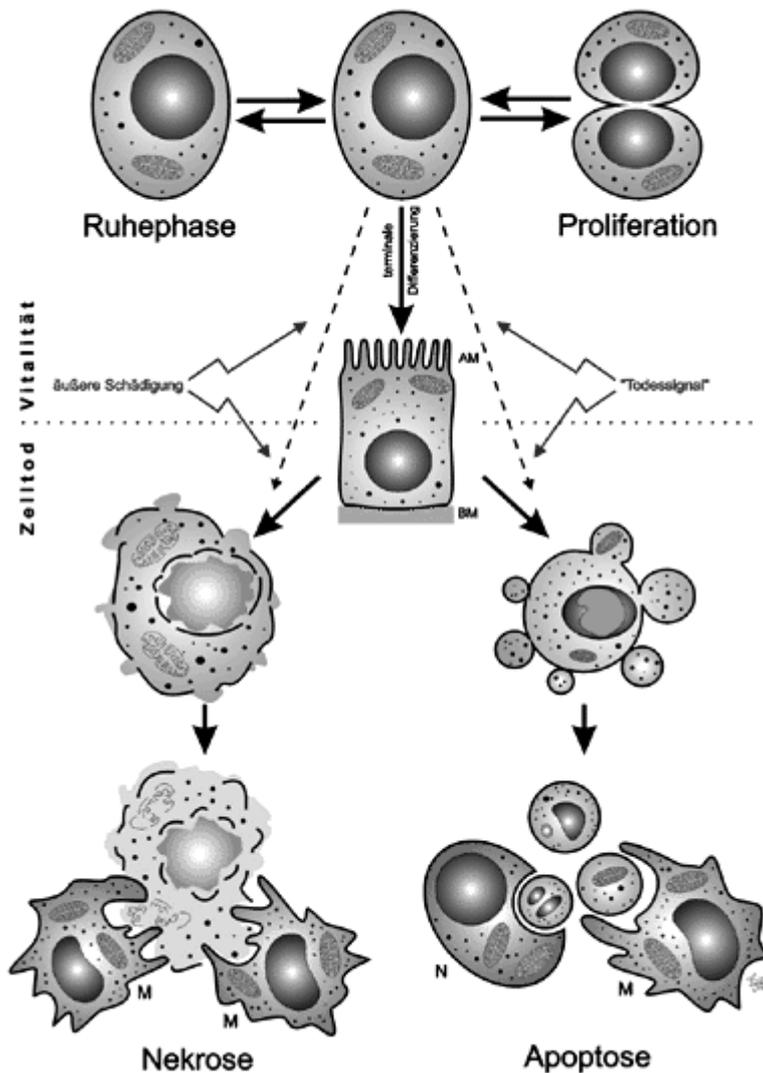


Abbildung 3: Nekrose und Apoptose aus: STEPHAN, H., POLZAR, B., MANNHERZ, H.G. (2000): Sein oder nicht sein? - Naturwissenschaftliche Rundschau 53 (6): 273-281.

1.1.6 Regulation der Apoptose

Je nach Zelltyp und Auslöser kann die Apoptose auf drei verschiedenen Signalwegen eingeleitet werden. Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen, Apoptose auslösenden Wege ist die Initiierung der Caspase-Kaskade, die ihrerseits unumkehrbar den Zelltod einleitet.

Typ-I-Weg: Bei diesem extrinsischen Weg werden die Zellmembranrezeptoren (Todesrezeptoren) aktiviert. Die Bindung von Liganden, wie Apo, Fas oder

TNF an diese Rezeptoren führt über einen Komplex zur Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10.

Typ-II-Weg: Bei diesem intrinsischen Weg spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle. Cytochrom C (bekannt als Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium) ist der auslösende Faktor. Bei der Aktivierung dieses Apoptosewegs öffnen sich Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran und setzen z.B. Cytochrom C ins Cytoplasma frei. Im Cytoplasma bilden Cytochrom C, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) und die Pro-Caspase-9 das Apoptoson, wodurch zusammen mit dATP die Caspase-9 aktiviert wird.

Die Freisetzung von Apoptose fördernden Molekülen aus den Mitochondrien ist wichtig für die Weiterleitung des Apoptosesignals in der Zelle. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Liste der Substanzen, die die Mitochondrienmembran durchlässig machen, immer länger wird. Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor p53, von dem man annimmt, dass er Apoptose durch Expression von pro-apoptischen Genen auslöst. p53 wandert ebenfalls zu den Mitochondrien und interagiert dort mit einem Hitzeschockprotein (Hsp70).

Die Expression von Hsps dient dem Schutz der Zelle und wird durch eine große Anzahl von Stressfaktoren, wie Temperaturerhöhung induziert. Hsps inhibieren die Aggregation von Proteinen oder markieren Proteine für den proteolytischen Abbau. Hsps können aber auch Apoptose unterdrücken. Hsp27, Hsp70 und Hsp90 binden an Apaf-1 und verhindern dadurch die Aktivierung von Caspase-9.

Kürzlich wurde ein dritter, durch Stress ausgelöster Signalweg entdeckt. Dabei wird Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und die Caspase-12 aktiviert.

Eine Zelle beginnt mit dem Apoptose-Programm, wenn interne oder externe Signale die Selbstzerstörung befehlen. Jede Zelle unseres Körpers befindet sich im ständigen Kontakt zu ihren Nachbarzellen durch chemische Botenstoffe (z.B. Wachstumsfaktor NGF oder Interleukin-2), die an die Rezeptoren der Zelle binden. Wird ihr dieser Kontakt entzogen, so führt dies in der Regel zur Auslösung von Apoptose. Das ist ein Grund, warum normale Zellen kaum in

in vitro kultivierbar sind, d.h. als Zellkultur gezüchtet werden können. Die meisten Zellkulturen basieren daher auf entarteten Zellen, bei denen ein defektes Apoptoseprogramm ein unbegrenztes (tumoröses) Wachstum ermöglicht.

Zu den internen und externen negativen Signalen, die Apoptose auslösen können, gehören die Besetzung von Rezeptoren mit bestimmten todbringenden Botenstoffen oder genotoxischen Substanzen. Hohe Dosen von UV- oder Röntgenstrahlung können ebenso zu einer Schädigung des genetischen Materials in der Zelle führen. Diese Zellen haben dann die Wahl zwischen einer Reparatur kleinerer DNA-Schäden oder der Apoptose, wenn der Schaden nicht mehr repariert werden kann. Die Zelle tötet sich im Zweifelsfall selbst, um nicht zu entarten.

Morphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft normal weiter. Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich. Intensives „*membrane blebbing*“ - die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen - ist an der Cytoplasmamembran zu beobachten. Schließlich beginnen sich membranumschlossene Vesikel - die sogenannten apoptotischen Körperchen oder „*apoptotic bodies*“ - von der Zelle abzuschnüren.

In vivo werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktionen eliminiert. Deshalb lassen sie sich in Gewebeschnitten nur sehr selten nachweisen. In vitro kann man zum Ende der Apoptose die Lyse der apoptotischen Körperchen beobachten. Die Cytoplasmamembran bleibt bis zu diesem Zeitpunkt funktionell intakt. Biochemisch kommt es aber bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen. So wird in der Membran Phosphatidylserin, das normalerweise ausschließlich auf der cytoplasmatischen Membranseite lokalisiert ist, auf die extrazelluläre Seite verlagert. Im Zellkern werden spezifische calcium- und magnesiumabhängige DNasen aktiviert, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke (DNA-Strickleiter) zerschneiden, da sie nur an bestimmten Stellen angreifen können.

1.1.7 Mitochondrion und programmierter Zelltod (Apoptose)

Bei einigen Formen des planmäßigen, programmierten Zelltodes (Apoptose) kommt es nach Aktivierung (1) zytoplasmatischer Proteine zu deren Integration in die äußere Mitochondrienmembran (2) und zur Ausbildung von Membrankanälen (3, 4), die für das Atmungskettenprotein Cytochrom C durchlässig sind. Im Zytosol aktiviert freigesetztes Cytochrom C (Cc; 5) proteinabbauende Enzyme, deren Aktivität letztendlich zum Zelltod führt.

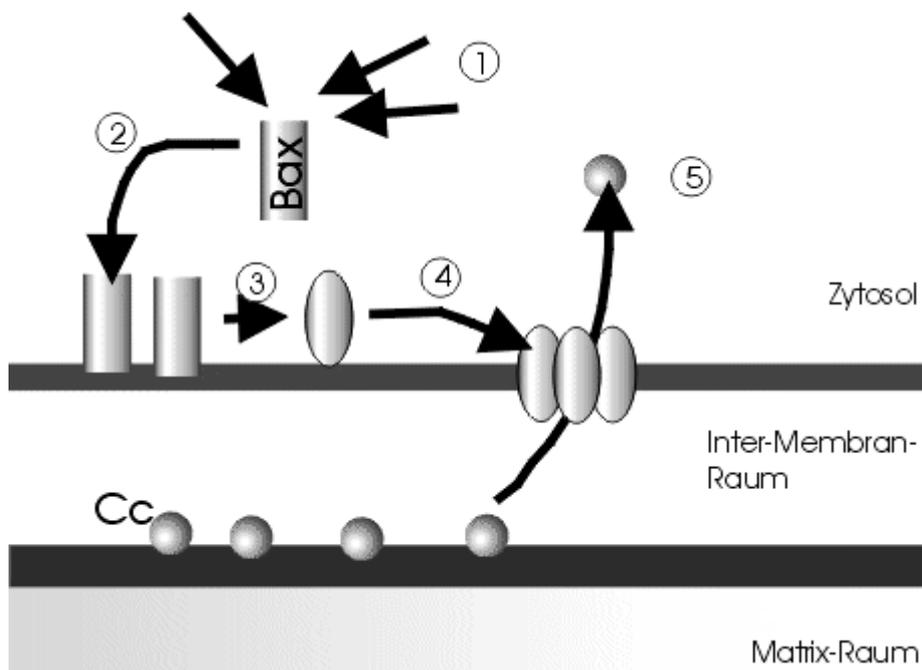


Abbildung 4: Apoptose aus: STEPHAN, H., POLZAR, B., MANNHERZ, H.G. (2000): Sein oder nicht sein? - Naturwissenschaftliche Rundschau 53 (6): 273-281.

1.1.8 Energiestoffwechsel

Mitochondrien

In einer Zelle finden wir gewöhnlich 100-1000 Mitochondrien, die einen Durchmesser von 0,2 - 1 μm haben. Es sind Organellen der Zellatmung, deren Funktion in der Umwandlung von Nahrungsstoffen, wie Kohlenhydrate, Fette etc. in brauchbare Energie liegt. Sie sind also gewissermaßen die "Kraftwerke der Zelle". Über die Enzyme der Atmungskette und damit der oxidativen Phosphorylierung wird ATP synthetisiert. Es handelt sich dabei um

eine Folge von Elektronen-Transfer-Reaktionen, die einen H^+ -Gradienten zwischen der Außen- und der Innenseite der inneren mitochondrialen Membran schaffen. Dieser H^+ -Gradient dient dazu, die ATP-Synthese anzutreiben. ATP ist der Hauptenergieträger in einer lebenden Zelle.

Mitochondrien haben eine äußere und eine innere Membran. Die äußere Membran, welche das Mitochondrium umgibt, hat Membrankanäle, die relativ frei permeabel sind.

Die innere Membran, welche eingestülpt ist und Cristae bildet, ist ein perfekter Isolator. Über sie wird der oben beschriebene elektrochemische Gradient aufgebaut. Die innere Membran besteht zu 20% aus Lipiden und zu 80% aus Proteinen. An diesen Proteinen findet die oxidative Phosphorylierung statt.

Ein Teil der Proteine der Mitochondrien wird nach einem genetischen "Rezept" hergestellt, das sich im Matrixraum der Mitochondrien selbst befindet. Die Mitochondrien verfügen also über eigene DNA-Moleküle, welche die Informationen für ca. 20 mitochondriale Proteine gespeichert haben. Dies entspricht in etwa 5% der gesamten Syntheseleistung, die für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels der Mitochondrien nötig ist. Diese für die Mitochondrien-Proteine kodierenden DNA-Moleküle werden auch in den Mitochondrien hergestellt, während der größte Teil der sich in den Mitochondrien befindlichen Proteine im Zellkern kodiert ist, im Cytoplasma transliert wird und dann über Membranproteine in die Mitochondrien aufgenommen wird.

ATP, der wichtigste Metabolit des Energiestoffwechsels unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau. Jedes Molekül ADP bzw. ATP wird täglich mehrere tausend Mal phosphoryliert und dephosphoryliert. Da Plasmamembranen für ATP undurchlässig sind, muss jede Zelle selbst ATP produzieren können.

Im aeroben Zustand stammt der größte Teil des ATP aus der oxidativen Phosphorylierung. Bei dieser Form der ATP-Bildung wird die notwendige Energie einem Protonengradienten entnommen, der durch die Atmungskette während der Oxidation von NADH und anderen Substraten aufgebaut wird. Oxidation (die Atmungskette) und Phosphorylierung (die ATP-Bildung durch

die ATP-Synthase) sind normalerweise über den H⁺-Gradienten funktionell gekoppelt. Im gekoppelten Zustand limitiert der ATP-Verbrauch die Geschwindigkeit von Atmungskette und Citratcyclus. Schäden der inneren Mitochondrienmembran oder bestimmte Substanzen (sog. Entkoppler) können zum teilweisen Abbau oder zum völligen Zusammenbruch des Gradienten führen.

Die Aktivität der ATP-Synthase ist dann erniedrigt, während die Geschwindigkeit des Elektronentransports im Vergleich zur physiologischen Situation ansteigt.

In Abwesenheit von O₂ bleibt für Eukaryonten die anaerobe Glycolyse als einzige Möglichkeit zur ATP-Synthese. Dabei werden in der Glycolyse Phosphatreste auf ein so hohes Gruppenübertragungspotential gehoben, dass sie anschließend auf ADP übertragen werden können (Substratkettenphosphorylierung).

Um die Glycolyse kontinuierlich ablaufen lassen zu können, müssen anaerob lebende Zellen NAD⁺ durch Gärungsreaktionen aus NADH+H⁺ regenerieren.

Eine dritte Möglichkeit, ATP zu synthetisieren, ist in der Muskulatur realisiert. Hier werden Phosphatreste auf hohem chemischen Potential in Form von Kreatinphosphat „geparkt“. Bei ATP-Mangel werden diese Reste wieder auf ADP übertragen, um zusätzliches ATP bereitzustellen. Dies ist möglich, weil die Gleichgewichtskonstante der Reaktion



relativ nahe bei 1 liegt, d.h. Hin- und Rückreaktion können deshalb – je nach Konzentrationsverhältnis der Substrate – effektiv ablaufen.

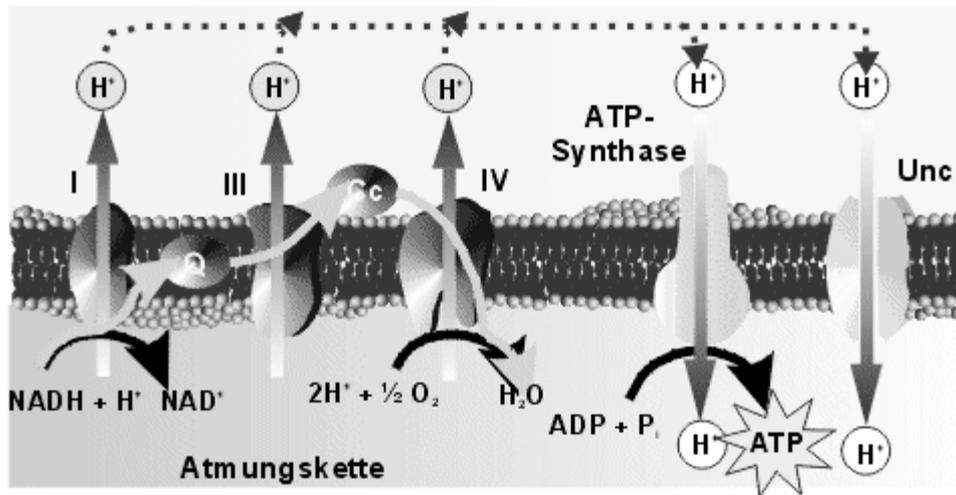


Abbildung 5: Oxidative Phosphorylierung an der mitochondrialen Innenmembran (Universität Bonn, Anatomisches Institut)

1.1.9 Verschiedene Forschungsfelder der CLN2-Erkrankung

Die neurodegenerative Erkrankung CLN2 hat weltweit in den letzten Jahren verschiedenste Forschungsansätze in Hinblick auf mögliche Therapieoptionen erfahren, dennoch bleibt im Moment leider nur die supportive Therapiemöglichkeit dieser immer letalen Erkrankung. Die Forschungsfelder über NCL setzen an unterschiedlichen Bereichen an. So sind vor allem die Erforschung der genauen Aufgaben des CLN-Proteins, die Aufklärung der Transportwege der CLN-Proteine sowie deren Lokalisation in Nervenzellen Gegenstand der aktuellen Forschung. Aufgabe wäre sicherlich auch noch die genaue biochemische Analyse des Speichermaterials sowie die Entschlüsselung des betroffenen Stoffwechselweges. Mutationsanalysen des Erbgutes sowie Genexpressionsstudien mit Mikrochip-Analysen untersuchen den Einfluss des defekten CLN-Gens auf andere Gene [Steinfeld R 2004]. Als ursächliche Therapiebehandlung wären eine Genkorrektur und/oder eine Gentherapie denkbar.

Das Ziel aller Therapiemöglichkeiten besteht darin, aktive Tripeptidylpeptidase 1 ins ZNS und retinale Zellen zu bringen, um so Zelluntergang zu verhindern. Dieses Ziel könnte durch Enzymersatztherapie und verschiedene Formen von Gentherapie erfolgen [Sondhi D 2001]. Aufgrund der Unpassierbarkeit der

Proteine durch die Blut-Hirn-Schranke scheint ein Transport in das Gehirn über das Gefäßsystem nicht möglich. Protein oder Gen müsste direkt ins zentrale Nervensystem eingebracht werden. So erscheint eine Enzymersatztherapie mit reinem, rekombinaten pro-TPP 1 unmöglich. Eine direkte intracerebrale Gabe wäre notwendig sowie eine kontinuierliche Therapie. Die von der Forschergruppe um Sondhi behandelten Tiere schienen in ihrer Bewegungsfähigkeit verbessert, nachdem das Virus, in welches das gesunde CLN2-Gen eingebaut war, an mehreren Stellen ins Gehirn gespritzt wurde.

Unklar bleibt, ob eine frühzeitige Therapie vor Symptombeginn eine Progression verhindert, wie lange die Enzymaktivität im Gehirn bestehen bleibt, ob sich die Enzymaktivität von den Einspritzstellen aus genügend in das ganze Gehirn verteilt und ob eine Besserung der Krankheitserscheinungen erfolgt.

Stammzelltherapie dagegen geht davon aus, dass Knochenmarksstammzellen im ZNS zu Mikroglia-Zellen differenzieren, welche dann TPP 1 exprimieren könnten. Es ist jedoch noch völlig unklar, ob diese Theorie wirklich funktionieren würde. Außerdem ist hierbei eine lebenslange Immunsuppression nötig. Experimente mit diesem Ansatz zeigten bisher keine überzeugenden Ergebnisse [Krivit W 1995].

Da die CLN2 durch Mutationen in einzelnen Genen verursacht wird und eine klassische autosomal-rezessive Erkrankung ist, bei denen das fehlende Protein gut charakterisiert ist, wäre die Erkrankung ein idealer Fall für eine Gentherapie. Ein erfolgversprechendes Konzept dabei ist die in vivo Gentherapie mittels eines Adenovirus-assoziierten Vectors. Um ein Gen in den Kern von Nervenzellen zu bekommen ist es notwendig, das Gen mit einem Vektor zu versehen, der als sogenannter Carrier fungiert. Für die spät-infantile NCL haben sich bisher 3 Typen von Gen-Transfer-Vektoren gefunden: Das Adeno-assoziierte Virus (AAV), das Lentivirus (LV) sowie das Adenovirus (Ad).

Bisher gibt es für die Methoden nur experimentelle Modelle, am meisten relevant für die CLN2 scheint die Untersuchung von Mäusen mit Mucopolysaccharidose VII [Lazarus HS 1993].

Fragestellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Beantwortung der Frage, wie bei der spätinfantilen NCL (CLN2) der neurodegenerative Prozess mit dem Verlust der Aktivität des lysosomalen Enzyms TPP 1 zusammenhängt. Diese Frage sollte am Modell der humanen NT2-Zellen, einer Carcinomazelllinie, untersucht werden, die sich unter Retinsäurebehandlung zu postmitotischen, polarisierten humanen Neuronen differenzieren.

In diesen NT2-Zellen wurde die Aktivität der lysosomalen TPP 1 durch Zugabe eines synthetischen Inhibitors (Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon) zum Zellmedium gehemmt. Damit wurden die Verhältnisse bei der CLN2-Krankheit imitiert, so dass letzten Endes an einem Modell humaner neuronaler CLN2-Zellen gearbeitet werden konnte.

Die Auswirkungen der Inhibition der TPP 1-Aktivität habe ich an den NT2-Zellen untersucht in Bezug auf

1. die *Viabilität* der Zellen
2. den *Energiehaushalt* der Zellen (Gehalt energiereicher Phosphate) sowie
3. das *Differenzierungspotential* unter Behandlung mit Retinsäure.

Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine einfache und zuverlässige Methode zur Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher Proteine. Sie beruht darauf, dass die Proteine zunächst mit einem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. In einem nachfolgenden Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit dem Cu^{2+} -komplexierten Proteine.

Der Kupfer-Protein-Komplex bewirkt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form von Heteropolyphosphorsäuren vorliegen. Molybdat bzw. Wolframat werden von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV reduziert. Es entstehen Mischoxide zwischen jeweils VI- und IV-wertigem Molybdän (Molybdänblaureaktion) bzw. Wolfram. Die Reduktion des Folin-Reagenzes erfolgt, nachdem vermutlich Cu^{2+} im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert wird.

Die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan reduzieren darüber hinaus das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexbildung mit dem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz. Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt.

Dazu wird für mehrere Proben bekannter Proteinkonzentration die Extinktion des bei der Reaktion mit dem Folin-Reagenz entstehenden blauen Farbstoffs ermittelt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz wird die gemessene Extinktion als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt. Unter Verwendung des so erhaltenen molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich für eine beliebige Proteinprobe wiederum unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration bestimmen.

Die Proteinbestimmung nach Lowry wird durch Tris, Ammoniumsulfat, EDTA, Saccharose, Citrat und Phenole verfälscht. Liegen solche Substanzen in den Proteinlösungen vor, müssen die Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt und anschließend in einem wässrigen Lösungsmittel, das diese störenden Substanzen nicht enthält, resolubilisiert werden.

Die quantitative Proteinbestimmung kann mit verschiedenen Färbemethoden erfolgen, z.B. Bicinchoninsäure- [Smith PK 1985], Lowry- [Lowry 1951] und Bradford-Assay [Bradford 1976].

Der von mir verwendete BCA-Assay (BCA Protein Assay Kit, Pierce) besitzt eine 10-fach höhere Empfindlichkeit als der Lowry-Assay. Der BCA-Test bietet eine einfache Durchführung, beeinflussbare Sensitivität und eine gute zeitliche Stabilität des gebildeten Farbkomplexes.

Versuchsdurchführung:

500 μ L Zellsuspension wurden mit 500 μ L Wasser sowie mit 150 μ L DOC ($w = 1\%$ in Natronlauge $c = 0,1\text{ mol/L}$) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden 200 μ L TCA-Lösung ($w = 50\%$) zugegeben, 15 min auf Eis stehen gelassen und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene Pellet in 500 μ L DOC ($w = 0,2\%$ in Natronlauge $c = 0,1\text{ mol/L}$) resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Proteinbestimmung mit dem Protein Assay Reagenz BCA nach Pierce:

Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden 50 mL Reagenz A mit 1 mL Reagenz B gemischt. Für die Erstellung der Standardkurve wurden 0,5 mL BSA (Albumin Standard nach Pierce) mit 0,5 mL Wasser versetzt. Es wurde dadurch die Lösung 1 erhalten. Durch weiteres Verdünnen wurden die Lösungen 2 bis 4 erhalten:

Lösung 2: 0,5 mL Lösung 1 und 0,5 mL Wasser

Lösung 3: 0,5 mL Lösung 2 und 0,5 mL Wasser

Lösung 4: 0,5 mL Lösung 3 und 0,5 mL Wasser

Die Konzentrationen an BSA betragen:

Lösung 1: $\beta(\text{BSA}) = 1 \text{ mg/L}$

Lösung 2: $\beta(\text{BSA}) = 0,5 \text{ mg/L}$

Lösung 3: $\beta(\text{BSA}) = 0,25 \text{ mg/L}$

Lösung 4: $\beta(\text{BSA}) = 0,125 \text{ mg/L}$

Für die Messungen wurden jeweils 0,1 mL der Lösungen 1 bis 4 bzw. 0,1 mL der Probenlösung mit 2 mL der Arbeitslösung versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte bei 546 nm im Photometer. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen nach der Standardkurve berechnet.

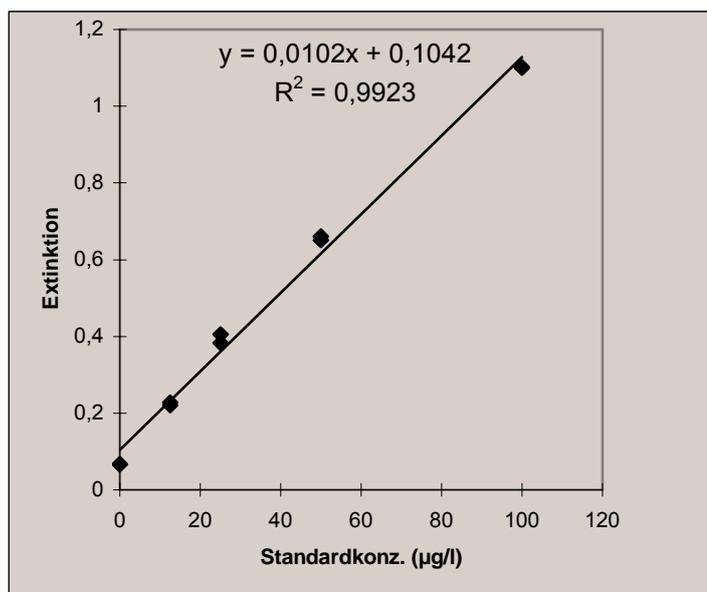


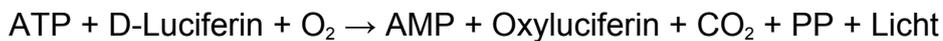
Abbildung 6: Eichkurve für den Proteingehalt der Proben mit bovinem Serum-Albumin als Standard.

2.1.2 ATP-Bestimmung mittels Luminometrie

Unter Lumineszenz versteht man die Emission sichtbaren Lichtes, die sich aus der Oxidation organischer, als Luciferin bezeichneter Stoffe durch Einwirkung des als Luciferase bezeichneten Enzyms ergibt. Die Luminometrie ist somit eine Methode zur Bestimmung biologisch aktiver Substanzen, bei der die Indikatorreaktion – z.B. durch Luciferase-Wirkung – eine messbare Lumi-

neszenz erzeugt. Lumineszenz kommt dadurch zustande, dass durch verschiedene Anregungsprozesse Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben werden, von wo sie unter Lichtemission in den Grundzustand zurückfallen. Bei der Chemolumineszenz stammt die Anregungsenergie von einer chemischen Reaktion. Unter Chemolumineszenz versteht man also eine Leuchterscheinung, die durch Umwandlung chemischer Energie in Licht entsteht.

Mit Hilfe einer sehr empfindlichen luminometrischen Methode wird der ATP-Gehalt in Standard-Proben bzw. Zellkultur-Proben bestimmt. Das z.B. in Leuchtkäfern („Glühwürmchen“) vorkommende Enzym Luciferase katalysiert die folgende Reaktion:



Ist ATP das limitierende Substrat, ist die Menge des emittierten Lichts der Menge des anwesenden ATP proportional. Die kinetischen Eigenschaften der Reaktion können je nach System stark variieren.

Die Assay-Bedingungen hängen von der zu bestimmenden ATP-Konzentration und dem zur Verfügung stehenden Messgerät ab.

Versuchsdurchführung

Das Zellmedium wurde abgesaugt, zweimal mit jeweils 2 mL Hepes-Puffer gewaschen und erneut abgesaugt. Danach wird die Probe mit 1 mL Pufferlösung und 10 µL Glucoselösung versetzt und ca. 15 min stehen gelassen. Unmittelbar vor der Ultraschallbehandlung wird EDTA zugesetzt (10 µL EDTA auf 1 mL Hepes-Puffer). Die Sonifikation erfolgt für 20 Sekunden. Unmittelbar danach werden die Proben mit 250 µL eines 1:1-Gemisches aus DMSO und EDTA gemischt (Quenschen) und auf Eis aufbewahrt.

Reagenzien:

- tris-Acetat-Puffer (Fa. Bioorbit)

- ATP- Monitoring-Reagenz (Fa. Bioorbit)
- Phosphoenolpyruvat als Na-Salz (PEP) (Fa. Bioorbit), $c = 20$ mmol/L (entspricht 23,4 mg PEP in 5 mL H₂O)
- 100 μ L Pyruvatkinase (PK, Fa. Boehringer) werden in einem Eppendorf-Cup 5 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 100 μ L tris-Acetat-Puffer resuspendiert und mit einer minimalen Menge Albumine Bovine (BSA, Fa. Sigma) versetzt.
- ATP-Standard (Fa. Bioorbit) $c = 10$ μ mol/L werden mit aqua dest. auf $c = 1$ μ mol/L verdünnt.

Nach der Vorbereitung der Zellen und der Zugabe der Reagenzien erfolgten die ATP-Bestimmungen bei Raumtemperatur mit einem Luminometer (Bioorbit 1250-Luminometer Turku, Finnland).

Reihenfolge der Zugabe:

0,2 mL Tris-Acetat-Puffer

+ 0,1 mL ATP-Monitoring-Reagenz → B1

+ 10 μ L bis 30 μ L Probelösung → S1

+ 10 μ L ATP-Lösung ($c = 1$ μ mol/L) → In1

+ 2,5 μ L PEP-Lösung ($c = 20$ mmol/L) → B2

+ 2,5 μ L PK-Suspension → S2

+ 10 μ L ATP-Lösung ($c = 1$ μ mol/L) → In2

Die Berechnungen der ATP-Konzentrationen erfolgten nach folgender Formel:

$$c(\text{ATP}) = \frac{S1 - B1}{In1 - S1} \times 0,01 \text{ nmol} \times 2 \text{ (Verdünnung mit DMSO)} / \text{Proteingehalt (mg/mL)} / \text{Volumen (mL)}$$

2.1.3 Viabilitätstest der Zellreihen (Dimethylthiazol-Tetrazolium-Bromid-Viabilitätstest)

Es handelt sich um einen kolorimetrischen nicht-radioaktiven Test, der auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) zu lila Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen beruht. Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt, wo MTT nicht absorbiert. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Viabilität der Zellen [Mosmann 1983]. Die Tetrazoliumsalsze werden außer in zytologischen Versuchen auch bei enzymatischen Untersuchungen, histochemischen Methoden und in der bakteriologischen Diagnostik verwendet. Mit diesem Test kann also auf spektrophotometrische Weise das Zellwachstum als Funktion der Mitochondrienaktivität lebender Zellen nachgewiesen werden.

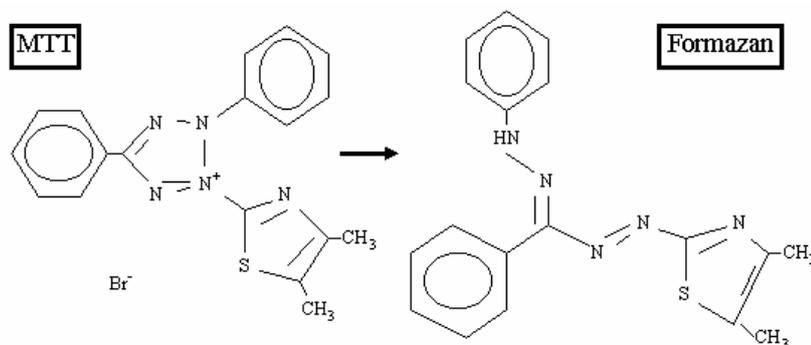


Abbildung 7: Reduktion von MTT zu Formazan

Versuchsdurchführung:

Die Zellen wurden in Microtiterplatten (96-well) mit jeweils 100 μ L Medium für 24 Stunden inkubiert. Jedes well wurde mit 10 μ L MTT-Lösung (Stammlösung: 5 mg MTT in 1 mL Wasser) versetzt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Das Beenden der MTT-Reduktion und das Auflösen der gebildeten Formazankristalle erfolgte durch Zugabe von 100 μ L einer Lösung von 10 % Natri-

umdodecylsulfat in Salzsäure der Konzentration 10 mmol/L. Damit sich die Kristalle vollständig auflösen und die Luftblasen an der Flüssigkeitsoberfläche verschwinden, erfolgte eine weitere Inkubation für 12 bis 24 h bei 37 °C. Nach der Überprüfung, ob sich der Farbstoff vollständig gelöst hat, erfolgte mit einem Spektralphotometer die Messung der Absorption bei 550 nm. Das MTT-Kit stammt von der Fa. Roche.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 95% Luft, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus) inkubiert. Für die Kultur der Zelllinien wurden Flaschen und Schälchen (Greiner Bio-one cellstar) unterschiedlicher Größe verwendet und die Zellen in Konfluenz gehalten. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage mit DMEM, Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium, (Gibco BRL Life Science) bzw. Optimem für die NT2-Zellen (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Die optische Beurteilung der Zellen erfolgte mit einem Mikroskop (Leitz Diavert Periplan) in 10facher Vergrößerung.

2.2.2 Trypsinieren

PBS (Dulbecco, Seromed-Biochrom) enthält wenig Calcium und Magnesium, was bei der Lösung von Zellen sehr hilfreich ist (als Verdünnungsmittel für Trypsin). Weiterhin hindert es frische Zellen daran zu verklumpen.

Für das Erstellen von Subkulturen wird üblicherweise 0,05 - 0,25 % Trypsin verwendet, um Zellen aus Monolayer-Kulturen enzymatisch vom Untergrund zu lösen und in Suspension zu bringen. Die Stärke und Einwirkdauer dieses Enzyms sind kritische Faktoren für ein gutes Wachstum nach der Trypsinierung.

Um die hemmenden Substanzen des Kulturmediums zu entfernen, wird vor dem Trypsinieren die Kultur zweimal mit PBS-Puffer gespült. Die Aktivität des

Enzyms wird nach Erreichen der Einwirkzeit durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt.

2.2.3 K 562-Zellen

Humane, CD 34 neg., chronisch-myelogene Leukämie-Zelllinie (ATCC-No:CCL-243), die spontan in Vorläufer der erythroiden, granulozytischen oder monozytischen Reihe differenzieren kann [Klein E 1976]. Sie wurde in Dulbeccos Modified Eagle medium (DMEM) mit 10% fötalen Kälberserum (Sigma) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert. Freundliche Übernahme der Zelllinie aus dem molekularbiologischen Labor der Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des UKE, Hamburg.

2.2.4 HEK 293-Zellen

Bei der Zelllinie HEK 293 handelt es sich um Adenovirus 5 transformierte humane embryonale Nierenepithelzelllinie [Graham FL 1977]. Auch sie wurde in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalen Kälberserum (Sigma) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert.

2.2.5 NT2-Zellen

Die NT2-Zelllinie ist eine humane Teratomkarzinomzelllinie und zeigt Charakteristika einer neuronalen Vorläuferzelle. Sie kann durch Zugabe von Retinsäure in vitro in postmitotische Neurone differenzieren (hNT Neurone) [Pleasure S.J. 1992]. Diese differenzierten, neuronalen Zellen zeigen verschiedenste neuronale Marker [Lee 1993; Pleasure 1993].

Die Differenzierung ist z.B. daran zu erkennen, dass die Nervenzellen typische Markerproteine exprimieren. Zudem ist es möglich, diese Zellen in Ratten- oder auch menschliche Hirne zu verpflanzen, in denen sie monatelang überleben, sich in das neuronale Netzwerk einfügen und zum Beispiel abgestorbene Nervenzellen ersetzen können.

Freundliche Bereitstellung der Zelllinie aus dem Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg.

2.2.6 Retinsäureinduzierte Differenzierung

Durch Inkubation mit 10 μL all-trans-Retinsäure (Sigma) in Kulturmedium können NT2-Zellen zu Zellen mit neuronalem Charakter differenzieren. Die Stocklösung (0,01 M in DMSO) wurde für die Induktion als Lösung mit der Konzentration $c = 0,1 \text{ mmol/L}$ verwendet. Für die Differenzierung wurden 2×10^6 Zellen in einen 75-cm^3 -Falcon ausgesät und zweimal wöchentlich für 2 Wochen mit der $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ Retinsäurelösung ($c = 0,01 \text{ mmol/L}$) behandelt. Die Retinsäure ist zu konfluent wachsenden Zellen gegeben worden und bei jedem Mediumwechsel erneuert worden [Lee 1993].

2.2.7 Inhibitor (Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon)

Die Zugabe eines spezifischen Inhibitors der TPP, Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon (AAF-CMK), zum Kulturmedium von Zellen induziert die lysosomale Akkumulation der Untereinheit c. In einem in vitro Experiment führte die Zugabe von AAF-CMK zur Proteolyse der Untereinheit c, aber nicht der b-Untereinheit der ATP-Synthase [Ezaki et al. 2000]. Die Inhibitorlösung ist wie folgt verdünnt worden, um eine Reihe von verschiedenen Konzentrationen herzustellen und ihre spezifischen Auswirkungen auf die verschiedenen Zellreihen zu untersuchen.

Die folgenden Angaben sind berechnet für ein 75-er Falcon (Greiner Bio-One Cellstar) der jeweiligen Zelllinie. Als Ausgang dient die 25 mM Lösung des Inhibitors AAF-CMK (Sigma). 8 μL einer 25 mM Lösung werden mit 92 μL Medium (DMSO oder Optimem, je nach Zellreihe) gemischt, dies entspricht einer 2 mM Lösung. 12 mL Medium werden nun mit 60 μL der 2 mM Inhibitorlösung gemischt (10 μM Lösung). Von diesen 12 mL werden 2,4 mL Medium aus dem Falcon entnommen und in 9,6 mL Medium gelöst (2 μM Lösung). Davon werden nun 3 mL entnommen und in dem nächsten Falcon mit 9 mL gemischt (0,5 μM Lösung).

Durch diese Verdünnungsreihe waren unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors hergestellt, die bei jedem Mediumwechsel der Zellen (alle 2-3 Tage) erneuert wurden. Die Auswirkungen der Inhibition wurden mit den genannten Methoden untersucht.

2.2.8 Pseudoinhibitor (H-D-Pro-Phe-Arg-Chlormethylketon)

Als Kontrolle diente die Zugabe eines von uns sogenannten "Pseudoinhibitors" aus der Gruppe der Chlormethylketone ohne proteolytische Auswirkungen. Das Substrat ist von Bachem.

Ergebnisse

2.3 ATP-Bestimmung

Nach Aufzucht der Zellen erfolgte die im Methodenteil erläuterte Behandlung der Zellen mit der Inhibitor- bzw. Pseudoinhibitorlösung. Über Proteinmessungen der Zelllysate und luminometrische ATP-Bestimmung zu gewählten Zeitpunkten mit Doppelbestimmung (nach 7 und 14 Tagen Behandlung) waren Messwerte ermittelt. Aus den Werten konnten nach oben genannter Formel ATP-Werte errechnet werden.

Die ermittelten ATP-Konzentrationen der verschiedenen Zelllinien sind in den nachfolgenden Abbildungen grafisch dargestellt worden.

2.3.1 NT2-Zellen

Schon in der ersten Behandlungswoche zeigen die neuronal determinierten NT2-Zellen eine deutliche Reaktion auf den zugesetzten Inhibitor Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon. Dieser führt bei den durchgeführten luminometrischen Bestimmungen zu einer stetigen Abnahme der ATP-Konzentration der Zellen bei steigender Inhibitorkonzentration wie auf Abbildung 8 erkennbar. Auf der x-Achse aufgetragen sehen wir die unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors, auf der y-Achse die gemessene ATP-Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt.

Zur Erläuterung bedeutet in den Abbildungen die Abkürzung „0,5 Inhibitor“ eine 0,5 μM Lösung, dementsprechend eine 2 Inhibitor Lösung eine 2 μM Lösung des Inhibitors, sowie eine 10 Inhibitor Lösung eine 10 μM Lösung.

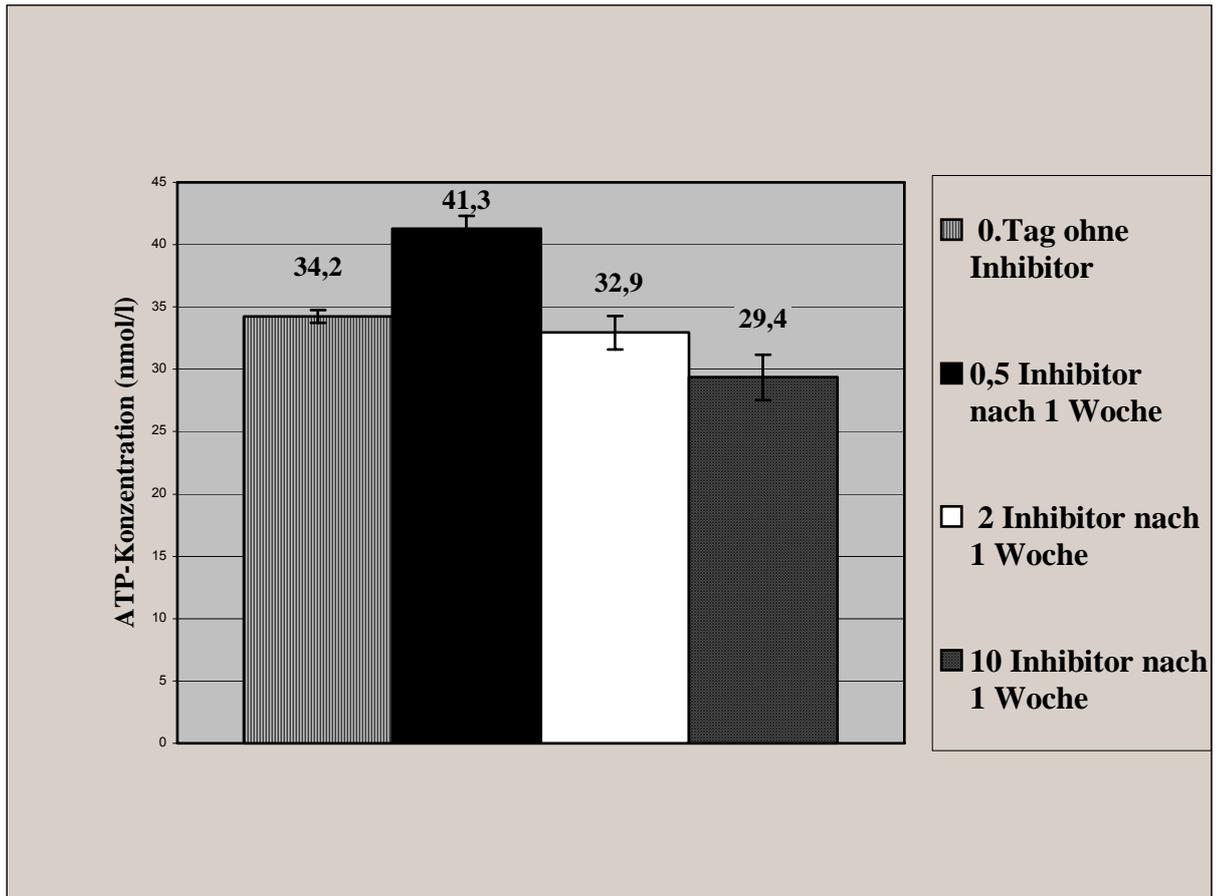


Abbildung 8: NT2-Zellen unter Inhibitoreinfluss in der 1. Woche

Deutlicher wird der Effekt der Inhibition der NT2-Zellen in der 2. Behandlungswoche (s. Abb. 9). Es ist festzustellen: Je stärker die Konzentration des Inhibitors, desto stärker ist die Abnahme der gemessenen ATP-Konzentration.

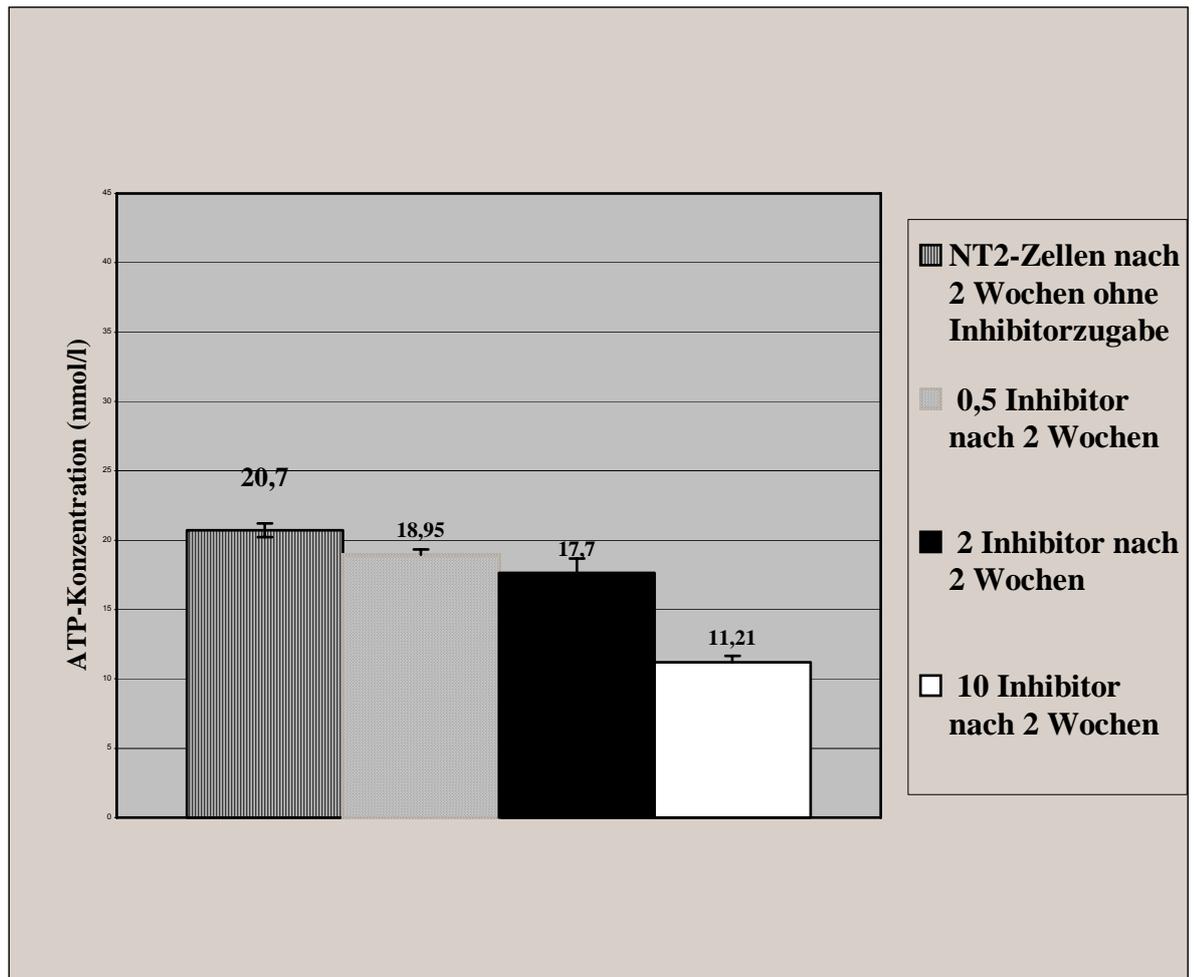


Abbildung 9: NT2-Zellen unter Inhibitoreinfluss in der 2. Woche

Die Messungen wurden zu gleichen Zeitpunkten mit dem sogenannten Pseudoinhibitor (H-D-Pro-Phe-Arg-Chlormethylketon) durchgeführt, der, so wie die Abbildungen 10 und 11 zeigen, auch nach zweiwöchiger Behandlung zu keiner Abnahme der ATP-Konzentration führt.

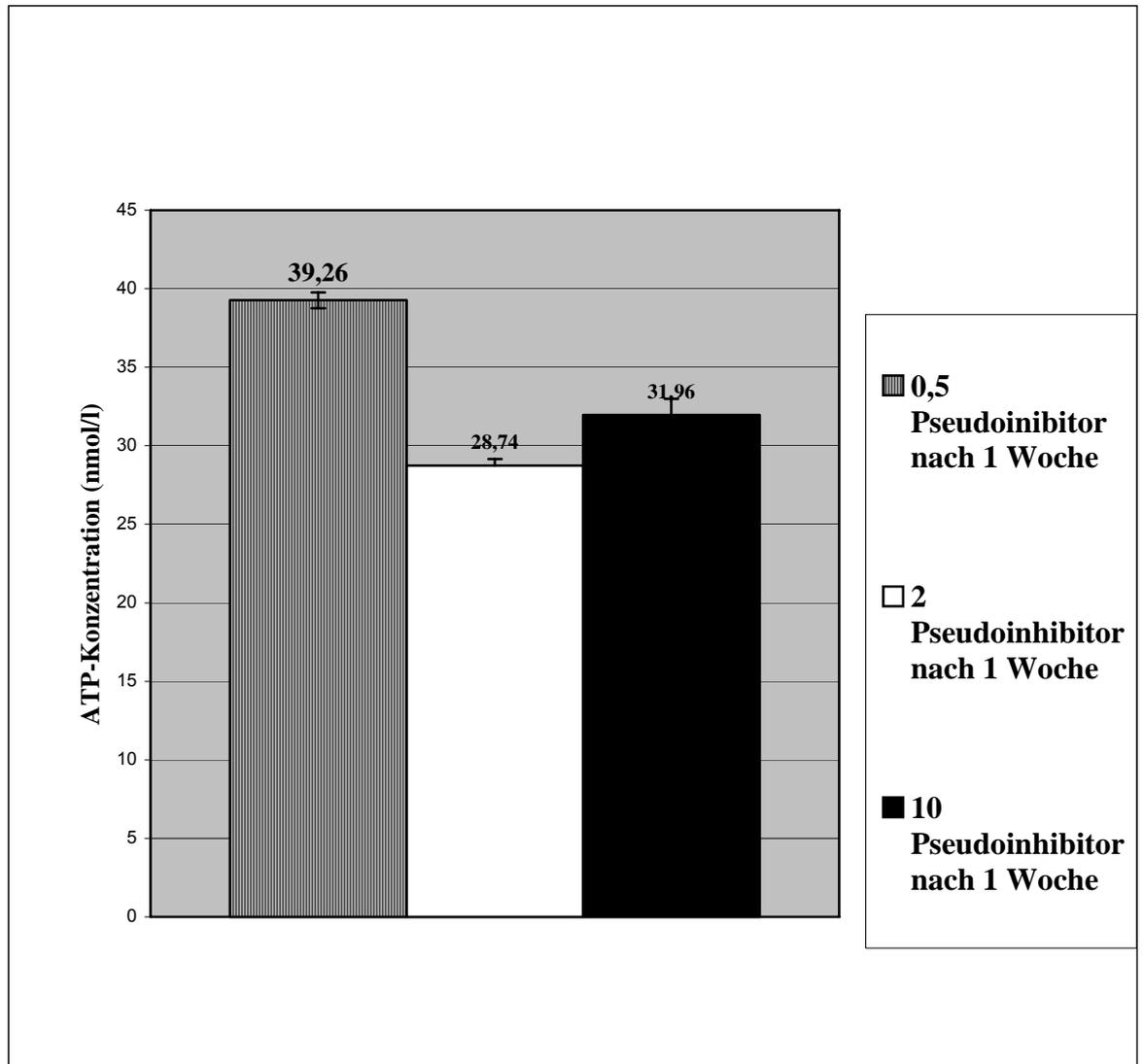


Abbildung 10: NT2-Zellen unter Pseudoinhibitoreinfluss in der 1. Woche

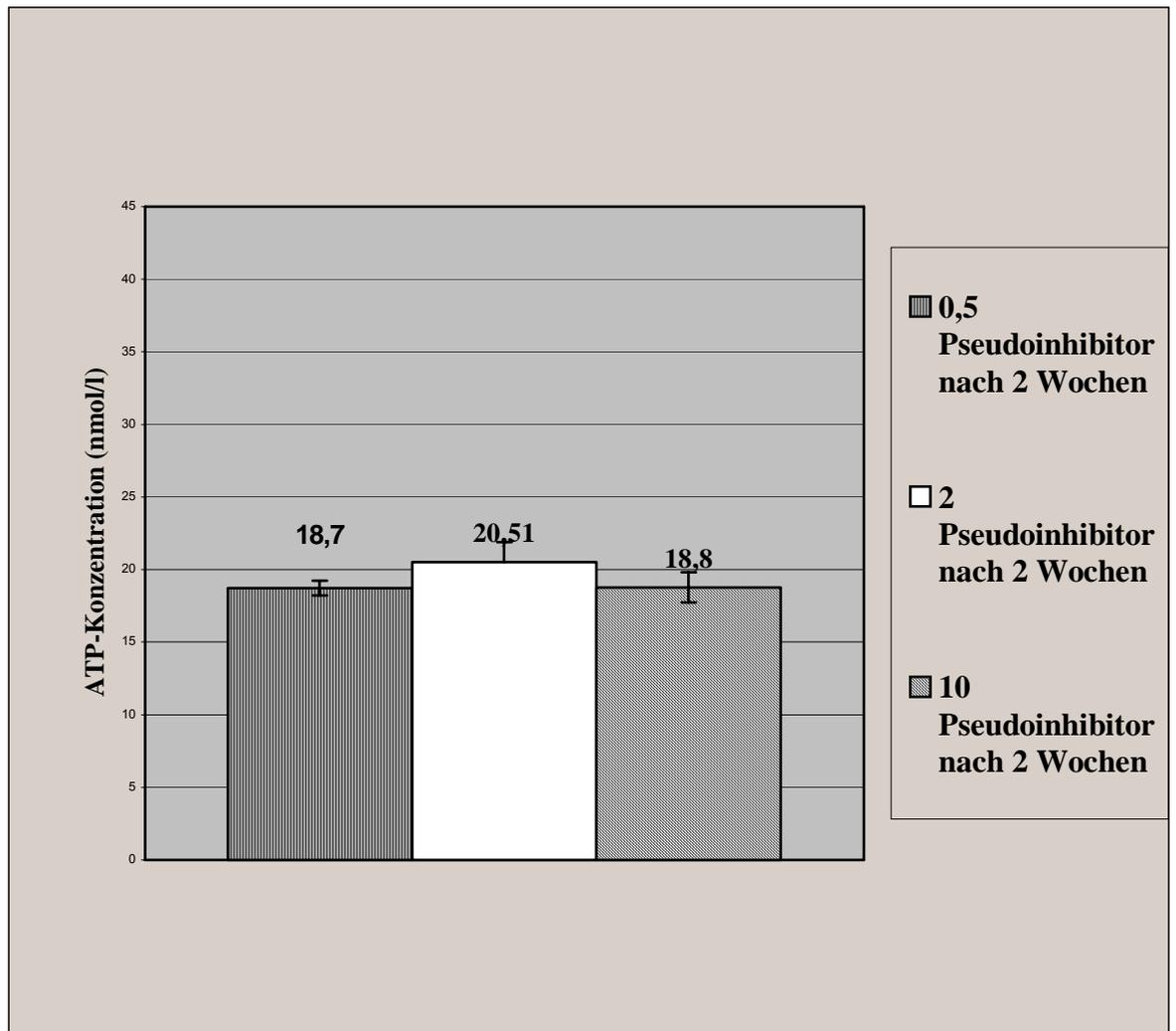


Abbildung 11: NT2-Zellen unter Pseudoinhibitoreinfluss in der 2. Woche

2.3.2 293-Zellen

Als Vergleich dienten die 293-Zellen, eine humane embryonale Nierenepithelzelllinie. Diese wurde analog der NT2-Zellreihe jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors und Pseudoinhibitors versetzt. Messungen erfolgten analog zu den anderen Zellreihen an Tag 7 und 14.

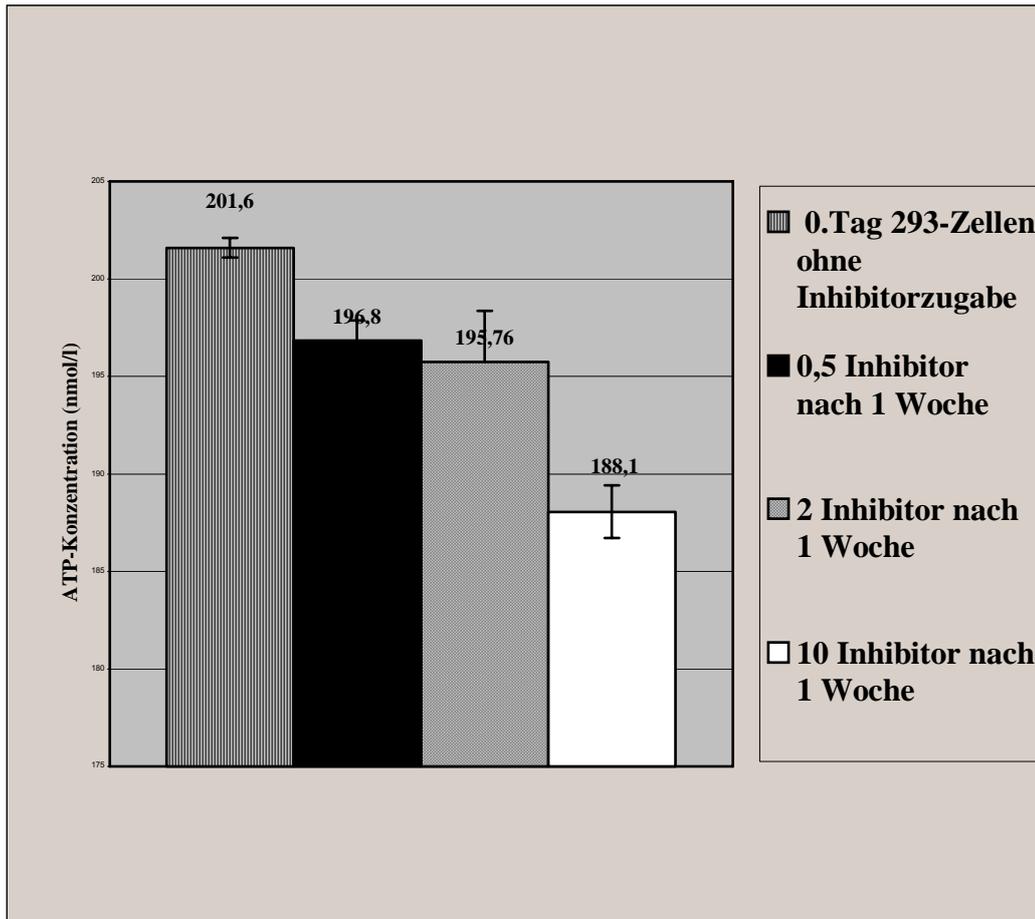


Abbildung 12: 293-Zellen unter Inhibitoreinfluss in der 1. Woche

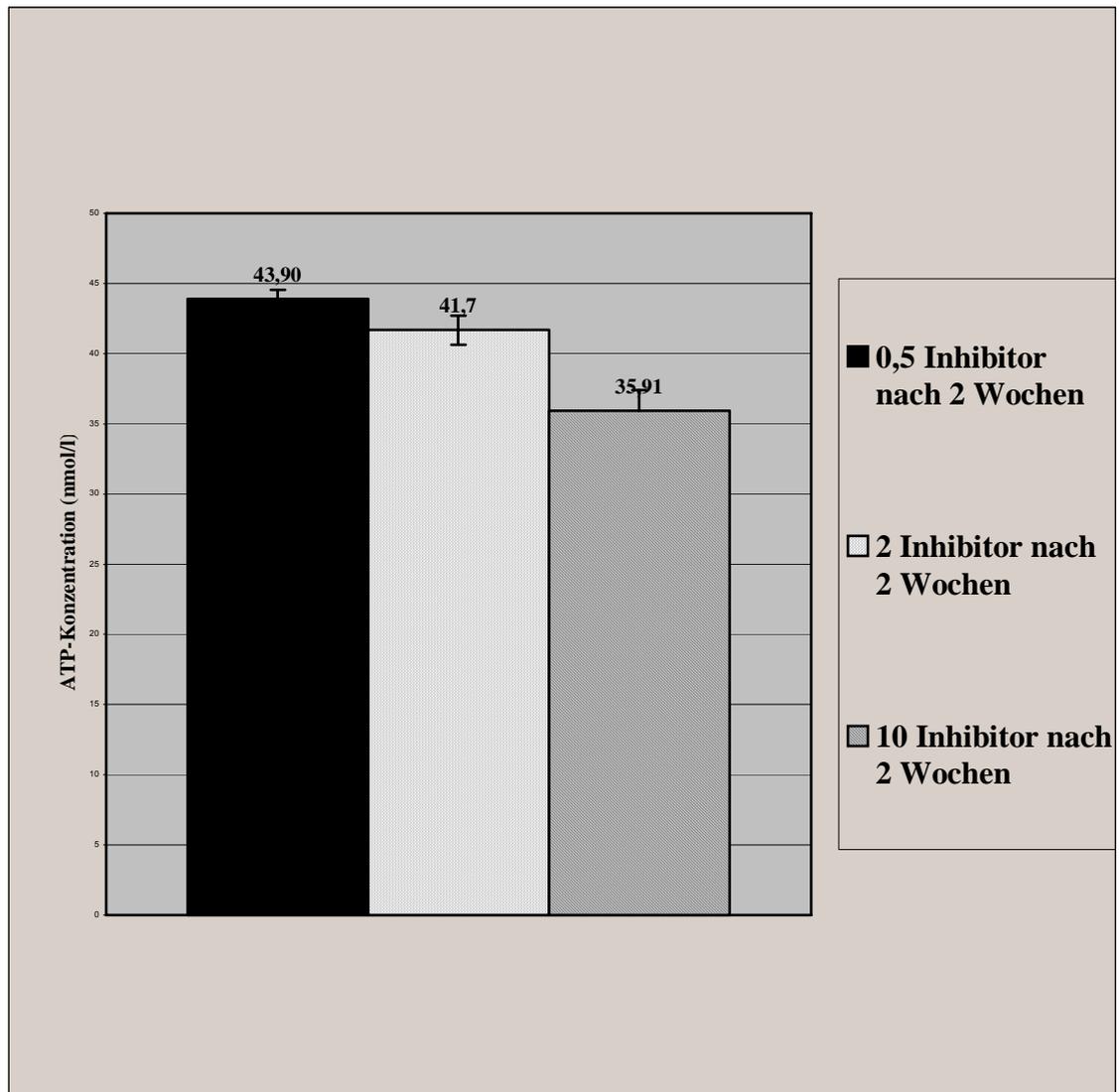


Abbildung 13: 293-Zellen unter Inhibitoreinfluss in der 2. Woche

Nach zweiwöchiger Behandlung nahm die ATP-Konzentration rapide ab, allerdings konnten bei steigender Inhibitorkonzentration auf lumineszometrischem Wege keine wesentlichen Änderungen der ATP-Konzentrationen gemessen werden.

Ähnlich verhält es sich mit den 293-Zellen unter Pseudoinhibitoreinfluss.

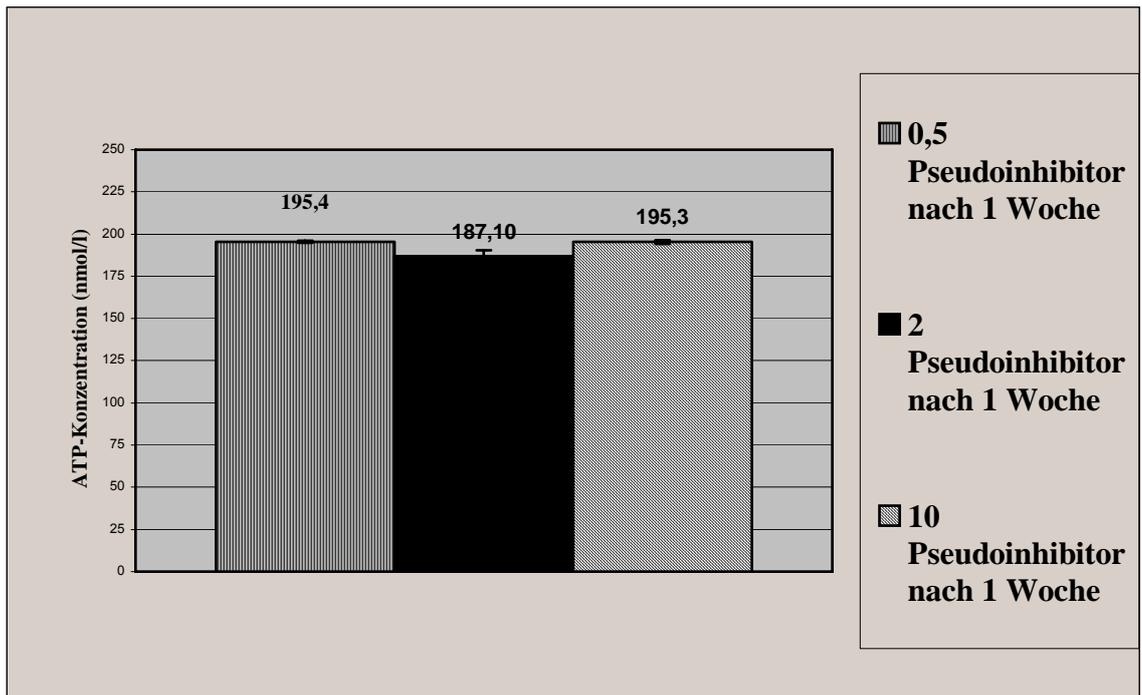


Abbildung 14: 293-Zellen unter Pseudoinhibitoreinfluss in der 1. Woche

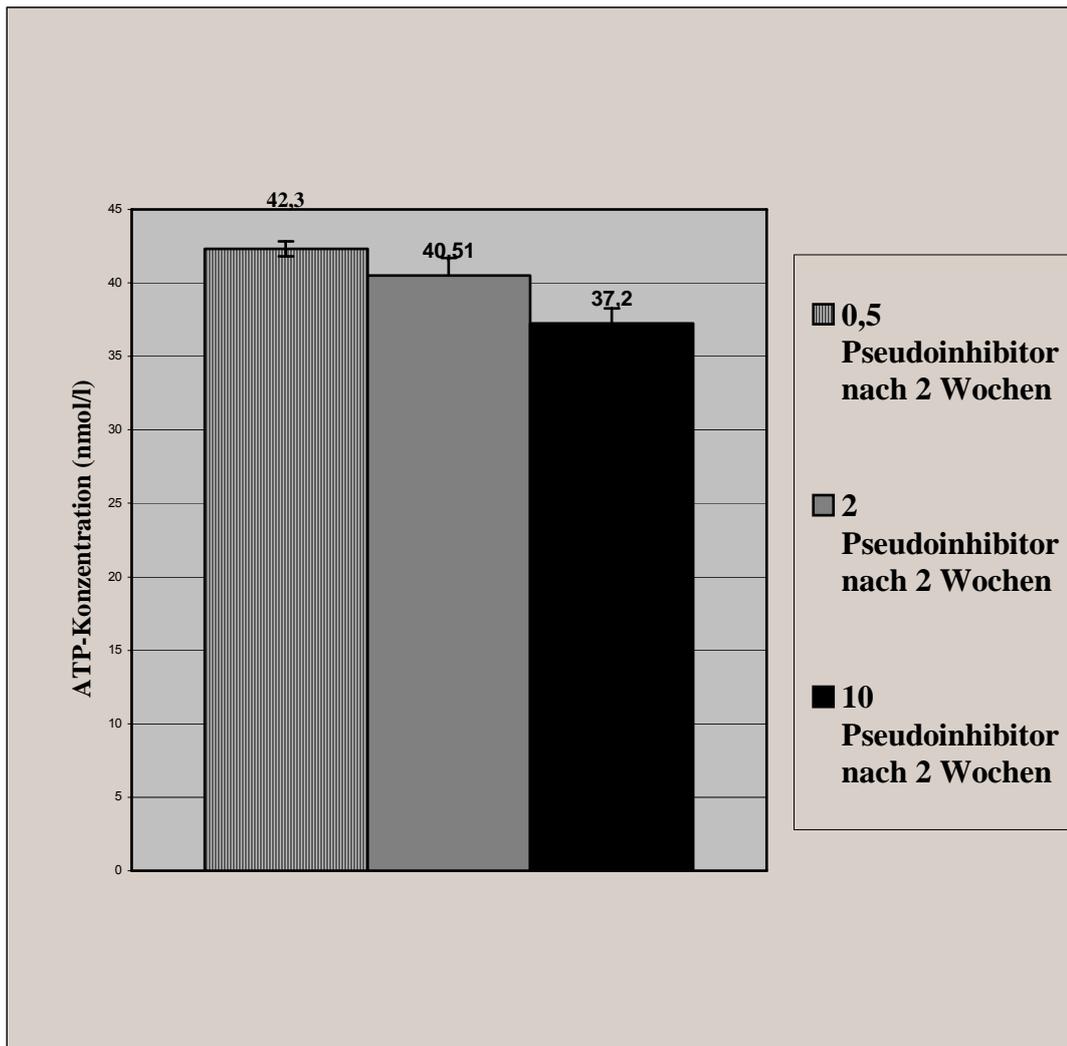


Abbildung 15: 293-Zellen unter Pseudoinhibitoreinfluss in der 2. Woche

2.3.3 K 562-Zellen

Zum Vergleich erfolgten die Untersuchungen auch mit den K562-Zellen, einer chronisch-myelogenen Leukämie-Zelllinie. Im Vergleich zu den neuronal determinierten NT2-Zellen zeigt diese Zelllinie keine signifikante Abnahme der ATP-Konzentration unter Inhibitoreinfluss.

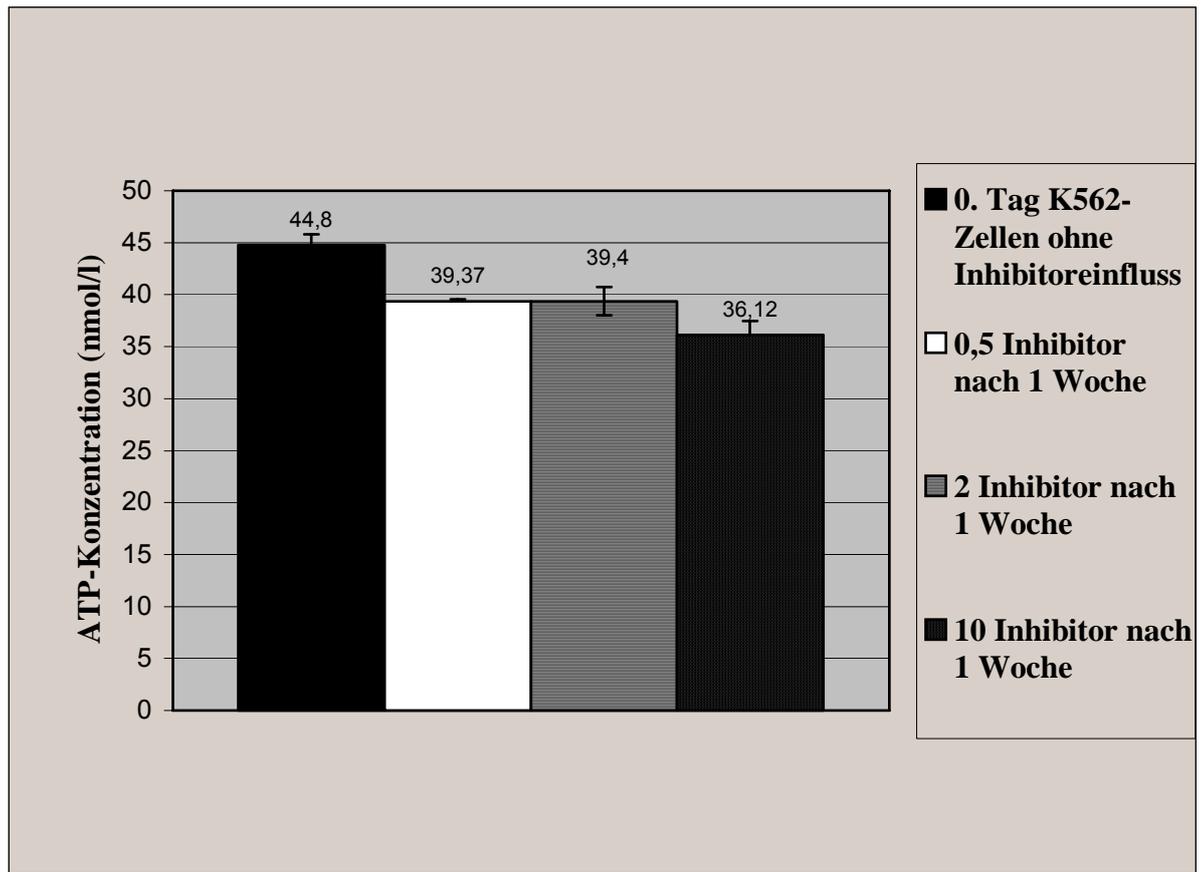


Abbildung 16: K562-Zellen unter Inhibitoreinfluss in der 1. Woche

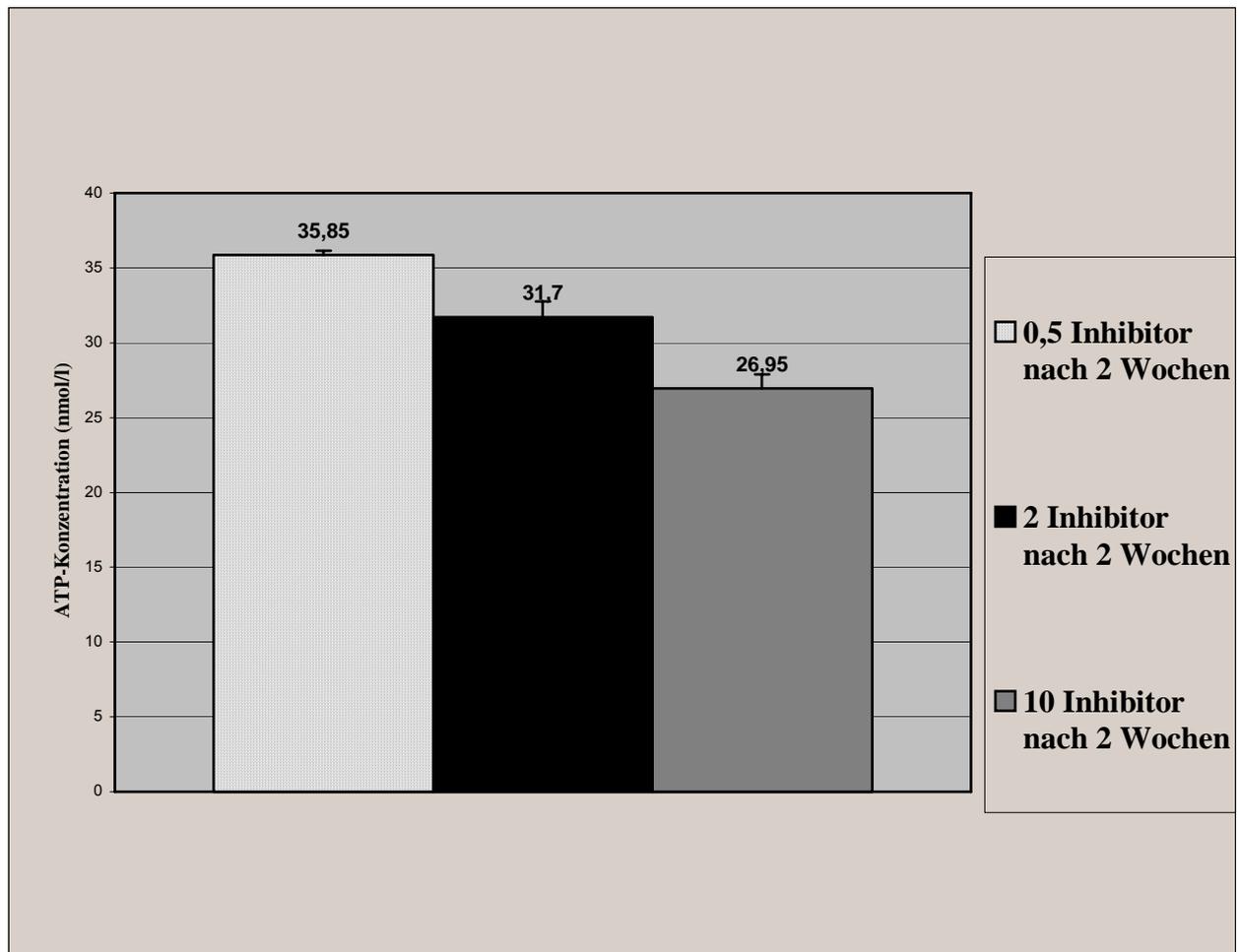


Abbildung 17: K562-Zellen unter Inhibitoreinfluss in der 2. Woche

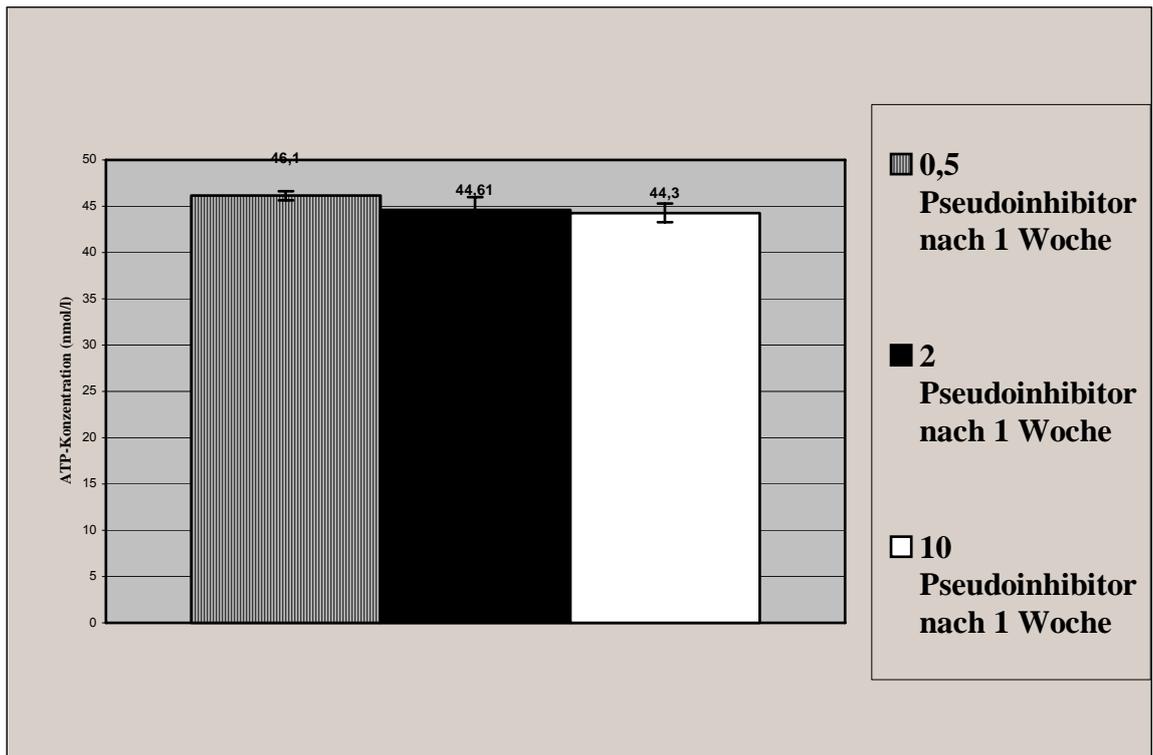


Abbildung 18: K562-Zellen unter Pseudoinhibitoreinfluss in der 1. Woche

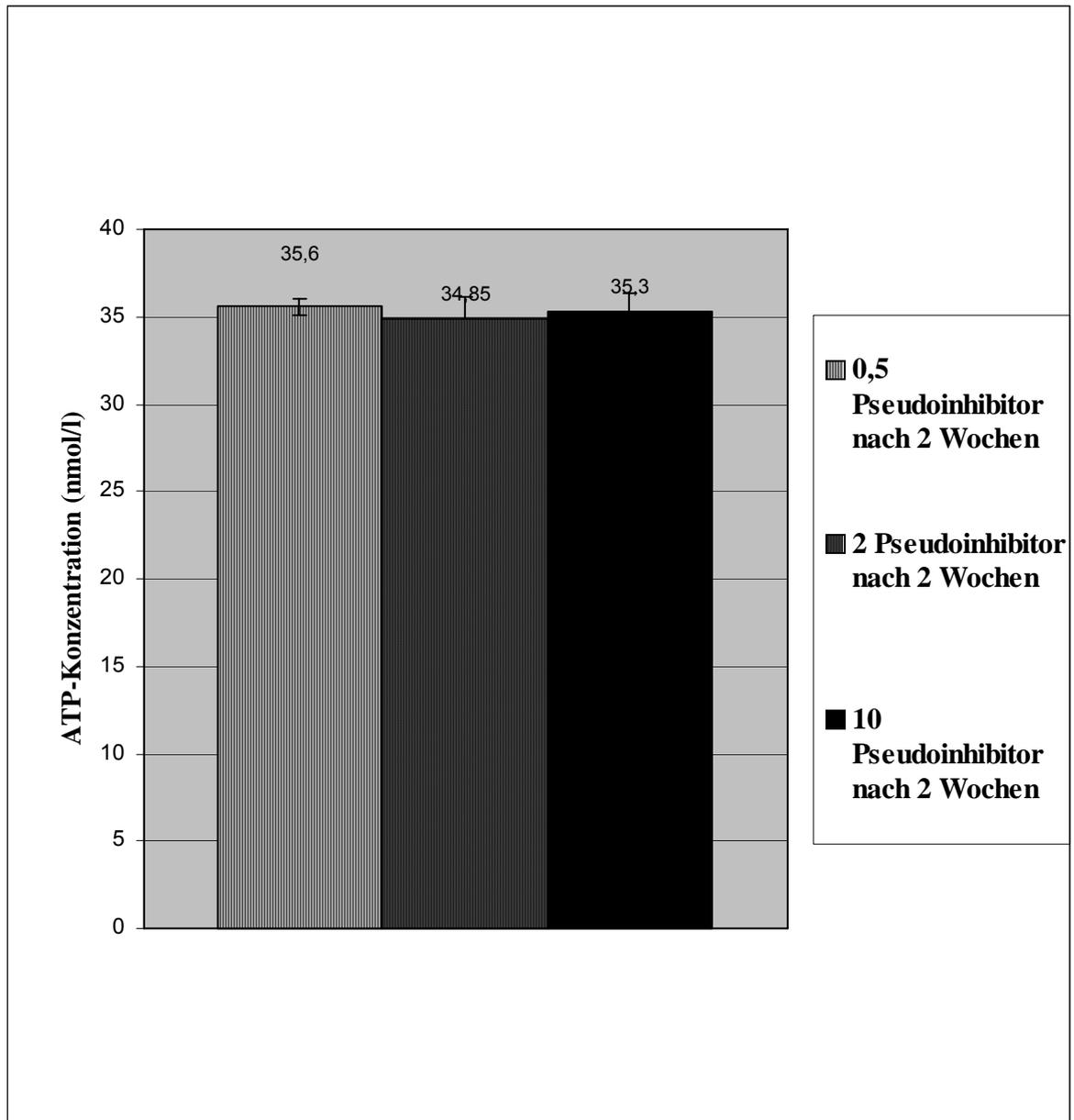


Abbildung 19: K562-Zellen unter Pseudoinhibitoreinfluss in der 2. Woche

Wie die Abbildungen 18 und 19 zeigen, kommt es unter der Behandlung mit Pseudoinhibitor zu keiner Abnahme der ATP-Konzentration der K562-Zellen.

2.4 Viabilitätstest

Um ein Maß für die Viabilität der Zellen während der Behandlung mit Inhibitor- bzw. Pseudoinhibitorlösung zu erhalten, wurde parallel zu den ATP- Bestimmungen der colorimetrische MTT-Test durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach 7 bzw. 14 Tagen Behandlung der Zellen mit der Inhibitor- bzw. Pseudoinhibitorlösung.

2.4.1 NT2-Zellen

Um das Maß für die Überlebenswahrscheinlichkeit parallel zu bestimmen, wurden zu gleichen Zeitpunkten Viabilitätsmessungen mit Hilfe des colorimerischem MTT-Testes durchgeführt.

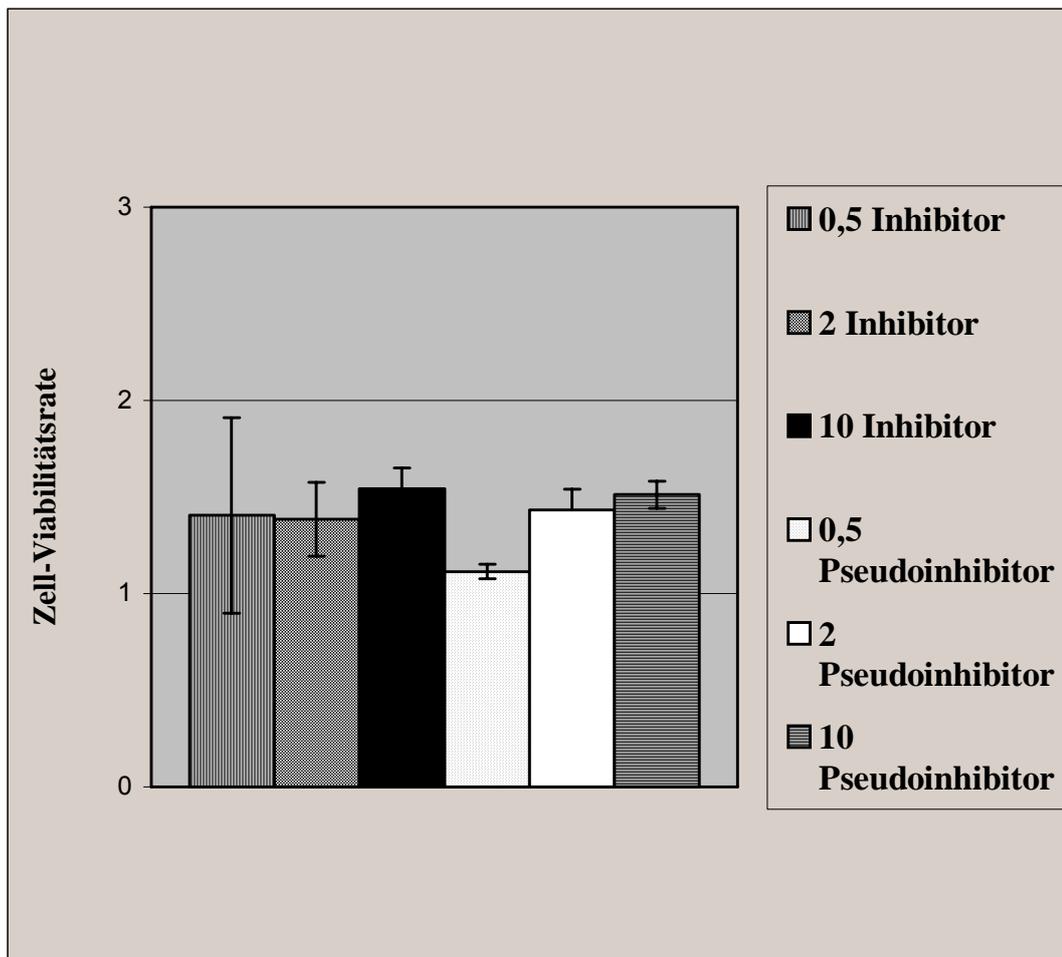


Abbildung 20: Messergebnisse MTT-Test NT2-Zellen nach 1 Woche Behandlung

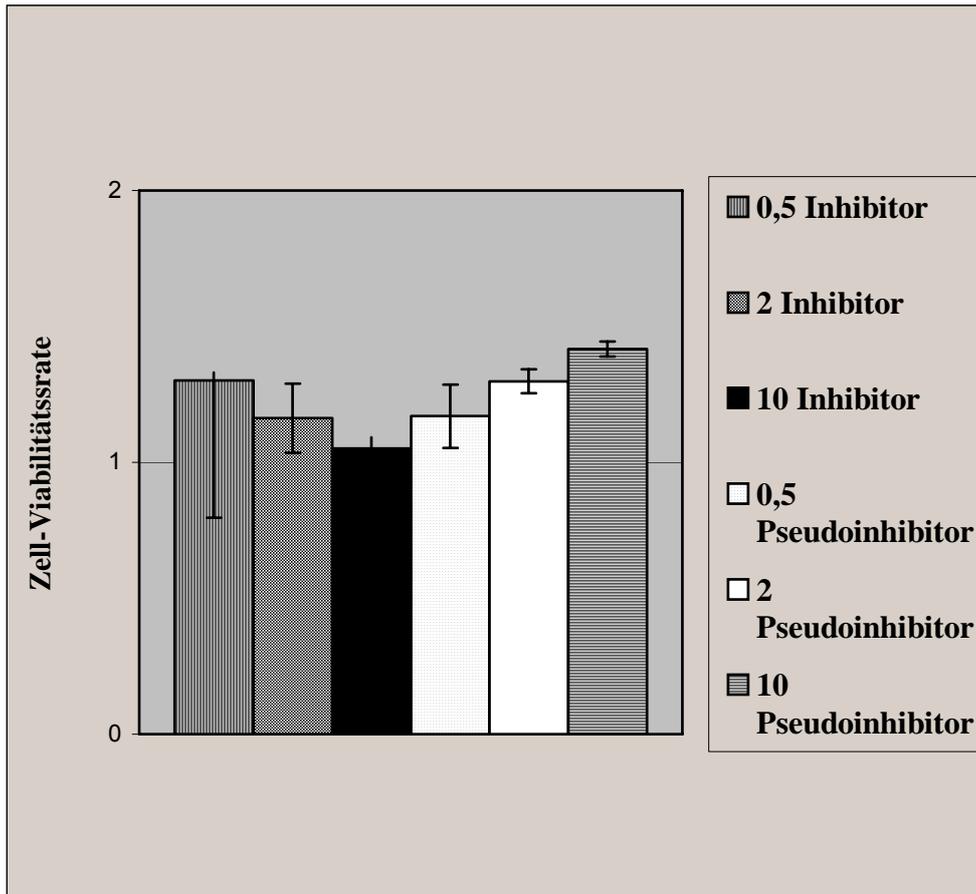


Abbildung 21: Messergebnisse MTT-Test NT2-Zellen nach 2 Wochen Behandlung

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der NT2-Zellen nimmt unter Behandlung des Inhibitors in der 2. Woche deutlich weiter ab. Die Zellen, welche mit Pseudoinhibitorlösung behandelt worden sind, zeigen bessere Überlebensraten.

2.4.2 293-Zellen

Auch bei den 293-Zellen konnte auf spektrophotometrische Weise das Zellwachstum als Funktion der Mitochondrienaktivität lebender Zellen nachgewiesen werden. Abbildung 22 verdeutlicht die Viabilität in der 1. Behandlungswoche.

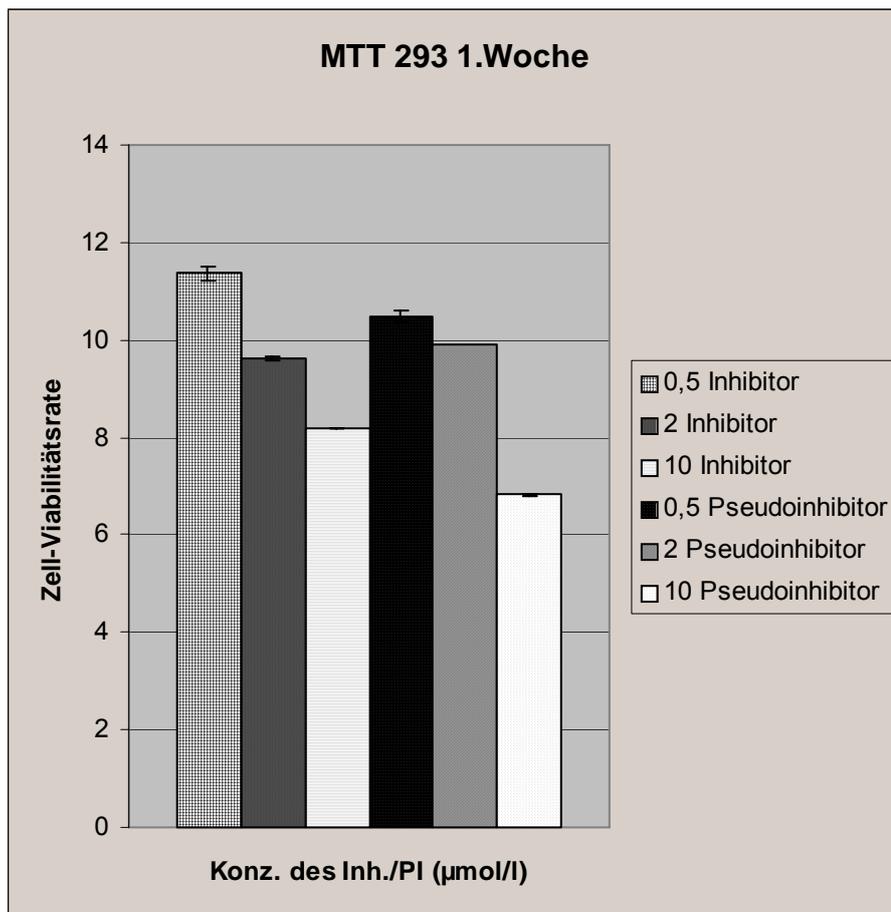


Abbildung 22: Messergebnisse MTT-Test 293-Zellen nach 1 Woche Behandlung

Wie bereits bei der ATP-Bestimmung der 293-Zellen erkennbar, konnten bei den 293-Zellen auch beim MTT-Test in der 1. Behandlungswoche hohe Viabilitätsraten gemessen werden, die Zellen verlieren jedoch in der 2. Woche erheblich an Viabilität

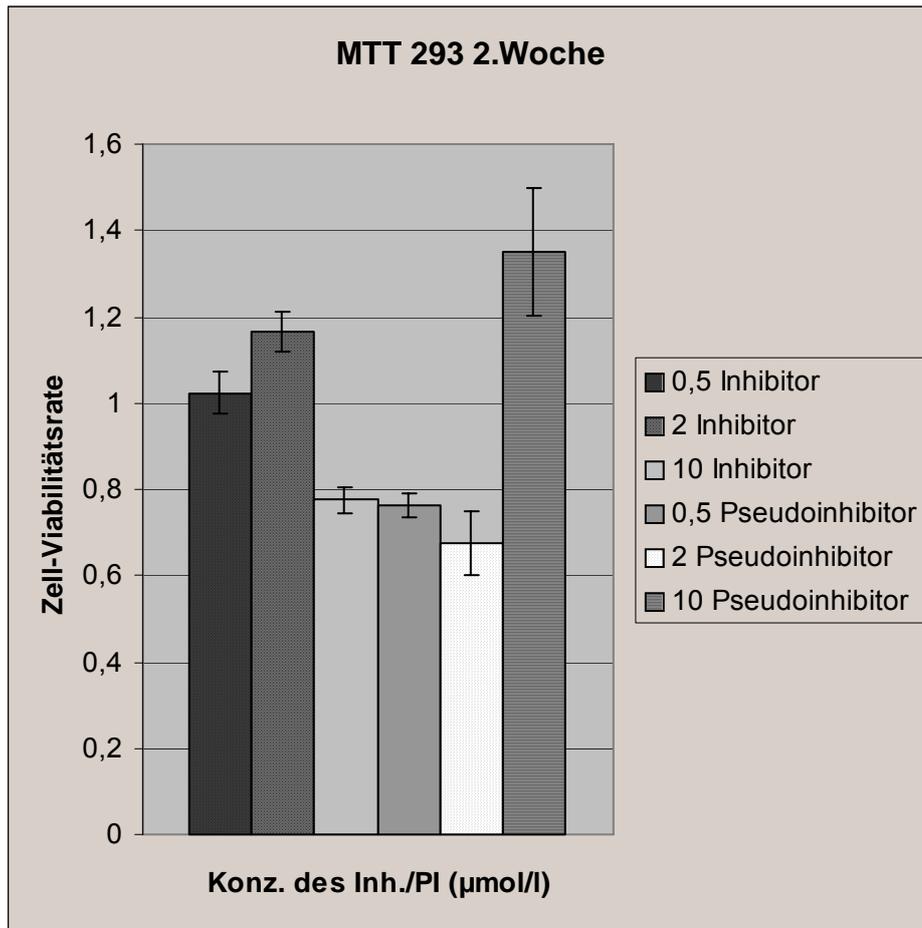


Abbildung 23: Messergebnisse MTT-Test 293-Zellen nach 2 Wochen Behandlung

2.4.3 K 562- Zellen

Die nächste Vergleichszelllinie waren die K 562-Zellen, die humane, chronisch-myelogene Leukämie-Zelllinie. Auch sie wurde dem Viabilitätstest immer parallel zu den ATP-Bestimmungen unterzogen.

In der 1. Behandlungswoche unter Inhibitor- bzw. Pseudoinhibitor lässt sich keine klare Linie der Beeinflussung der Viabilität erkennen.

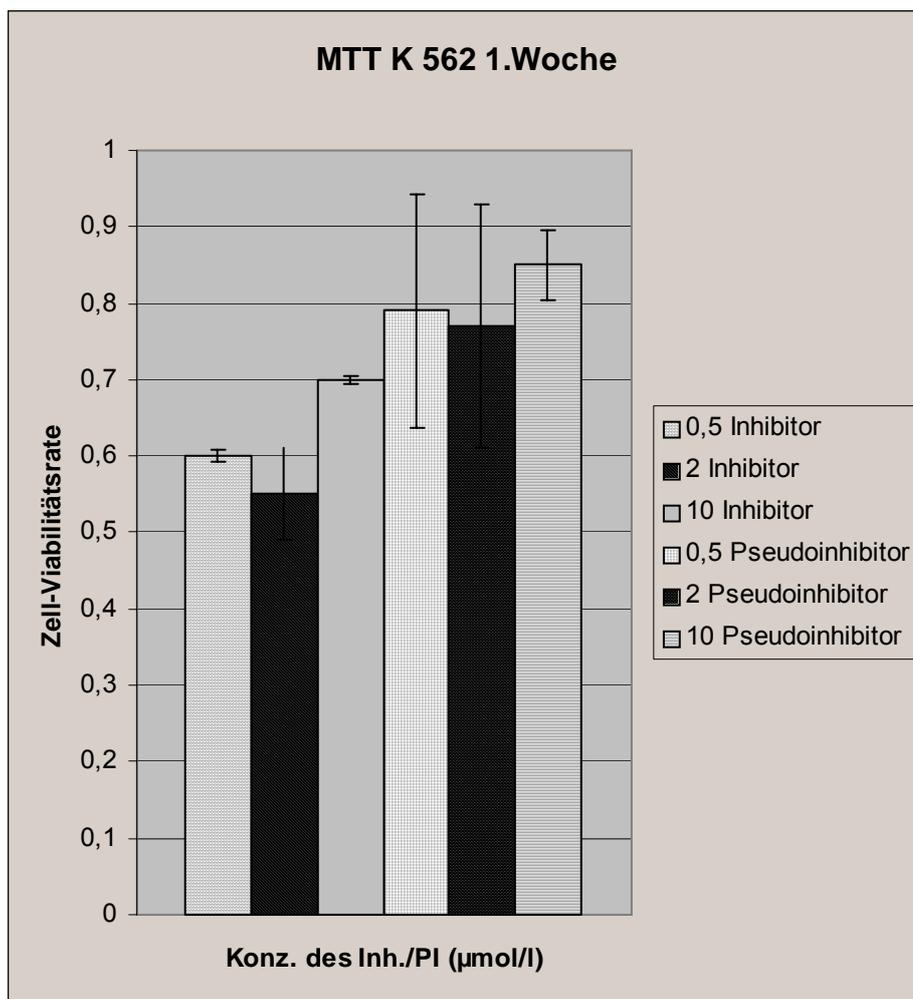


Abbildung 24: Messergebnisse MTT-Test K562-Zellen nach 1 Woche Behandlung

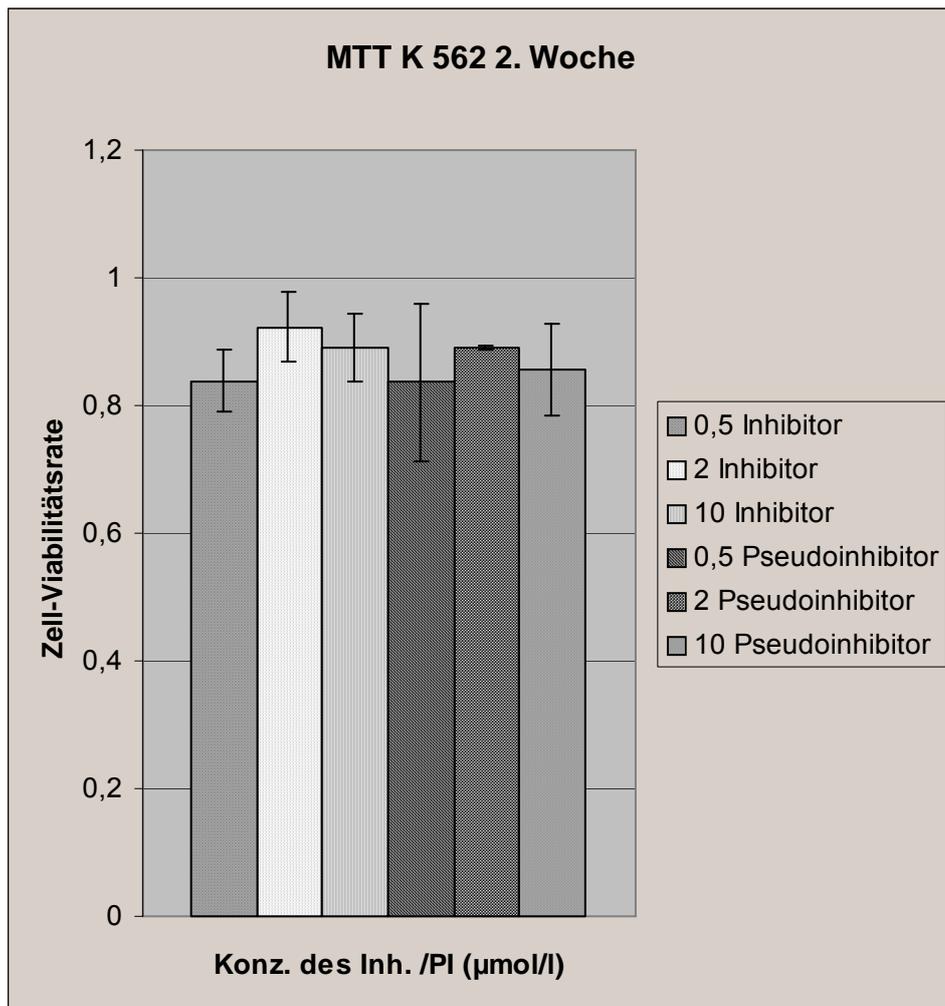


Abbildung 25: Messergebnisse MTT-Test K562-Zellen nach 2 Wochen Behandlung

Auch in der 2. Woche lässt sich keine Abnahme der Viabilität der Zellen unter Inhibitoreinfluss erkennen.

2.4.4 Differenzierte NT2 Zellen

Um das Ausmaß der Einflussnahme von Inhibition durch Inhibitor- bzw. Pseudoinhibitorlösungen zu untersuchen, erfolgte in diesem Experiment die Zugabe von Retinsäure, um eine neuronale Differenzierung über einen Zeitraum

von 2 Wochen zu induzieren. Dabei konnte eine Abnahme der ATP-Konzentration auf dem Weg zu differenzierten neuronalen Zellen gezeigt werden. In der ersten Woche waren noch keine sichtbaren Unterschiede zu beobachten, doch konnte in der 2. Behandlungswoche die ATP-Abnahme unter Retinsäure bei gleichzeitiger Inhibition gezeigt werden (s. Abb. 26)

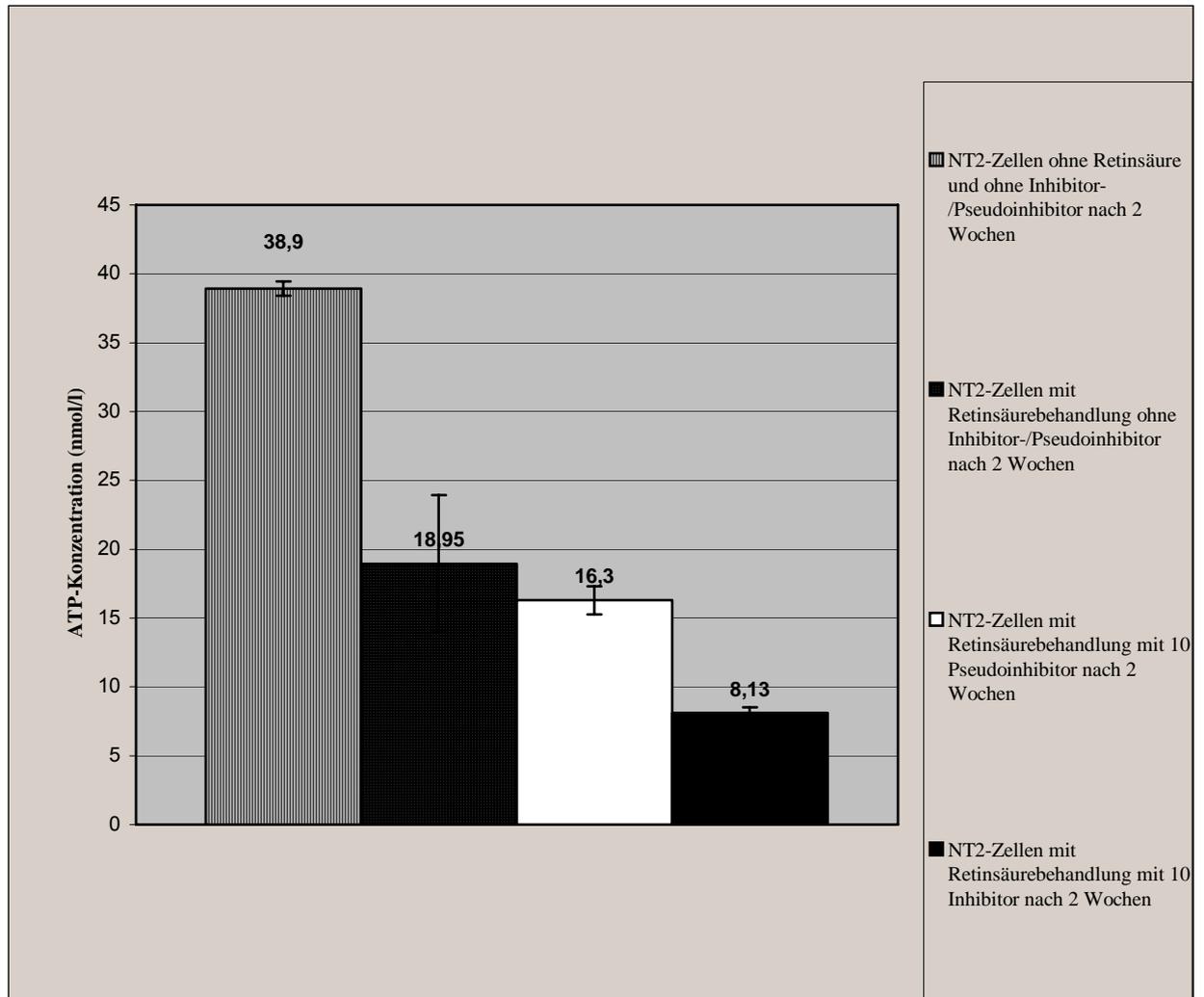


Abbildung 26: ATP-Bestimmung differenzierter Zellen nach 2 Wochen unter Retinsäure-Einfluss

4 Diskussion

Den neurodegenerativen Prozess der Erkrankung CLN2 habe ich an einem zellulären Modell in vitro nachzuahmen versucht. Ich verwendete hierzu humane NT2-Zellen, die Charakteristika von Nervenzellen aufweisen. Diese Zellen wurden durch Inhibition des Enzyms Tripeptidylpeptidase 1 (TPP 1) den Verhältnissen bei der CLN2-Krankheit angeglichen, wo die Aktivität des Enzyms TPP 1 aus genetischen Gründen fehlt.

Im ersten Teil der Arbeit habe ich die mir gestellte Frage nach den Auswirkungen der Inhibition der TPP 1-Aktivität außer an den NT2-Zellen auch an HEK 293-Zellen und K562-Zellen untersucht, und zwar in Bezug auf

- die *Viabilität* der Zellen
- den *Energiehaushalt* der Zellen (Gehalt energiereicher Phosphate).

Dazu wurden die verschiedenen Zellreihen einem spezifischen Inhibitor der lysosomalen Tripeptidylpeptidase (TPP 1) ausgesetzt. Wichtig dabei war zu sehen, ob und inwieweit die Inhibition der TPP 1 einen Einfluss auf die ATP-Konzentration der Zellen hat. Parallel dazu wurden als Kontrolle Versuche mit einem chemisch ähnlichen Pseudoinhibitor durchgeführt, der diese Auswirkung der Inhibition nicht zeigte. Außerdem wurden die Zellen einem Viabilitätstest unterzogen, um deren Überleben im Laufe der Behandlung mit dem spezifischen Inhibitor bzw. Pseudoinhibitor zu messen.

Im zweiten Teil der Arbeit bin ich der Frage nachgegangen, inwieweit eine Behandlung mit Retinsäure den Energiehaushalt der entstandenen postmitotischen, polarisierten humanen Neuronen beeinflusst.

Einfluss der Inhibition der TPP 1-Aktivität auf die Viabilität der Zellen

In meiner Untersuchung wurde der MTT-Test zur Messung der enzymatischen Aktivität und der Proliferation von Zelllinien in vitro eingesetzt. Der MTT-Test basiert auf der Bildung eines Tetrazoliumfarbstoffs. Die zelluläre Reduktion des Tetrazoliumsalzes korreliert mit der Glykolyserate und der NADH-Produktion und weniger mit der mitochondrialen Zellatmung, wie bei Einführung des MTT-Testes ursprünglich angenommen. In dem Test werden zu den gewählten Zeitpunkten alle lebenden Zellen erfasst.

Viabilität der neuronalen NT2-Zellen

An NT2-Zellen, die aufgrund ihrer Eigenschaft sich zu neuronal determinierten Zellen zu entwickeln, bei dem Modellversuch gewählt wurden, konnte gezeigt werden, dass in einem Stadium der Inhibition der TPP1 die Viabilität der Zellen im zeitlichen Verlauf abnimmt. In der zweiten Behandlungswoche ist eine Abnahme der Viabilität bei starker Inhibitorkonzentration zu beobachten (s. Abbildung 16). Im Gegensatz dazu war nach zweiwöchiger Behandlung der Zellen mit Pseudoinhibitor der Effekt des Viabilitätsverlusts nicht nachweisbar.

Somit kann daraus geschlossen werden, dass das Fehlen der TPP 1-Aktivität, das hier durch die Inhibitorzugabe erreicht worden ist, einen Zelluntergang neuronal determinierter Zellen initiiert.

Bei der Erkrankung CLN2, die typischerweise mit neurologischen Verlusten wie Visusstörung und Krampfanfällen einhergeht, kommt es

ebenfalls vor allem zu einem Verlust neuronaler Zellen [Kida E 2001]. Man kann daher vermuten, dass auch *in vivo* eine ausreichende Aktivität von TPP1 für das Überleben neuronaler Zellen erforderlich ist und die genetisch bedingte Herabsetzung der Enzymaktivität einen Teil des neurodegenerativen Mechanismus bei der CLN2-Krankheit erklärt.

Viabilität von HEK 293-Zellen und K562-Zellen

Die humane embryonale Nierenepithelzelllinie HEK 293 sowie die chronisch-myelogene Leukämie-Zelllinie K562 dienen beide als Vergleichszelllinien. Sie sind nicht neuronal determiniert. Parallel zu den NT2-Zellen wurden sie mit Inhibitor- und Pseudoinhibitorlösung behandelt und Viabilitätstesten zu gewählten Zeitpunkten unterzogen. Bei ihnen konnte bei steigender Inhibitorkonzentration, auch nach zweiwöchiger Behandlung, keine eindeutige Abnahme der Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt werden.

Die Herabsetzung der Aktivität des Enzyms TPP1 hat also nur bei den neuronal determinierten Zellen, nicht aber bei den beiden anderen untersuchten Zelllinien, die Viabilität herabgesetzt. Dies spricht dafür, dass der Zusammenhang zwischen Aktivität von TPP1 und Zellviabilität charakteristisch für neuronale Zellen ist.

Einfluss der Inhibition der TPP 1-Aktivität auf den Energiehaushalt der Zellen

Zur ATP- Bestimmung der Zellen benutzte ich die Luminometrie, eine Methode zur Bestimmung biologisch aktiver Substanzen, bei der die Indikatorreaktion – durch Luciferase-Wirkung – eine messbare Lumineszenz erzeugt.

Alle drei Zellarten wurden nach dem im Methodenteil erläuterten Verfahren mit den Reagenzien versetzt und die messbare Energie im Luminometer erfasst. So konnten zu den gewählten Zeitpunkten parallel zu dem Viabilitätstest ATP-Werte ermittelt werden.

Deutliche Unterschiede lassen sich bei den ermittelten ATP-Konzentrationen erkennen. Die neuronal determinierten NT2-Zellen zeigen eine erheblich stärkere Reaktion auf den zugesetzten Inhibitor Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon. Dieser führt bei den durchgeführten luminometrischen Bestimmungen der NT2-Zellen zu einer stetigen Abnahme der ATP-Konzentration der Zellen bei steigender Inhibitor-konzentration.

Energiehaushalt der NT2-Zellen

Die NT2-Zelllinie ist eine humane Teratomkarzinomzelllinie und zeigt Charakteristika einer neuronalen Vorläuferzelle. Mit Hilfe dieser Modellneurone kann nun z.B. der Effekt von Faktoren, die bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen, auf das Überleben humaner Nervenzellen untersucht werden. Die NT2-Zellen wurden in meiner Arbeit speziell ausgewählt, weil sie als Modell für die Erkrankung CLN2 stehen.

Sie besitzen die Eigenschaft, zu neuronalen Zellen differenzieren zu können.

Bei den Ergebnissen der ATP-Bestimmung ist klar zu sehen, dass bei stei-

gender Inhibitorkonzentration die intrazelluläre ATP-Konzentration stetig abnimmt. Die niedrigste ATP-Konzentration ist nach 2 Wochen unter Inhibitorfluss zu beobachten. In diesen NT2-Zellen wurde die Aktivität der lysosomalen TPP 1 durch Zugabe eines synthetischen Inhibitors (Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon) zum Zellmedium gehemmt und somit der Krankheitsmechanismus der CLN2 imitiert, denn die Erkrankung geht mit einer Erniedrigung der TPP-1 einher.

Zellen, die mit Pseudoinhibitor behandelt worden sind, zeigen dagegen auch bei steigender Konzentration des Pseudoinhibitors keine relevante Abnahme der ATP-Konzentration, da der Pseudoinhibitor keinen Einfluss auf den Energiehaushalt der Zellen besitzt und somit bei dem Versuch als Kontrolle benutzt wurde.

Energiehaushalt der 293-Zellen und der K562-Zellen

Als Vergleich zu den NT2-Zellen wurde der ATP-Gehalt der 293-Zellen sowie der K562-Zellen bestimmt. Auch sie wurden mit Inhibitor- bzw. Pseudoinhibitorlösung versetzt und zu den gewählten Zeitpunkten der ATP-Wert luminometrisch gemessen.

Im Gegensatz zu den NT2-Zellen ist der Effekt der Inhibition der TPP-1 nicht in einer Abnahme der ATP-Konzentration nachzuweisen. Auch eine hohe Konzentration der Inhibitorlösung zeigt keine wesentliche Änderung der ATP-Konzentration der Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Herabsetzung der Aktivität des Enzyms TPP1, wie bereits bei der Viabilitätsbestimmung beobachtet, nur bei neuronal determinierten Zellen, nicht aber bei den beiden anderen untersuchten Zelllinien, zu einer Abnahme der ATP-Konzentration der Zellen führt. Dies unterstreicht ein weiteres Mal die Vermutung, dass der Zusammenhang zwischen Aktivität von TPP1 und ATP-Gehalt charakteristisch für neuronale Zellen ist.

Die immer gestellte Frage bei der Erkrankung CLN2 ist, warum es primär zu einer neuronalen Schädigung kommt, obwohl sich lysosomales Speicher material in verschiedenen Organen findet.

Allerdings zeigen bei der Erkrankung nur neuronale Zellen Dysfunktionen und Zelltod [Kida E 2001]. Es kann vermutet werden, dass es bei der CLN2 im Laufe der Entwicklung zu neuronal determinierten Zellen eine vulnerable Phase gibt. In diesem Prozess kommt es zu einer Abnahme der ATP-Konzentration der Zellen.

Bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen wird eine Störung der neuronalen Energiebereitstellung diskutiert. Durch den zellulären Energiemangel soll es dabei zur Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen in der Plasmamembran kommen. Über diese fließen dann unkontrolliert Calciumionen in die Zelle ein und führen zu Zellfunktionsstörungen bis hin zum Zelltod. Diese Vorgänge werden als ‚Slow-onset‘ Neurotoxizität im Gegensatz zur akuten Neurotoxizität durch exzitatorische Substanzen bezeichnet.

Differenzierte NT2-Zellen

Die humane Teratomkarzinomzelllinie (NT2) zeigt Charakteristika einer neuronalen Vorläuferzelle und kann durch Zugabe von Retinsäure in vitro in postmitotische Neurone differenzieren (hNT Neurone) [Pleasure S.J. 1992]. Diese differenzierten, neuronalen Zellen zeigen verschiedenste neuronale Marker [Lee 1993; Pleasure 1993].

In bestimmten Regionen des Gehirns von Säugetieren und somit auch des Menschen entstehen zeitlebens neue Zellen, die sich zu Nervenzellen und Gliazellen entwickeln. Die neu entstandenen Zellen scheinen sich entsprechend ihrer physiologischen Funktion in das Gewebe zu integrieren und elektrisch aktiv zu sein. Die Ursprungszellen werden als neuronale Stammzellen bezeichnet; sie können ihre Stamm-

zelleigenschaften über die gesamte Lebensspanne des Organismus beibehalten. Zu diesen Eigenschaften gehören Teilungsfähigkeit, Selbsterneuerung und die Fähigkeit, sich zu Gehirnzellen zu differenzieren. Die Signalwege, die zur Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften aktiviert werden, sind bislang unbekannt. Bei der späten CLN2 induziert die Zugabe eines spezifischen Inhibitors der TPP-1, Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon (AAF-CMK), zum Kulturmedium von Zellen die lysosomale Akkumulation der Untereinheit c.

Es erfolgte in dem von mir durchgeführten Experiment zusätzlich zu der Inhibition durch den Inhibitor-bzw. Pseudoinhibitor die Zugabe von Retinsäure zu den NT2-Zellen, um eine neuronale Differenzierung über einen Zeitraum von 2 Wochen zu induzieren. Durch Inkubation mit 10 µl all-trans-Retinsäure im Kulturmedium können NT2-Zellen zu Zellen mit neuronalem Charakter differenzieren

Dabei ist der Effekt von Inhibition der TPP-1 deutlich in einer Abnahme der ATP-Konzentration zu sehen, und zwar am stärksten bei den mit Inhibitorlösung behandelten Zellen, welche nach 2 Wochen Behandlung eine deutliche Abnahme der ATP-Konzentration zeigen.

Im Gegensatz zu anderen Stammzelltypen können neuronale Stammzellen im allgemeinen nicht über einen spezifischen Zellmarker definiert werden, da ein solcher bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Obwohl einige Proteine als Kandidaten für einen solchen Marker beschrieben wurden, darunter Nestin [Lendahl U 1990], Musashi-1, [Keyoung HM et al. 2001] Mcm2 [Maslov AY 2004] und GFAP [Doetsch F 1999], konnte keiner dieser Marker jedoch alle neuronalen Stammzellen umfassen. Nur jeweilige Subfraktionen der Zellen exprimieren diese Kandidatenmarker zu einem bestimmten Zeitpunkt ihrer Differenzierung.

Ebenfalls keine Grundlage der neuronalen Stammzelldefinition ist der Herkunftsort der Zellen, da es gelungen ist, aus Stammzellen des Knochenmarks [Mezey E 2000], der Nabelschnur [Sanchez-Ramos

2002] und anderer Organe [Ostenfeld T 2003] Zellen mit neuronalem Phänotyp zu erzeugen. Es ist allerdings unbekannt, welche Signalwege in der Zelle aktiviert oder unterdrückt sein müssen, damit neuronale Stammzellen einerseits ihre Stammzeleigenschaften beibehalten können oder andererseits zu Gehirnzellen differenzieren.

Neuronale Stammzellen, die aus dem Gehirn isoliert wurden, lassen sich lange Zeit in Kultur expandieren, ohne dass sie ihre Fähigkeiten zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung verlieren [Reynolds BA 1992]. Dadurch ist es möglich, eine große Anzahl von Zellen zu gewinnen, die in einer definierten Umgebung bestimmten experimentellen Zuständen ausgesetzt werden können.

Obwohl die physiologische Bedeutung der neuronalen Stammzellen für Altern, Lernen und Kognition bislang nicht vollständig geklärt sind, nähren gleichzeitig diese Befunde die Hoffnung auf einen therapeutischen Einsatz neuronaler Stammzellen für zahlreiche Erkrankungen des Nervensystems [Kempermann G 1988]; [Lie DC 2004].

Das weitreichende Potenzial dieser Zellen eröffnet die Diskussion um eine therapeutische Anwendung bei zahlreichen neurodegenerativen (z. B. bei M. Alzheimer und M. Parkinson), zerebrovaskulären (z. B. beim Schlaganfall) und entwicklungsbedingten Erkrankungen des Gehirns [McKay 1997]; [Abe 2000], da sie ihre Stammzeleigenschaften fast über die gesamte Lebensspanne eines Menschen behalten können [[Johansson CB 1999]; [Temple 2001]; [Alison MR 2002]; [Galli R 2003].

5 Zusammenfassung

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL-Krankheiten) sind progrediente neurodegenerative Krankheiten. Gemeinsames Merkmal aller Formen ist die Entwicklung von Demenz und Amaurose sowie die intrazelluläre Speicherung von Ceroidlipofuszin. Dieses Speichermaterial lässt sich in fast allen Körperzellen nachweisen, führt aber nur in Nervenzellen und der Retina zu Schäden. Bei der spätinfantilen NCL mit Mutationen im CLN2-Gen beruhen die Speicherphänomene im Gewebe anscheinend auf dem Mangel eines lysosomalen Enzyms, der Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP1). Der Zusammenhang zwischen diesem genetisch bedingten Enzymdefekt und der neuronalen Degeneration ist jedoch unbekannt. Der mögliche Zusammenhang wurde an einem zellulären Modell der CLN2-Krankheit untersucht. Als Modell dienten sogenannte NT2-Zellen, die von Tumorzellen abstammen und durch Behandlung mit Retinsäure in Zellen mit neuronalen Eigenschaften umgewandelt wurden. In den NT2-Zellen wurde die Aktivität der TPP 1 herabgesetzt durch Behandlung mit einem spezifischen Inhibitor des Enzyms (Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon). Dadurch entstand in den Zellen eine metabolische Situation, die derjenigen von Zellen eines Patienten mit CLN2-Krankheit und Defizienz der Tripeptidyl-Peptidase 1 entspricht. Auswirkungen der herabgesetzten Aktivität der TPP 1 wurden untersucht durch Messung der intrazellulären ATP-Konzentration und mittels einer kolorimetrischen Messung der Viabilität der Zellen. Als Ergebnis wurde gefunden, dass mit steigender Inhibitorkonzentration die intrazelluläre ATP-Konzentration stetig abnimmt. Parallel dazu zeigt die Viabilitätsmessung mit Hilfe des colorimetrischen MTT-Testes, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit der NT2-Zellen auch parallel zur Inhibitorkonzentration abnimmt. In der Differenzierungsphase der neuronalen Zellen zu postmitotischen humanen neuronalen Zellen unter Zugabe von Retinsäure zeigt eine Behandlung der Zellen mit dem synthetischen Inhibitor ebenfalls eine Abnahme des ATP-Gehaltes mit steigender Inhibitorkonzentration. Wahrscheinlich ist somit, dass bei der spätinfantilen NCL (CLN2) der neurodegenerative Prozess mit dem Verlust der Aktivität des lysosomalen Enzyms TPP I zusammenhängt.

6 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium, Kulturmedium mit Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und Phenolrot (als pH-Indikator)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
FCS	Fötales Kälberserum, enthält Hormone und andere Komponenten, die für das Wachstum der Zellen essentiell sind
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
RA	Retinoic Acid (Retinsäure)
NCL	Neuronale Ceroidlipofuszinose
TPP I	Tripeptidylpeptidase I

Lebenslauf

Name: Julia Liersch
Geburtsdatum und –ort: 29. Juni 1976 in Salzgitter
Wohnhaft: Wrangelstr. 113, 20253 Hamburg

Studium / Schulbildung:

Seit Oktober 2004	Assistenzärztin der Kinderklinik des Klinikums Lüneburg
August 2003	Ärztin im Praktikum der Kinderklinik des Klinikums Lüneburg
Frühjahr 2003	3. Staatsexamen
Frühjahr 2002	2. Staatsexamen
Herbst 1999	1. Staatsexamen
Herbst 1998	Physikum
Ab WS 1996	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
1995 – 1996	Studium der Zahnmedizin, Medizinische Hochschule Hannover
1982 – 1995	Schulausbildung in Salzgitter: Gymnasium am Fredenberg, Abitur 05/1995 Orientierungsstufe an der Goethestraße Grundschule am Ulmenried

Danksagung

Zum Schluss möchte ich allen danken, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Alfried Kohlschütter für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und kooperativen Unterstützung bei der Fertigstellung.

Der Arbeitsgruppe des Isotopenlabor der Kinderklinik um Herrn Dr. med. Robert Steinfeld für die Betreuung der Doktorarbeit, insbesondere Selda Tokdemir für ihre Nerven und Durchhaltekraft, außerdem Andrea Knoke und Hans Steincke.

Den Mitarbeitern des Stoffwechsellabors der Kinderklinik, ganz besonders Frau Wernike und Frau Giesecking für die hervorragende technische Assistenz.

Der guten Zusammenarbeit mit dem Labor für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des UKE und dem Zentrum für molekulare Neurobiologie, insbesondere Frank Leypold für die Tips zur NT2-Zellkultur.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Endokrinologie-Molekularer Stoffwechsel 336“ des UKE für die Bereitstellung des Stipendiums und die Teilnahme an ihren Kongressen und Fortbildungen.

Meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung.

Literaturverzeichnis

- Abe (2000). "Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 20: 1393-1408.
- Alison MR, P. R., Forbes S, Wright NA. (2002). "An introduction to stem cells." J Pathol 197: 419-423.
- Berkovic, S. F. C., S.; Andermann, F.; Andermann, E.; Wolfe, L. S. (1988). "Kufs' disease: a critical reappraisal." Brain 111: 27-62.
- Bielschowsky, M. (1913). "Uber spät-infantile familiäre amaurotische Idiotie mit Kleinhirnsymptomen." Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, 50, 7-29.
- Boustany, R.-M. (1992). "Neurology of the Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses." AJHG(42): 533-535.
- Bradford (1976). "Protein assay." Anal. Biochem. 72: 248.
- Claussen, M., Heim, P, Knispel, J, Goebel, H, Kohlschuetter, A (1992). "Incidence of Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses in West-Germany: Variation of a Method for Studying Autosomal Recessive Disorders." AJHG(42): 536-538.
- Constantinidis J., e. a. (1992). "The adult and a new form of NCL." Acta Neuropathol (Berl). 83: 461-468.
- Doetsch F, C. I., Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." Cell 97: 703-716.
- Ezaki J, T.-E. 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 (Tokyo) .(Sep;128(3):): 509-16.
- Ezaki J, W. L., 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." Journal of Neurochemistry(67): 1677-1687.

Galli R, G. A., Bonfanti L, Vescovi AL (2003). "Neural stem cells: an overview." Circ Res 92: 598-608.

Goebel HH, V. J., Reitter B et al.: (1995). "Prenatal diagnosis of infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis: a combined electron microscopic and molecular genetic approach." Brain Dev 1995; 17: 83-88.

Graham FL, J. S., WC Russell and R Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." Journal of General Virology Vol 36: 59-74.

Hagopian, K., Lake, BD, Winchester, BG, Clark, JB (1995). "Late-Infantile Batten Disease: Purification of the Subunit c of the Mitochondrial ATP Synthase From Storage Material." (57): 272-278.

Heim, P., Kohlschuetter, A (1995). "Avoid Diagnostic Delay of Late-Infantile and Juvenile Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis:A word to Pediatricians, Neurologists and Ophthalmologists." (57): 238.

Heine C, B. K., S Storch, A Kohlschutter, DN Palmer T Braulke (2004). "Defective Endoplasmic Reticulum-resident Membrane Protein CLN6 Affects Lysosomal Degradation of Endocytosed Arylsulfatase A." J Biol Chem. 279: p. 22347-52.

Heine, C., B. Koch, et al. (2004). "Defective Endoplasmic Reticulum-resident Membrane Protein CLN6 Affects Lysosomal Degradation of Endocytosed Arylsulfatase A." J Biol Chem 279(21): 22347-52.

- Hellsten E, V. J., Speer MC et al.: (1993). "Refined assignment of the infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL, CLN1) locus at 1p32: incorporation of linkage disequilibrium in multipoint analysis." Genomics 1993; 16: 720-725.
- Hofmann SL, D. A., Yi W, Lu JY, Wisniewski KE. (1999). "Genotype-phenotype correlations in neuronal ceroid lipofuscinosis due to palmitoyl-protein thioesterase deficiency." Mol Genet Metab. 1999 Apr;66(4):234-9.
- Ikeda K, G. H. (1979). "Ultrastructural pathology of lymphocytes in neuronal ceroid-lipofuscinosis." Brain Dev 1979; 1: 285-292.
- Johansson CB, S. M., Wallstedt L, Janson AM, Frisen J (b) :. (1999). "Neural stem cells in the adult human brain." Exp Cell Res 253: 733-736.
- Junaid MA, P. R. (2001). "Biochemistry of neuronal ceroid lipofuscinoses." Adv Genet. 2001;45:93-106. Related Articles, Links.
- Kempermann G, K. H., Winkler J, Gage FH (1988). "Neue Nervenzellen für das erwachsene Gehirn. Adulte Neurogenese und Stammzellkonzepte in der neurologischen Forschung." Nervenarzt 69: 851-857.
- Kerr J.F.R., W. A. H., Currie A.R., Br. J. (1972). Cancer Research 26, 239.
- Keyoung HM, R. N., Benraiss A, Louissaint A, Jr., Suzuki A, Hashimoto M, Rashbaum WK, Okano H, and G. SA (2001). "High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain." Nat Biotechnol 19: 843-850.
- Kida E, G. A., Wisniewski KE. (2001). "Cellular pathology and pathogenic aspects of neuronal ceroid lipofuscinoses." Adv Genet. 2001;45:35-68.
- Klein E, B.-B. H., Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A,

- Vanky F. (1976). "Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia." Int J Cancer. 1976 Oct 15;18(4):421-31.
- Kohlschuetter, A., Goebel, H (1997). "Die neuronalen Ceroidlipofuszinosen." Deutsches Ärzteblatt 94 (Heft 47): B 2581-2586.
- Kohlschuetter A, L. R., Albani M (1988). "Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (JNCL): quantitative description of its clinical variability." Acta Paed Scand(77): 867-872.
- Krivit W, S. J., Shapiro EG, Lockman LA (1995). "Microglia: the effector cell for reconstruction of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases." Cell Transplant 4: 385-392.
- Kufs, H. (1925). "Ueber eine Spätform der amaurotischen Idiotie und ihre heredofamiliären Grundlagen." Z. Ges. Neurol. Psychiat. 95: 169-188.
- Lake B.D., N. P. C. C. (1978). "Early-juvenile Batten`s disease- a recognisable subgroup distinct from other forms of Batten`s disease." J Neurol Sci 36: 265-271.
- Lazarus HS, S. (1993). "Photoreceptor degeneration and altered distribution of interphotoreceptor matrix proteoglycans in the mucopolysaccharidosis VII mouse." Exp Eye Res. 56: 3081-3092.
- Lee, V. M., M (1993). "hNT Neurons: Human Postmitotic CNS Neurons." Strategies in molecular biology 7: 28-31.
- Lendahl U, Z. L., McKay RD (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." Cell 60: 585-595.
- Lie DC, S. H., Colamarino SA, Ming GL, Gage FH (2004). "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases." Annu Rev Pharmacol Toxicol

44: 399-421.

Lowry (1951). "Protein assay." J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lukacs Z, S. P., Keil A, Steinfeld R, Kohlschutter A. (2003).

"Rapid and simple assay for the determination of tripeptidyl peptidase and palmitoyl protein thioesterase activities in dried blood spots." Clin Chem. 2003 Mar;49(3):509-11.

March PA, W. S., Walkley SU. (1995). "Morphological alterations in neocortical and cerebellar GABAergic neurons in a canine model of juvenile Batten disease." Am J Med Genet. Jun 5;57(2):: 204-12.

Maslov AY, B. T., Plunkett RJ, Pruitt SC (2004). "Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice." J Neuroscience 24: 1726-1733.

McDonnell (1990). Mol. Cell Biol 10, 1901.

McKay (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science 276: 66-71.

Mezey E, C. K., Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science 290: 1779-1782.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J. Immunol. Methods. 65 , 55-63 .

Ostenfeld T, S. C. (2003). "Recent advances in stem cell neurobiology." Adv Tech Stand Neurosurg 28: 3-89.

Pleasure S.J., L. V. M.-Y., Page CD (1992). "Pure, postmitotic polarized human neurons derived from NT2era2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons." J Neuroscience 12: 1802-1815.

- Pleasure, S. J., Lee, V.M.-Y. (1993). "NTera 2 Cells: A Human Cell Line Which Displays Characteristic Expected of a Comitted Neuronal Progenitor Cell." Journal of Neuroscience Research 35: 585-602.
- Rapola J, S. R., Ämmälä P, Santovuori P: (1993). "Prenatal diagnosis of infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis, INCL: morphological aspects." J Inherit Metab Dis 1993; 16: 349-352.
- Reynolds BA, W. S. (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science 255: 1707-1710.
- Sanchez-Ramos (2002). "Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood." J Neurosci Res 69: 880-893.
- Santavuori, P. (1988). "Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood." Brain Dev 1988; 10: 80-83.
- Santavuori P, H. M., Rapola J. (1974). "Infantile type of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis." Dev Med Child Neurol. 1974 Oct;16(5):644-53. [Related Articles, Links](#).
- Santavuori P, S. V. T. A. (2001). "Clinical and neuroradiological diagnostic aspects of neuronal ceroid lipofuscinoses disorders." Eur J Paediatr Neurol 5 Suppl A: p. 157-61.
- Santavuori P., e. a. (1991). "The spectrum of Janky-Bielschowsky disease." Neuropediatrics 22: 92-96.
- Sharp, J. D., R. B. Wheeler, et al. (2003). "Spectrum of CLN6 mutations in variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." Hum Mutat 22(1): 35-42.
- Siakotos AN, W. I., Saito A, Fleischer S. (1970). "Procedures for the isolation of two distinct lipopigments from human brain: lipofuscin and ceroid." Biochem Med. 1970 Dec;4(5):361-75.
- Smith PK, K. R., Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH,

- Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem 150 :76-85 . 150: 76-85.
- Sondhi D, H. N. (2001). "Feasibility of Gene Therapy for Late neuronal Ceroid Lipofuscinosos." Arch Neurol. 58: 1793-1798.
- Steinfeld R, H. P., von Gregory H, Meyer K, Ullrich K, Goebel HH, Kohlschutter A. (2002). "Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: quantitative description of the clinical course in patients with CLN2 mutations." Am J Med Genet. 2002 Nov 1;112(4):347-54.
- Steinfeld R, H. P., von Gregory H, Meyer K, Ullrich K, Goebel HH, Kohlschütter A. (2002). "Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: quantitative description of the clinical course in patients with CLN2 mutations." AJHG 2002 Nov 1;112(4):: 347-54.
- Steinfeld R, S. H., Isbrandt D, Kohlschutter A, Gartner J (2004). "Mutations in classical late infantile neuronal ceroidlipofuscinosis disrupt transport of tripeptidyl-peptidase-I to lysosomes." Hum Mol Genet. 13(20): 2483-91.
- Sulston J.R., H. H. R. (1977). Dev. Biol. 56, 110.
- Teixeira, C. A., J. Espinola, et al. (2003). "Novel mutations in the CLN6 gene causing a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." Hum Mutat 21(5): 502-8.
- Temple (2001). "The development of neural stem cells." Nature 414:: 112-117.
- Verkruyse LA, H. S. (1996). "Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase." J Biol Chem. 1996 Jun 28;271(26):15831-6.
- Vesa J, H. E., Verkruyse L et al. (1995). "Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal

ceroid lipofuscinosis." Nature 1995; 376: 584-587.

Vesa J, M. C., K Oelgeschlager, et al. (2002). "Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3." Mol Biol Cell 13: p. 2410-20.

Vines DJ, W. M. (1999). "Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I." FEBS Lett. 1999 Jan 25;443(2):131-5.

Walkley SU, M. P., Schroeder CE, Wurzelmann S, Jolly RD (1995). "Pathogenesis of brain dysfunction in Batten disease." AJHG Jun 5;57(2): 196-203.

Zeman W, A. M. (1963). "On the nature of the ,stored' lipid substance in juvenile amaurotic idiocy (Batten-Spielmeyer-Vogt)." Ann Histochem 1963; 8: 255-258.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, im September 2006

Julia Liersch